

ATEMKONDENSAT - EIN STANDARDISIERBARES MESSVERFAHREN?

- VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN ZUR
ATEMKONDENSATGEWINNUNG MITTELS ZWEIER
UNTERSCHIEDLICHER SAMMELSYSTEME-

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

an der medizinischen Fakultät

der Universität Leipzig

Eingereicht von: Sandra Wappler

geboren am 26.01.1988 in Rochlitz

Angefertigt in: Abteilung Pneumologie, Universitätsklinikum Leipzig

Betreuer: Prof. Dr. med. H. Wirtz und

Dr. rer. nat. H. Kuhn

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 28.02.2023

Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
Abkürzungsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
1 Einleitung	8
1.1 Übersicht über Erkrankungen und Diagnostik in der Pneumologie.....	8
1.2 Ausgewählte Atemwegserkrankungen	9
1.2.1 Chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD)	9
1.2.1.1 Pathophysiologie.....	9
1.2.1.2 Epidemiologie	10
1.2.1.3 Therapie- und Diagnostikansätze in der Forschung	11
1.2.2 Lungenkarzinom	11
1.2.2.1 Epidemiologie	11
1.2.2.2 Pathophysiologie.....	11
1.2.2.3 Prognose und Screeningmöglichkeiten	12
1.3 Diagnostik von Atemwegsmaterialien.....	14
1.3.1 Bronchoalveoläre Lavage (BAL).....	14
1.3.2 Sputumdiagnostik.....	16
1.3.3 Messung des fraktionierten exhalieren Stickstoffmonoxids (FeNO-Messung)	17
1.3.4 Atemkondensat	18
1.3.4.1 Entstehung und Zusammensetzung des Atemkondensats.....	19
1.3.4.2 Einflussfaktoren bei der Atemkondensatgewinnung	20
1.3.4.3 EBC-Bestandteile und ihre Einsatzfähigkeit	21
2 Fragestellung	25
3 Material und Methoden	27
3.1 Probanden/Patienten	27
3.2 Atemkondensat-Systeme	27
3.2.1 EcoScreen.....	27
3.2.2 TURBO DECCS	29
3.3 Parameterbestimmung.....	30
3.3.1 Materialien.....	31
3.3.1.1 Geräte.....	31
3.3.1.2 Computersoftware.....	31
3.3.1.3 Reagenzien und Chemikalien	32

3.3.2	pH-Messung	32
3.3.3	Atemkondensatmenge und Atemminutenvolumen.....	34
3.3.4	Proteinmessung.....	34
3.3.5	Amylaseaktivität.....	35
3.3.6	Nitrit-Messung	36
3.3.7	Nachweis von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	36
3.4	Statistik	38
4	Ergebnisse	40
4.1	Amylaseaktivität.....	40
4.2	Atemkondensatmenge	41
4.3	pH-Messung	42
4.4	Proteinnachweisbarkeit.....	44
4.5	Proteinkonzentration	46
4.6	Nitrit-Messung.....	48
4.7	Nachweisbarkeit von DNA mittels PCR.....	50
4.8	Volumen und Proteinkonzentration bei Veränderung des DECCS-Testaufbaus...	52
4.9	Atemminutenvolumen	53
5	Diskussion.....	54
	Zusammenfassung	65
	Literaturverzeichnis.....	68
	Anhang	77

Abkürzungsverzeichnis

ALK	Anaplastic Lymphoma Kinase
ARDS	Acute respiratory distress syndrome
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BCA	Bicinchoninsäure
BRAF	proto-oncogene B-Raf
Ca	Karzinom
CD	Clusters of Differentiation
CEP	Chronische eosinophile Pneumonie
CF	Zystische Fibrose/Mukoviszidose
CMV	Cytomegalovirus (Zytomegalievirus)
CO₂	Kohlenstoffdioxid
COP	Kryptogen organisierende Pneumonie
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung (chronic obstructive pulmonary disease)
Cu	Kupfer
dTNPs	Nukleosidtriphosphate
EAA	Exogen allergische Alveolitis
EBC	Exhaled breath condensate
ECP	Eosinophiles Kationisches Protein
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
FeNO	Fraktion des exhalierten Stickstoffmonoxids
FEV1	Forcierte Einsekundenkapazität (Forced Expiratory Pressure in 1 Second)
FVC	Forcierte Vitalkapazität
GM-CSF	Granulocyte macrophage-colony stimulating factor
ICS	Inhalatives Corticosteroid
IL	Interleukin
IPF	idiopathische Lungenfibrose
IQR	Interquartilsabstand (interquartile range)

KRAS	Kirsten rat sarcoma (oncogene)
LISS	lung injury severity
LTB	Leukotrien
MgCl₂	Magnesiumchlorid
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MYC-Gen	Myelocytomatose-Protoonkogen
NaCl	Natriumchlorid
NO	Stickstoffmonoxid
NO₂	Nitrit
NO₃	Nitrat
NSCLC	Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom (non-small cell lung cancer)
pCO₂	Kohlenstoffdioxidpartialdruck
pO₂	Sauerstoffpartialdruck
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PD-L1	Programmed Cell-Death Liganden 1
PTHrP	Parathormonverwandtes Peptid
RAS	Rat sarcoma
RB	Retinoblastom-Protein
ROS1	c-ros oncogene 1
RV	Residualvolumen
SCLC	Kleinzelliges Lungenkarzinom (small cell lung cancer)
SIADH	Syndrom der inappropriaten („inadäquaten“) ADH-Sekretion
TLC	Totale Lungenkapazität
TNF	Tumornekrosefaktor
VOC	volatile organic compounds (flüchtige organische Verbindungen)

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: EcoScreen – Atemkondensator der Firma Jaeger	28
Abbildung 2: Sammeleinheit des EcoScreens.....	29
Abbildung 3: Aufbau und Sammeleinheit des TURBO DECCS – Atemkondensator der Firma Medivac	30
Abbildung 4: Potenziometrie (Radiometer Medical ApS, 2017)	33
Abbildung 5: Nernst-Gleichung (Radiometer Medical ApS, 2017)	33
Abbildung 6: Ablauf des BCA-Micro-Protein-Assays (Thermo Scientific, 2015).....	35
Abbildung 7: Amylaseaktivität in den EBC-Proben Vergleich der Amylaseaktivität in den Amylase-positiven EBC-Proben, welche mittels DECCS- und EcoScreen-System gesammelt wurden.....	40
Abbildung 8: Atemkondensatvolumen beider Atemkondensatgeräte Vergleich aller Kondensatmengen, welche mittels DECCS- und dem EcoScreen-System gesammelt wurden	41
Abbildung 9: Atemkondensatvolumen aller Gruppen Vergleich der mit beiden Atemkondensatsystemen gewonnenen Kondensatmenge aller untersuchten Gruppen (Proband, COPD- und Lungenkarzinompatienten)	42
Abbildung 10: Proben-pH beider Atemkondensatgeräte Vergleich der mittels Radiometer (Potenziometrie) bestimmten pH-Werte aller Atemkondensatproben, welche mittels DECCS- und dem EcoScreen-System gesammelt wurden	43
Abbildung 11: Proben-pH der untersuchten Gruppen am EcoScreen-Gerät Vergleich des mittels Radiometer (Potenziometrie) bestimmten Atemkondensat-pH der untersuchten Gruppen (Proband, COPD- und Lungenkarzinompatienten), welche mittels EcoScreen-Gerät gesammelt wurden	44
Abbildung 12: Proben-pH der Atemkondensatproben aller Gruppen Vergleich des mittels Radiometer (Potenziometrie) bestimmten Atemkondensat-pHs aller untersuchten Gruppen (Proband, COPD- und Lungenkarzinompatienten) beider Atemkondensatsysteme gegeneinander	44
Abbildung 13: Proteinnachweisbarkeit in den Proben des DECCS- gegenüber denen des EcoScreen-Geräts Vergleich aller untersuchten EBC-Proben bezüglich des Anteils derjenigen EBC-Proben, in welchen mittels BCA-Micro-Protein-Assay ein Proteinnachweis gelang.....	45
Abbildung 14: Proteinnachweisbarkeit der Atemkondensatproben der untersuchten Gruppen Vergleich der Nachweisbarkeit des mittels BCA-Micro-Protein-Assay bestimmten Proteins der Atemkondensatproben aller untersuchten Gruppen (Proband, COPD- und Lungenkarzinompatienten)	46
Abbildung 15: Proteinkonzentration der EBC-Proben beider Atemkondensatgeräte Vergleich der mittels BCA-Micro-Protein-Assay bestimmten Proteinkonzentration aller untersuchten Kondensatproben des DECCS- gegenüber des EcoScreen-Systems.....	47

- Abbildung 16: Proteinkonzentration der Atemkondensatproben der untersuchten Gruppen** Vergleich der EBC-Proben aller untersuchten Gruppen (Proband, COPD- und Lungenkarzinompatienten) bezüglich der Proteinkonzentration, welche mittels BCA-Micro-Protein-Assay gelang 48
- Abbildung 17: Nitritkonzentration der Kondensatproben beider Atemkondensatsysteme** Untersuchung der Nitritkonzentration aller Kondensatproben des DECCS im Vergleich zu denen des EcoScreens 49
- Abbildung 18: Nitritkonzentration der Atemkondensatproben der untersuchten Gruppen am EcoScreen** Vergleich der Untergruppen Lungenkarzinom-, COPD-Patient und Proband im Hinblick auf die Nitritkonzentration, der am EcoScreen gewonnenen Atemkondensatproben 50
- Abbildung 19: Nitritkonzentration der Atemkondensatproben der untersuchten Gruppen** Vergleich des mit beiden Atemkondensatsystemen gewonnenen Atemkondensats aller untersuchten Gruppen (Proband, COPD- und Lungenkarzinompatienten) im Hinblick auf die Nitritkonzentration..... 50
- Abbildung 20: Gelelektrophorese für die β -Actin PCR-Produkte** Vergleich der DNA-Nachweisbarkeit in den Atemkondensatproben beider Sammelgeräte mittels PCR für das β -Actin-Gen. Ergebnis der Gelelektrophorese zweier EBC-Proben des DECCS- und des EcoScreen-Gerätes sowie Positiv- (PK) und Negativkontrolle (NK)..... 51
- Abbildung 21: Nachweisbarkeit von DNA in den Proben des DECCS- gegenüber denen des EcoScreens-Geräts** Vergleich der 30 untersuchten EBC-Proben bezüglich des Anteils derjenigen EBC-Proben, in welchen ein DNA-Nachweis gelang 51
- Abbildung 22: Atemkondensatmenge bei Veränderung des DECCS-Sammel-systems** Vergleich der Atemkondensatvolumen in 10-Minuten-Sammelphase durch Kürzen des Schlauchsystems bzw. Reduktion der Sammeltemperatur im Vergleich zum normalen Versuchsaufbau..... 52
- Abbildung 23: Atemminutenvolumen an beiden Atemkondensatgeräten im Vergleich** Vergleich des ventilierten Atemminutenvolumens bei Gezeitenatmung an beiden Atemkondensatgeräten im Vergleich – gemessen mittels Gasometer..... 53

Tabellenverzeichnis

	<u>Seite</u>
Tabelle 1: Unterschiede in der BAL-Zellverteilung zwischen Rauchern, Nicht-Rauchern und COPD-Patienten Vergleich der Gesamtzellzahl sowie des Anteils der Makrophagen und Epithelzellen in der BAL von gesunden Rauchern, Nicht-Rauchern und COPD-Patienten (Russell et al., 2002)	10
Tabelle 2: BAL-Zellverteilung Aufteilung der BAL-Zellverteilung nach Nichtraucher, gesunde Raucher, Sarkoidose, exogen allergischer Alveolitis (EAA), idiopathischer Lungenfibrose (IPF), kryptogenen organisierenden Pneumonie (COP) und chronischer eosinophiler Pneumonie (CEP) (Tötsch et al., 2007)	15
Tabelle 3 Thermo-Cycler Programm	37
Tabelle 4 Primersequenzen.....	38

1 Einleitung

1.1 Übersicht über Erkrankungen und Diagnostik in der Pneumologie

In der Pneumologie stehen zur Diagnostik und zum Monitoring von Atemwegserkrankungen verschiedene invasive und nicht-invasive Methoden zur Verfügung.

Zu den nicht-invasiven Verfahren zählen unter anderem die Bodyplethysmographie mit Diffusionstestung und die bronchiale Provokationstestung. Mit diesen können restriktive und obstruktive Ventilationsstörungen unterschieden und Gasaustauschstörungen detektiert werden. Dies ist ein wichtiger Baustein in der pneumologischen Diagnostik und ermöglicht zudem eine objektive Verlaufsbeurteilung.

Als Belastungsuntersuchungen hat sich in der Routine der mit einfachen technischen Mitteln durchführbare 6-Minuten-Gehtest etabliert. Für spezielle Fragestellungen steht zudem die Spiroergometrie zur Verfügung. Sie erlaubt nicht nur eine Differenzierung der Belastungseinschränkungen, sondern wird beispielweise auch zur Frage der Operationsfähigkeit oder für gutachterliche Tätigkeiten herangezogen. Allerdings ist diese Untersuchung im Vergleich zum 6-Minuten-Gehtest zeitintensiver und bedarf einer umfangreicheren technischen Ausstattung sowie geschultem Personal.

Demgegenüber widmen sich invasive Verfahren wie die Bronchoskopie vordergründig der Gewinnung und Untersuchung von feingeweblichem oder mikrobiologischem Untersuchungsmaterial aus den tiefen Atemwegen. Die Bronchoalveoläre Lavage (BAL) zählt dabei zu einer der wichtigsten diagnostischen Möglichkeiten, welche zytologische und mikrobiologische Analysen erlaubt und hierdurch eine anerkannte und häufig eingesetzte Methode in pneumologischen Untersuchungen und Diagnostik darstellt (Gessner, 2005).

Trotz der routinemäßigen Anwendung der BAL bleibt dies ein invasives Verfahren, welches deshalb Risiken und Strapazen für den Patienten birgt. Es werden in der aktuellen Diagnostik daher vor allem solche Verfahren gesucht, die eine geringe Beeinträchtigung für den Patienten darstellen und dennoch spezifisch und sensitiv in der Beurteilung von Atemwegserkrankungen sind. Ziel ist es eine Methode zu etablieren, die auf einfache Weise eine große Anzahl an krankheitsspezifischen Informationen erbringt, sodass sie sich sowohl für das Monitoring bei Atemwegserkrankungen als auch als Screeningverfahren eignet. Insbesondere bei Erkrankungen wie der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) und Asthma bronchiale ist der Grad der Atemwegsinfektion ein wichtiger Parameter um die Krankheitsaktivität oder den Effekt therapeutischer Maßnahmen zu beurteilen. Aktuell werden hierfür indirekte Verfahren wie die Veränderung der Bodyplethysmographie sowie die klinische Symptomatik genutzt. Gegenstand der aktuellen Forschung sind vor allem Methoden wie die Messung von volatilen organischen Komponenten in der Expirationsluft mittels elektronischer

Nase als auch das Atemkondensat. In der vorliegenden Arbeit wird daher die Beurteilung des Atemkondensats weiter untersucht. Die verschiedenen Methoden werden erläutert, die Ausführungen sind jedoch besonders auf das Atemkondensat konzentriert.

Im Folgenden wird zudem auf die Krankheitsbilder der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung und das Lungenkarzinom weiter eingegangen, da diese Entitäten im Rahmen der durchgeführten Studie eingeschlossen wurden.

1.2 Ausgewählte Atemwegserkrankungen

1.2.1 Chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD)

1.2.1.1 Pathophysiologie

Die COPD ist die häufigste chronische Atemwegserkrankung, welche gekennzeichnet ist durch eine nicht- beziehungsweise nur teil-reversible Obstruktion mit Abnahme der forcierten Einsekundenkapazität (FEV1) und des expiratorischen Atemflusses sowie Erhöhung des Atemwiderstandes. Diese Veränderungen sind im Verlauf häufig progredient und äußern sich hauptsächlich durch Belastungsdyspnoe und chronischen Husten, zumeist verbunden mit Auswurf. Ursächlich ist eine Inflammationsreaktion der kleinen Atemwege, welche durch inhalative Noxen ausgelöst wird und im Verlauf durch Umbau zu einer zunehmenden Destruktion der Lungenstruktur führt. Häufigster exogener Faktor ist mit fast 90% der inhalative Tabakabusus, wobei nur etwa 15-20% der Raucher eine COPD entwickeln. Hinzu kommen berufliche Exposition, beispielweise im Bergbau, oder auch Luftverschmutzung, welche ebenfalls eine COPD bedingen können. (Herold, 2020; Koczulla et al., 2011, 2008; Lorenz et al., 2009)

Eine zunehmende Fibrosierung durch inflammatorisch bedingte Fibroblastenaktivierung und bronchiale Instabilität führen zur Obstruktion mit Kollapsneigung. Durch Zilienverlust und der damit verbundenen gestörten Clearance sowie Hypersekretion, welche infolge Hyperplasie und Hypertrophie der Schleimdrüsen und Becherzellen entsteht, wird die Entzündungsreaktion unterhalten. Durch diese Prozesse kommt es letztendlich zur Entwicklung eines Lungenemphysems mit folgender Überblähung, zunehmender Obstruktion, Abnahme der Diffusion sowie Elastizitätsverlust (Herold, 2020; Lorenz et al., 2009). Die entstehende Verteilungsstörung mit Ventilations-/Perfusions-Mismatch führt über den Euler-Liljestrand-Effekt zu einer sekundären Vasokonstriktion der schlecht ventilierten Abschnitte und fördert so die Bildung einer pulmonalen Hypertonie, welche neben einer respiratorischen Insuffizienz eine häufige Spätfolge der COPD ist. Die Erkrankung ist nicht nur verbunden mit akuten Exazerbationen, sondern auch mit zahlreichen Komorbiditäten wie kardiovaskuläre Erkrankungen, metabolischem Syndrom, aber auch Lungenkarzinomen assoziiert. (Herold, 2020; Pschyrembel, 2020; RKI, 2017)

Die beteiligten Entzündungsmediatoren sind vor allem polymorphkernige Neutrophile, Makrophagen, CD4- und CD8-T-Lymphozyten und B-Zellen. Diese konnte Hogg et al. (2004) durch die histologische Aufarbeitung intraoperativ gewonnener Proben der kleinen Atemwege (< 2 mm) von COPD-Patienten verschiedener Schweregrade nachweisen. Die inhalativen Noxen führen zu einer Aktivierung der Makrophagen, die über Freisetzung von verschiedenen Mediatoren unter anderem Tumornekrosefaktor-(TNF)- α , Interleukin-(IL)-8, Leukotrien-(LTB)-4 und granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) sowie über die Produktion von Proteasen wie Matrixmetalloproteinasen, eine Schlüsselrolle im Inflammationsprozess bilden. (Barnes, 2004; Koczulla et al., 2011, 2008; Russell et al., 2002)

Hierzu passend lässt sich eine erhöhte Anzahl der Makrophagen in der bronchoalveolären Lavage von COPD-Patienten im Vergleich zu Nicht-Rauchern nachweisen (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Unterschiede in der BAL-Zellverteilung zwischen Rauchern, Nicht-Rauchern und COPD-Patienten Vergleich der Gesamtzellzahl sowie des Anteils der Makrophagen und Epithelzellen in der BAL von gesunden Rauchern, Nicht-Rauchern und COPD-Patienten (Russell et al., 2002)

	Nicht-Raucher	Gesunde Raucher	COPD-Patienten
Gesamt-Zellzahl (10^6)	5,5 \pm 0,8	6,5 \pm 1,2	8,9 \pm 1,2*
Makrophagen (%)	86,3 \pm 2,4	89,8 \pm 2,9	91,4 \pm 1,6
Epithelzellen (%)	2,6 \pm 0,6	1,6 \pm 0,4	1,6 \pm 0,4
Gesamtzellzahl entspricht Zellzahl einer BAL, welche aus einer 240 ml-Lavage gewonnen wurde			
* $p < 0,05$, COPD verglichen mit Nicht-Rauchern			

Ein Ungleichgewicht zwischen Proteasen und Proteaseinhibitoren ist die grundlegende Theorie zur Emphysementstehung. Unterstützt wird die Emphysebildung durch die mittlerweile nachgewiesene Emphysebildung bei Patienten mit Alpha-1-Antitrypsin-Mangel (Biedermann and Köhnlein, 2006; Herold, 2020; Koczulla et al., 2008).

1.2.1.2 Epidemiologie

Da die Prävalenz der COPD mit steigendem Lebensalter zunimmt, rückt diese im Hinblick auf den demografischen Wandel immer mehr in den Fokus der Pneumologie. Sie ist eine der führenden Ursachen für Morbidität und Mortalität unserer Gesellschaft. Obwohl in vielen Ländern mittlerweile Wert auf Aufklärung und Raucherentwöhnung zur Reduktion des Nikotinkonsums und somit Prävention der COPD gelegt wird, ist in den nächsten Jahren mit einer weiteren Zunahme der Prävalenz zu rechnen (Akmatov et al., n.d.; Koczulla et al., 2008). Laut der 2014/2015 erhobenen GEDA-Studie lag die Prävalenz der COPD in Deutschland bei 5,8% bezogen auf alle über 18-Jährigen und steigt mit dem Lebensalter in der Altersgruppe

> 65 Jahren auf 11 % bei Frauen beziehungsweise 12,5 % bei Männern an (RKI, 2017). Krankheiten der Atemwege wie die COPD sind nach Herz-Kreislaufkrankungen und Neubildungen in Deutschland die dritthäufigste Todesursache (Herold, 2020; Statistisches Bundesamt (Destatis), 2021).

1.2.1.3 Therapie- und Diagnostikansätze in der Forschung

Die oben genannten Veränderungen in den Atemwegen von COPD-Patienten können nicht nur Grundlage für neue Therapieansätze sein, sondern ebenso mögliche Ansatzpunkte für Screeningverfahren. Die BAL hat hierbei schon ihren Stellenwert im klinischen Alltag bewiesen. Allerdings eignet sie sich aufgrund ihrer Invasivität weder als Screeningverfahren, noch zur Verlaufsbeurteilung der Entzündung bei bereits bekannter Atemwegserkrankung. An dieser Stelle wird Hoffnung in die Atemkondensatgewinnung gesetzt. Hier finden sich im Falle einer Exazerbation niedrigere pH-Werte, welche sich unter Therapie wieder normalisieren können (Warwick et al., 2013). Hierdurch könnten nicht nur Exazerbationen frühzeitig erkannt, sondern auch die Therapieadhärenz überprüft werden. Auch Veränderungen des Proteoms im Atemkondensat lassen Rückschlüsse auf eine chronische Atemwegserkrankung zu (Fumagalli et al., 2012; Kostikas et al., 2002). Zudem kann ein aktiver Nikotinkonsum am Atemkondensat abgeleitet werden (Antus et al., 2010; Garey et al., 2004) und könnte so möglicher Ansatzpunkt zur Kontrolle einer erfolgreichen Raucherentwöhnung sein.

1.2.2 Lungenkarzinom

1.2.2.1 Epidemiologie

Maligne Neubildungen nehmen in Deutschland die zweithäufigste Todesursache ein. Das Lungenkarzinom zeigt eine ungünstige Prognose und ist 2019 die häufigste zum Tode führende Krebserkrankung (Statistisches Bundesamt (Destatis), 2020). Auffällig ist in den letzten Jahren geschlechtsabhängig ein unterschiedlicher Trend. Während Inzidenz und Mortalität für das männliche Geschlecht rückläufig sind, steigen sie bei den Frauen an (Robert-Koch-Institut - Zentrum für Krebsregisterdaten, 2020).

Lungenkarzinome machen 25% aller Krebserkrankungen bei Männern bzw. 12% bei Frauen in Europa aus (Herold, 2020) und befinden sich damit neben Prostata- bzw. Mammakarzinomen sowie Darmkrebs unter den dritthäufigsten Krebsarten (Robert-Koch-Institut - Zentrum für Krebsregisterdaten, 2020). Der Erkrankungsgipfel liegt bei etwa 55-60 Jahren. Nur weniger als 5% der Patientin sind jünger als 40 Jahre. (Herold, 2020)

1.2.2.2 Pathophysiologie

So wie bei der COPD steigt auch bei den Lungenkarzinomen mit zunehmenden Alter und stattgehabtem oder fortgesetztem Nikotinabusus die Wahrscheinlichkeit ein Lungenkarzinom zu entwickeln. Dabei sind vor allem das Ausmaß (Anzahl der Packungsjahre) und der Beginn

des Tabakrauchens von entscheidender Bedeutung. Auch wenn die Tabakabhängigkeit mit etwa 85% den größten Risikofaktor ausmacht, tragen auch berufliche Schadstoffexposition wie Asbest, Umwelteinflüsse und genetischen Faktoren zur Entstehung bei (Herold, 2020; Lorenz et al., 2009; Robert-Koch-Institut - Zentrum für Krebsregisterdaten, 2020).

In der Pathogenese zeigt sich, dass die karzinogenen Noxen zu genetischen Schäden führen. Diese Schädigungen betreffen vor allem Protoonkogene, wie die Gene der Rat sarcoma-(RAS)-Familie und das Myelocytomatose-(MYC)-Onkogen, sowie Tumorsuppressorgene wie p53, Deletionen auf dem kurzen Arm des Chromosoms 3 oder dem Retinoblastom-Protein-(RB)-Gen (Lorenz et al., 2009). Durch die Entartung der epithelialen Zellen mit zunehmender Ansammlung dieser molekularen Veränderungen entsteht über eine zum Teil Jahrzehnte andauernde Latenzzeit ein invasiv wachsendes Karzinom. Entsprechend ihrer Lage kann man sie in zentrale (hilusnahe), periphere oder diffus wachsende (bspw. das lepidisch wachsende Adenokarzinom) Lungenkarzinome unterteilen (Herold, 2020). Histologisch unterscheidet man zwischen den hauptsächlich Tabakrauch-assoziierten kleinzelligen (SCLC) und den nicht-kleinzelligen Karzinomen (NSCLC). Letztere werden des Weiteren histologisch in Adeno-, Plattenepithel- und großzellige Karzinome untergliedert (Herold, 2020; Lorenz et al., 2009). Seit einigen Jahren spielen in der Therapieplanung neben der Histomorphologie auch die Programmed Cell-Death Liganden 1-(PD-L1)-Expression sowie molekularpathologische Veränderungen mit Nachweis von Treibermutationen, insbesondere Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR), Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK), c-ros oncogene 1 (ROS1) sowie proto-oncogene B-Raf (BRAF), eine zunehmende Rolle und haben mittlerweile therapeutisch einen wichtigen Stellenwert erreicht.

Die verschiedenen histologischen Subtypen unterscheiden sich sowohl in ihrem lokal infiltrierenden Wachstum als auch in ihrem Metastasierungsverhalten. Dabei neigt vor allem das kleinzellige Lungenkarzinom bereits frühzeitig zur Metastasierung. Auch paraneoplastische Syndrome wie das Syndrom der inadäquaten AHD-Produktion (SIADH), Cushing-Syndrom oder ektope Produktion parathormonverwandter Peptide (PTHrP) mit nachfolgender Hyperkalziämie treten bei kleinzelligen Lungenkarzinomen besonders häufig auf (Herold, 2020).

1.2.2.3 Prognose und Screeningmöglichkeiten

Zu Erkrankungsbeginn ist das Lungenkarzinom klinisch meist unspezifisch oder asymptomatisch. Erst im Verlauf entstehen durch lokal infiltrierendes Wachstum oder Metastasierung entsprechende Symptome, sodass die Diagnose häufig erst in fortgeschrittenen Stadien gestellt und gesichert werden kann. Bei Erstdiagnose befinden sich mehr als 50% bereits in einem metastasierten und damit palliativem Stadium der Erkrankung. Der Anteil derer, die in einem frühen Stadium (Stadium I und II nach UICC) diagnostiziert

werden, liegt nur bei etwa 25%. Die 5-Jahresüberlebensrate sinkt mit Zunahme des Tumorstadiums rasch ab und lag 2016 im Schnitt bei 19 % (Frauen) bzw. 13 % (Männer) (Robert-Koch-Institut - Zentrum für Krebsregisterdaten, 2020).

Daher wurde in den letzten Jahren zunehmend über radiologische Screeninguntersuchungen bei Risikopatienten diskutiert und in größeren Studien (National Lung Screening Trial, DANTE-, MILD-, DLCST-Studie etc.) untersucht. Den positiven Aspekten einer Tumorfrüherkennung stehen nicht nur gesundheitsökonomische Aspekte, sondern auch Komplikationen einer vermehrten invasiven Abklärung letztendlich benignen Befunde gegenüber. Die Ergebnisse des National Lung Screening Trial (NLST) konnte eine signifikante relative Reduktion der Lungenkrebssterblichkeit um 20 % bei Risikopatienten durch eine jährliche Low-Dose-CT zeigen. In der 2018 aktualisierten S3-Leitlinie zur Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms wird daher eine Kann-Empfehlung zum Screening bei einem ausgewählten Patientengut mit erhöhtem Risiko ausgesprochen. Hierzu zählen Patienten zwischen 55 und 74 Jahren mit ≥ 30 Packungsjahren und weniger als 15 Jahren Nikotinkarenz. Auch für jüngere Personen (ab 50. Lebensjahr) mit ≥ 20 Packungsjahren kann bei Vorliegen eines weiteren Risikofaktors wie ein Lymphom oder Tabakrauch-assoziiertes Malignom (zum Beispiel Lungenkarzinom oder HNO-Malignom) in der Eigenanamnese, Lungenkarzinomerkrankungen in der Verwandtschaft, bekannter Asbestexposition, COPD oder Lungenfibrose ein CT-Screening erwogen werden (Leitlinienprogramm Onkologie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (AWMF) et al., 2018).

Aufgrund der o.g. Diskussionspunkte wäre auch hier ein kostengünstiges und Patientenschonendes Verfahren wie die Atemkondensatgewinnung als Screeningverfahren wünschenswert.

Ansatzpunkte der bisherigen Studien zur Atemkondensatmessung bei Lungenkrebspatienten basierten vordergründig auf dem Nachweis der auslösenden genetischen Veränderungen im Kondensat. Bei NSCLC-Patienten konnten vermehrte Mikrosatellitenveränderungen (Carpagnano et al., 2005) sowie p53-Mutationen im Atemkondensat (Gessner et al., 2004) nachgewiesen werden. Einige Mediatoren wie beispielsweise IL-6 stehen sogar in Relation zur Tumorausdehnung (G.E. Carpagnano et al., 2002). Dabei gibt es nicht nur Hinweise für eine Anwendung als Früherkennung, sondern auch zur Therapiekontrolle. Nachweisbare KRAS-Mutationen im EBC fielen signifikant nach kurativ intendierter Operation ab (Kordiak et al., 2012).

Sollte eine Etablierung der Atemkondensatmessung im pneumologischen Alltag möglich sein, geben diese Ergebnisse Hoffnung ein nicht-invasives und strahlenfreies Verfahren für Screening und Nachsorge des Lungenkarzinoms zur Verfügung zu haben.

1.3 Diagnostik von Atemwegsmaterialien

1.3.1 Bronchoalveoläre Lavage (BAL)

Bei der bronchoalveolären Lavage handelt es sich um invasiv mittels Bronchoskopie gewonnenes Atemwegsmaterial, welches vor allem der weiterführenden zytologischen, mikrobiologischen und laborchemischen Diagnostik dient.

Die bronchoalveoläre Lavage ist mittlerweile seit mehreren Jahrzehnten ein etabliertes Verfahren in der pneumologischen Diagnostik und hat vielfältige Einsatzmöglichkeiten wie zur gezielteren antibiotischen Behandlung beziehungsweise bei fehlendem Therapieansprechen zum mikrobiologischem Erregernachweis und der anschließend gezielten Therapieeskalation. Auch bei infiltrierend wachsenden malignen Befunden kann sie zur zytologischen Sicherung beitragen. Einen hohen Stellenwert hat die BAL auch in der Diagnostik interstitieller Lungenerkrankungen (Bauer et al., 2009; Khanavkar and Scherff, 2009; Tötsch et al., 2007).

Zur Durchführung einer BAL wird das Bronchoskop bis zur Lumenokklusion in den gewählten Segmentbronchus (Wedge-Position) eingebracht. Dabei wird bei generalisierten Lungenerkrankungen, wie beispielsweise interstitiellen Erkrankungen, das Lingula- oder Mittellappensegment aufgrund der besseren Recovery bevorzugt. Handelt es sich um Befunde, die isoliert ein Segment betreffen wie Infiltrate oder Herdbefunde, wird gezielt das zuführende Ostium gewählt. Über einen sterilen Katheter wird anschließend meist 60-120 ml Natrium-Chlorid (NaCl) -Lösung, zum Beispiel in 20-30 ml Portionen, instilliert und unter vorsichtigem Sog wieder aspiriert. Im Labor erfolgt die Aufarbeitung. Nach Abfiltrieren von Schleim wird die Lavage zentrifugiert und die absolute Zellzahl gemessen. Die Gesamtzellzahl wird immer in Bezug zur Lavage gesetzt und auch als Konzentration von Zellen pro Milliliter angegeben. Das ungefilterte Aspirat kann zur Erregerdiagnostik genutzt werden. Dabei liegt das Augenmerk nicht nur auf bakteriellen Infektionen, sondern auch auf dem Nachweis opportunistischer Erreger wie Pneumozystis jirovecii, Pilzen (v.a. Aspergillus) oder Viren (z.B. Zytomegalie- und Herpes-simplex-Virus). Insbesondere bei Immunsupprimierten können diese Erreger ursächlich für unklare Infektionen oder Infiltrationen sein. (Bauer et al., 2009; Khanavkar and Scherff, 2009; Tötsch et al., 2007)

Die Analyse der Lymphozytensubpopulationen und das Differentialzellbild sind wichtige Bausteine in der Diagnostik interstitieller Lungenerkrankung. Zur Standarddiagnostik werden CD3, CD4, CD8, CD20 sowie T-Zell-Aktivierungsmarker bestimmt. Besteht der Verdacht auf eine Langerhans-Zell-Histiozytose bietet sich zudem die Bestimmung von CD1a an (Bauer et al., 2009; Tötsch et al., 2007). Im Regelfall nehmen den größten Anteil an der Gesamtzellzahl die Alveolarmakrophagen mit etwa 80-90% ein, gefolgt von den Lymphozyten und Leukozyten. Eosinophile machen im Regelfall mit weniger als 1% die kleinste Fraktion aus. Bei Erkrankungen wie beispielsweise der chronisch eosinophilen Pneumonie sind die

Eosinophilen typischerweise deutlich erhöht. Bereits bei Rauchern verändert sich die Zellverteilung durch eine Zunahme der absoluten Zellzahl, welche vorrangig auf eine Vermehrung der Makrophagen zurückzuführen ist. Erkrankungen wie eine exogen allergische Alveolitis, eine eosinophile Pneumonie oder alveoläre Hämorrhagie sind bei normalen Zellbild weitgehend ausgeschlossen, während gewisse Veränderungen die Differentialdiagnose eingrenzen können. Ein erhöhter CD4/CD8-Quotient ist typisch für eine Sarkoidose, wohingegen niedrige Werte bei einer kryptogenen organisierenden Pneumonie (COP) zu beobachten sind. Eine Lymphozytose findet man zum Beispiel bei granulomatösen Erkrankungen (Bauer et al., 2009; Tötsch et al., 2007). Letztendlich erlaubt die BAL trotz bekannter Veränderungen der Zellverteilung nur eine Eingrenzung und muss immer im Kontext der übrigen Befunde interpretiert werden. Typische Veränderungen sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: BAL-Zellverteilung Aufteilung der BAL-Zellverteilung nach Nichtraucher, gesunde Raucher, Sarkoidose, exogen allergischer Alveolitis (EAA), idiopathischer Lungenfibrose (IPF), kryptogenen organisierenden Pneumonie (COP) und chronischer eosinophiler Pneumonie (CEP) (Tötsch et al., 2007)

	Nicht-Raucher	Gesunde Raucher	Sarkoidose	EAA	IPF	COP	CEP
Gesamt-Zellzahl (10⁶)	7 ± 3	23 ± 12	16 ± 17	34 ± 22	14 ± 11	14 ± 9	18 ± 22
Makrophagen (%)	92 ± 4	96 ± 3	55 ± 21	18 ± 10	66 ± 23	39 ± 19	27 ± 18
Lymphozyten (%)	7 ± 3	3 ± 2	41 ± 21	78 ± 10	15 ± 15	44 ± 19	22 ± 18
Neutrophile (%)	1 ± 1	1 ± 1	3 ± 5	2 ± 2	14 ± 16	10 ± 13	6 ± 6
Eosinophile (%)	0,1 ± 0,3	0,4 ± 0,6	1 ± 1	1 ± 1	5 ± 5	6 ± 8	46 ± 22
CD4/CD8-Rate	1,1 - 3,5	0,5 - 1,5	5 ± 5	1 ± 0,7	1,4 ± 1,4	0,6 ± 0,5	0,9 ± 0,6

Nicht nur die Zellverteilung, sondern bereits makroskopische Aspekte wie die zunehmenden Blutanteile bei einer alveolären Hämorrhagie oder die milchig trübe Verfärbung im Rahmen einer Alveolarproteinose können ausschlaggebend für eine Diagnosestellung sein (Bauer et al., 2009; Tötsch et al., 2007). Die BAL kann ebenso zur Sicherung bei malignen Erkrankungen, z.B. einer Lymphangiosis carcinomatosa herangezogen werden. In der zytologischen Untersuchung erfolgt eine weitere Differenzierung der malignen Zellen.

Das Komplikationsrisiko durch die BAL selbst ist gering und beträgt weniger als 5%. Den größten Anteil nimmt dabei mit ca. 2,5% postinterventionelles Fieber ein, welches jedoch in

aller Regel keiner antibiotischen Therapie bedarf. Seltener Komplikationen sind Pneumonitis (0,4%), Blutungen (0,7%) und Bronchospasmus (0,7 %), insbesondere bei bronchialer Hyperreagibilität (Strumpf et al., 1981). Zu berücksichtigen ist, dass bei bereits zuvor eingeschränkter Lungenfunktion und bekannter Gasaustauschstörung je nach instillierter Menge eine respiratorische Verschlechterung beobachtet werden kann.

1.3.2 Sputumdiagnostik

Als Sputum wird das aus der Tiefe hochgehustete und anschließend ausgespuckte Atemwegssekret bezeichnet. Es wird unterschieden zwischen Spontansputum und nach inhalativer Provokation mit 1,2 bis 3 %-iger Kochsalzlösung gewonnenem Sputum, auch als induziertes Sputum bezeichnet (Karg et al., 2018). Das Sputum enthält üblicherweise neben zellulären Elementen, exogene inhalierte Partikel, Mikroorganismen, aber auch Speichel oder Nasennebenhöhensekret. Die Sekretproduktion kann beim Gesunden bis 150 ml pro Tag betragen und bei verschiedenen Erkrankungen weiter zunehmen (Kroegel and Costabel, 2014). Typisch sind beispielsweise die als maulvolle Expektorationen bezeichneten Auswürfe bei Bronchiektasenerkrankungen.

Der Vorteil gegenüber der BAL besteht darin, dass es ohne invasive Diagnostik gewonnen werden kann. Demgegenüber stehen die zum Teil eingeschränkte Beurteilbarkeit aufgrund einer Sekret- oder Speichelkontamination, sowie die deutlich schmalere diagnostische Aussagekraft. Wie bei der BAL kann auch hier der makroskopische Befund (klar, blutig oder putride) schon Hinweise auf die Differentialdiagnose und so Hilfe bei der weiterführenden Diagnostik geben (Kroegel and Costabel, 2014). Einer der häufigsten Indikationen der Sputumdiagnostik ist die mikrobiologische Diagnostik zur Therapiesteuerung bei akuten Atemwegsinfektionen wie einer schweren Pneumonie oder bei Infektexazerbation einer chronischen Atemwegserkrankung. Zudem sind Sputumkontrollen Inhalt verschiedener Leitlinienempfehlungen, zum Beispiel im Rahmen der Tuberkulosedagnostik und Therapiekontrolle (Schaberg et al., 2017). Vor allem bei der Mukoviszidoseerkrankung sind Sputumkontrollen zum Monitoring einer häufig vorliegenden Pseudomonaskolonisation sinnvoll (Müller et al., 2015).

Entscheidend für die Qualität und damit Verwertbarkeit ist die Kontamination mit Zellen der Mund- und Rachenschleimhaut, welche sich nie vollständig vermeiden lässt. Gute Qualität besteht, wenn sich mehr als 25 Granulozyten und weniger als 25 Plattenepithelzellen pro Gesichtsfeld bei 1000-facher Vergrößerung nachweisen lassen (Kroegel and Costabel, 2014).

Insbesondere für zytologische Fragestellungen sollte auf induziertes Sputum zurückgegriffen werden, da hier die Lebensfähigkeit der Zellen im Vergleich zu spontanem Sputum erhöht ist (Bhowmik et al., 1998). Hierbei erfolgt nach Inhalation mit hypertoner Kochsalzlösung eine Asservation des Sputums (Leader of the Working Group: P.L. Paggiaro et al., 2002).

Neben zytologischen Untersuchungen konnten im induzierten Sputum bereits zahlreiche lösliche Marker wie das eosinophile kationische Protein (ECP) bei exazerbierten Asthmatikern (De La Fuente et al., 1999), verschiedene Zyto- und Chemokine aber auch Zytokinrezeptoren oder Proteasen nachgewiesen werden (Gessner, 2005). Myeloperoxidase (MPO) im induzierten Sputum korreliert nicht nur mit einer bestehenden COPD, sondern steigt zudem im Rahmen von Exazerbationen an (Zhu et al., 2014). Die Bestimmung dieser Parameter hat bis dato jedoch keinen Einzug in den Praxisalltag gefunden. Anzumerken sei außerdem, dass bei Asthmatikern die Gefahr einer Bronchokonstriktion besteht, sodass die Maßnahme nicht bei allen Patientengruppen uneingeschränkt empfohlen werden kann (Smith and Anderson, 1989).

1.3.3 Messung des fraktionierten exhalieren Stickstoffmonoxids (FeNO-Messung)

Risikoärmer als induziertes Sputum oder die BAL ist die Messung von flüchtigen Bestandteilen in der Expirationsluft. Die Analyse des Atems ist einer der einfachsten diagnostischen Methoden. Bereits ohne apparative Diagnostik können einige Veränderungen im Körperinneren wahrgenommen werden. Dazu zählen nicht nur Alkohol- und Tabakkonsum, sondern auch Veränderungen im Stoffwechsel, wie der fruchtige Acetongeruch im Rahmen einer diabetischen Ketoazidose (Herold, 2020; Schröder, 2006). Bereits 1971 fand Linus Pauling mittels Gaschromatographie über 250 leicht- und schwerflüchtige organische Substanzen (VOC – volatile organic compounds) (Pauling et al., 1971; Schröder, 2006). Durch modernere Verfahren ist die Anzahl der gefundenen VOCs auf mind. 3481 angestiegen (Phillips et al., 1999).

Die Untersuchung der Mediatoren in der Expirationsluft bietet Potential nicht-invasiv Einblick in intrapulmonale Prozesse zu bekommen, wird aber auch in anderen Fachdisziplinen zum Beispiel in der Gastroenterologie zur Therapiekontrolle einer Helicobacter-pylori-Eradikation mittels C13-Atemtest oder bei Verdacht auf eine Laktoseintoleranz als H2-Atemtest eingesetzt (Herold, 2020). Auch in der pneumologischen Praxis wird die Untersuchung von Mediatoren der Expirationsluft bereits angewendet. Die Fraktion des exhalieren Stickstoffmonoxids (FeNO) ist als noninvasiver Biomarker der Atemwegsinflammation Bestandteil der S2k-Leitlinie zur Diagnostik und Therapie von Patienten mit Asthma (Deutsche Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V. et al., 2017). Sie kann hilfreich sein eine Typ-2-dominierte Inflammation zur Therapieplanung zu identifizieren, eine Therapieadhärenz zu überprüfen oder den Bedarf zur Therapieeskalation zu identifizieren (Donohue and Jain, 2013; Dweik et al., 2011). Zudem wird zur Indikationsprüfung einer Therapie mit monoklonalen Antikörpern bei schwerem unkontrolliertem Asthma unter anderem die FeNO-Konzentration herangezogen. Ein Therapieversuch mit Dupilumab (Anti-IL4-Rezeptor-Antikörper) kann erwogen werden, wenn trotz optimaler Therapie eine Asthmakontrolle bei eosinophilem

Asthma mit zweimalig nachgewiesener Bluteosinophilie $>300/\mu\text{l}$ und FeNO-Konzentration >25 ppb nicht erreicht wird (Arzneimittelkommission Der Deutschen Apotheker (AMK) et al., 2018).

Die Detektion von ausgeatmetem Stickmonoxid (NO) ist über verschiedenen Verfahren möglich. Neben Chemilumineszenzmessungen, der Bestimmung von durch chemische Prozesse ausgesendetem Licht (Maier, 1990), ist auch ein laserbasierter oder elektrochemischer Nachweis möglich. In Abhängigkeit der verwendeten Messmethode sind die Geräte so handlich, dass ein Einsatz in der Praxis oder auch Häuslichkeit möglich ist (Maniscalco et al., 2016). Bisher bleibt diese Diagnostik jedoch vor allem auf pneumologische Praxen beschränkt.

1.3.4 Atemkondensat

Das Atemkondensat (Exhaled breath condensate, EBC) ist der in flüssiger Form vorliegende Anteil der Ausatemluft, also des Exhalates (Gessner, 2005). Mit der Atemkondensatmessung steht seit mehreren Jahren ein nicht-invasives Verfahren zur Verfügung mit welchem Material aus den tiefen Atemwegen gewonnen werden kann ohne den Patienten zu belasten.

Da bei der Atemkondensatsammlung lediglich eine normale Ruheatmung benötigt wird und keine forcierten Atemmanöver erfolgen, kann die Untersuchung fast von jedem Patienten durchgeführt werden. Es bestehen keine relevanten Kontraindikationen. Selbst bei einer beatmungspflichtigen respiratorischen Insuffizienz ist eine Zwischenschaltung prinzipiell möglich (Carpenter et al., 1998). Untersuchungen wie Bronchoskopien mit BAL oder bronchiale Provokationstests sollten unmittelbar vor der Atemkondensatgewinnung vermieden werden, um einen möglichen Einfluss auf das Ergebnis zu vermeiden. Durch die Nichtinvasivität ist es eine ideale Matrix für wiederholte Untersuchungen von bestimmten Biomarkern. Somit kann zum Beispiel der zeitliche Verlauf einer entzündlichen Reaktion beurteilt und pathophysiologische Prozesse untersucht werden (Hoffmeyer et al., 2009). Zudem gibt es Ansätze zur Tumorfriherkennung und –nachsorge (G.E. Carpagnano et al., 2002; Carpagnano et al., 2005; Gessner et al., 2004; Kordiak et al., 2012), aber auch zur Vermeidung von mechanischem Stress durch Beatmung bei ARDS (acute respiratory distress syndrome) (Gessner et al., 2006) .

Um 1-2 ml Kondensat zu erhalten, müssen im Schnitt (je nach Patient und Gerät) etwa 10-15 Minuten Untersuchungszeit eingeplant werden. Dies erscheint im Vergleich zu anderen nicht-invasiven Verfahren wie der Bodyplethysmographie für den klinischen Alltag etwas zeitintensiver. Wird die Untersuchung jedoch auf wenige Zielparameter beschränkt, so reichen bereits geringere Mengen aus, wodurch die Untersuchungszeit auch verkürzt werden kann.

1.3.4.1 Entstehung und Zusammensetzung des Atemkondensats

Die Atemkondensatgewinnung beruht auf dem Prinzip der Kondensation. Dies bezeichnet den Übergang eines Stoffes vom gasförmigen in den flüssigen Aggregatzustand und ist abhängig von Druck und Temperatur. Die Atemkondensat-Sammelgeräte arbeiten vor allem mit Temperaturreduktion (Felixberger, 2017). Der Wasseranteil der Ausatemluft kondensiert im Falle der Atemkondensatmessung an einer gekühlten Oberfläche, die im Falle kommerzieller Systeme meist in Form eines Sammelbehälters oder Schlauches gestaltet ist. Das gesammelte Kondensat kann anschließend weiter untersucht und differenziert werden.

Das Atemkondensat besteht hauptsächlich aus Wasser. Daneben finden sich weitere chemische und biochemische Bestandteile, die Rückschlüsse auf die Aktivierung der Zellen in den Atemwegen gestatten. Diese Bestandteile gelangen in das Kondensat durch verschiedene Mechanismen, abhängig ist dies von ihrem physikalischem Zustand und chemischen Besonderheiten. Gasförmige Substanzen lösen sich im Wasseranteil und weitere molekulare Stoffe, deren Siedepunkt niedriger ist als Wasser, verdampfen. Der gasförmige Anteil enthält u.a. flüchtige Substanzen wie Stickoxid, Kohlenmonoxid und Kohlenwasserstoff (Gessner, 2005). Ein dritter Anteil nimmt die Aerosolfraktion ein, in welcher man sowohl flüchtige als auch nicht-flüchtige Bestandteile findet. Eingeschlossen sind in dieser Fraktion größere Moleküle wie Proteine, aber auch DNA-Bestandteile. Sie stammen aus dem „epithelial lining fluid“, der extrazellulären Flüssigkeit, welche die Oberfläche der Atemwegen und Alveolen bedeckt und gelangen als Aerosol in das Atemkondensat (McCafferty et al., 2004; Mutlu et al., 2001). Insbesondere Proteine und DNA-Material sind Mittelpunkt aktueller klinischer und laborchemischer Untersuchungen und geben Hoffnung hier eine nicht-invasive Methode beispielweise zur Krebsfrüherkennung zur Verfügung zu haben (G.E. Carpagnano et al., 2002; Carpagnano et al., 2005; Gessner et al., 2004).

Bei der Gewinnung und Interpretation des Atemkondensates muss auch ein Fokus auf den Ursprungsort der EBC-Bestandteile gelegt werden. Der Nachweis von Surfactant im Kondensat lässt vermuten, dass EBC-Bestandteile den Alveolen entstammen (Simpson et al., 2005). Weiterführende Untersuchungen erfolgten u.a. anhand der Chlorkonzentration im Atemkondensat. Unter der Annahme mehr Alveolen zu rekrutieren kann durch den Einbau eines geringen Atemwegswiderstandes die EBC-Ausbeute gesteigert werden, während die Chlorkonzentration unbeeinträchtigt bleibt. Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass einige Bestandteile, beispielsweise Chlor nicht aus den Alveolen, sondern anderen Atemwegsabschnitten stammen (Davidsson et al., 2005). Auch Ammoniak scheint zu einem Großteil aus dem Nasopharynx zu stammen, da dessen Konzentrationen in Proben, welche direkt über ein Tracheostoma gewonnen wurden, deutlich niedriger lagen, als jene im normal gewonnenen Atemkondensat (Vass et al., 2003). Der größte Anteil des Atemkondensates

scheint aber nachweislich aus den zentralen Atemwegen zu stammen (Bondesson et al., 2009).

Die Menge der Partikel, die in der Ausatemluft nachgewiesen werden können, variieren von <0.1 bis ~ 4 Partikel/cm³ und ist abhängig von den Patienten sowie deren körperlicher Belastung und Atemfrequenz. Die Konzentration der Partikel im Atemkondensat ist in Ruhe am geringsten und steigt während Belastungen mit steigender Atemfrequenz an (Fairchild and Stampfer, 1987; Gessner, 2005).

1.3.4.2 Einflussfaktoren bei der Atemkondensatgewinnung

Mehrere Faktoren beeinflussen die Atemkondensatgewinnung und erschweren so eine Standardisierung dieser Methode. Es existieren sowohl Einflüsse durch den Patienten selbst, als auch durch das Sammelgerät. Die Aerosolentstehung ist aktuell noch nicht vollständig verstanden, sodass nicht abschließend geklärt ist wie das Atemmuster, Flussgeschwindigkeiten und anderes Einfluss nehmen. In Atemkondensatstudien zeigte sich, dass es keinen Zusammenhang zwischen Lungenfunktionseinschränkungen bei FEV₁, Totaler Lungenkapazität (TLC), Residualvolumen (RV), Forcierter Vitalkapazität (FVC) oder dem Atemwegwiderstand und dem Kondensatvolumen zu geben scheint. Patientenspezifische Werte wie Körpergröße und –gewicht können die Kondensatbildung ebenso nicht beeinflussen. Jedoch ergibt sich eine klare Korrelation zum ventilierten Volumen (Gessner et al., 2001).

Auch wenn mittlerweile die ursprünglich selbstgebauten Systeme mit Eiswasser kommerziellen Geräten gewichen sind, unterscheiden sich diese weiterhin in ihrem Aufbau zum Teil deutlich voneinander. Selbst die verwendete Kühltemperatur variiert von Gerät zu Gerät. Während der EcoScreen der Firma Jaeger mit einer Kühltemperatur um -30 °C (Erich Jaeger GmbH, 1999) arbeitet, kann die Temperatur des DECCS-Systems der Firma Medivac zwischen -10.5 bis $+10$ °C eingestellt werden (Medivac, 2009). Das R-Tube-System der Firma Respiratory Research wiederum ist zur Anwendung in der Häuslichkeit gedacht und wird durch einen metallischen Mantel gekühlt, der zuvor im Gefrierschrank aufbewahrt wurde und so dessen Temperatur annimmt. Durch die fehlende aktive Kühlung erwärmt sich der Kühlmantel jedoch über die Zeit der Durchführung und kann so keine anhaltend vergleichbare Kondensatgewinnung gewährleisten (Respiratory Research, 2019).

Die Distanz zwischen Mundstück und Kondensator hat Einfluss auf die Effektivität, wobei dies nicht für alle Bestandteile gleich gilt. Verkürzt man das Schlauchsystem und reduziert so den Totraum kann eine größere Recovery für Ammonium erreicht werden, während der Natriumwert annähernd gleich bleibt (Mutlu et al., 2001).

Ein wichtiger Einflussfaktor ist außerdem die Kontaktzeit und –fläche. Dies war ein Nachteil des Cryocond-Systems (MediUm-SENSOR, Berlin), bei welchem die Probe auf einer

gekühlten Platte kondensiert und so nur eine geringe Menge Kondensat gewonnen werden konnte (Gessner, 2005). Aber auch Atemkondensatsysteme, welche mit Sammelrohren arbeiten wie der R-Tube (Respiratory Research), der EcoScreen (Jaeger) oder das Anacon-System (Biostec, Valencia, Spanien) haben durch ihren Aufbau unterschiedlich viel Fläche zur Kondensation zur Verfügung. Beim R-Tube ist das Ein- und Ausatemventil an beiden Enden des Tubes angebracht, sodass die Luft den Sammelbehälter nur einmal durchströmt (Respiratory Research, 2019). Hierdurch ist die Kontaktzeit kürzer als beispielsweise beim EcoScreen. Bei diesem ist der Tube doppelläufig, sodass die Luft zweimal – nämlich zunächst durch den inneren Teil und anschließend durch den äußeren Bereich wieder hinaus – geleitet wird. Insgesamt zeigen sich hierdurch Unterschiede in der Gewinnung des Atemkondensats.

Auch die Materialien der Sammelbehälter reichen von Glas (Anacon) über Polypropylen (R-Tube) bis hin zu Metall mit Teflonbeschichtung (EcoScreen) und beeinflussen durch die unterschiedlichen Oberflächen das Kondensationsverhalten (Liu et al., 2007; Rosias et al., 2006).

Obwohl die meisten Geräte eine Speichelfalle integriert haben, wird eine mögliche Verunreinigung mit Speichel immer wieder diskutiert. Häufig wird deshalb Amylase als Parameter einer Kontamination empfohlen (Zweifel et al., 2013). Allerdings können erhöhte Amylasewerte auch mit Erkrankungen wie Asbestosen assoziiert sein (Bégin et al., 1986).

1.3.4.3 EBC-Bestandteile und ihre Einsatzfähigkeit

Das Atemkondensat besteht aus über 250 leicht- und schwerflüchtigen gasförmigen Substanzen (Pauling et al., 1971), sodass sich ein großes Spektrum an möglichen Untersuchungsparametern ergibt, deren Bedeutung im Rahmen von Atemwegserkrankungen in Studien untersucht wird.

pH-Wert

Es gibt Hinweise, dass der pH der EBC-Proben mit invasiv entnommenen Proben aus den unteren Atemwegen korreliert (Hunt et al., 2000; Vaughan et al., 2003) und die lokale Entzündung widerspiegelt (Gessner et al., 2003). Niedrigere pH-Werte finden sich bei COPD, Bronchiektasenerkrankungen oder schwerem Asthma (Hunt et al., 2000; Kostikas et al., 2002; Leung et al., 2006; Papaioannou et al., 2011). Für Asthma bronchiale und die chronisch obstruktive Lungenerkrankung konnte zudem eine Korrelation mit der Krankheitsschwere nachgewiesen werden (Leung et al., 2006; Papaioannou et al., 2011). Der erniedrigte EBC-pH im Rahmen einer Asthma-Exazerbation kann durch eine orale oder inhalative Glukokortikoidtherapie angehoben werden (Hunt et al., 2000). Zudem besteht eine Korrelation zwischen niedrigem pH und Markern des oxidativen Stress, der Neutrophilen- sowie Eosinophilenzahl im Sputum sowie Scores der Lungenschädigung wie dem Horovitz-Index ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$) und indirekt mit dem lung injury severity (LISS)-Score (Gessner et al., 2003). Eine

Kolonisation mit *Pseudomonas aeruginosa* hat einen relevanten Einfluss auf den Atemkondensat-pH (Kostikas et al., 2002) und bietet somit die Möglichkeit Hinweise auf eine behandlungsbedürftige Kolonisationen auch nicht-invasiv zu entdecken beziehungsweise den Therapieerfolg zu protokollieren.

Proteingehalt

Die Untersuchung des Proteingehaltes (Proteom) des Atemkondensats könnte als nicht-invasive Methode zur Entdeckung und Analyse von Biomarkern verschiedener Erkrankungen wie COPD, Alpha-1-Antitrypsin-Mangel (Fumagalli et al., 2012) und Lungenkrebs (López-Sánchez et al., 2017) dienen. Mittels Flüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie konnten über 140 Proteine im Atemkondensat differenziert werden (Lacombe et al., 2018). Es finden sich unter anderem Surfactant-Proteine, verschiedenen Cytokeratine, deren Ursprung möglicherweise nicht alleinig im Bronchialsystem zu finden ist (Hoffmann et al., 2008), Hämoglobin-Untereinheiten (Kireeva et al., 2012), Alpha-1-Antitrypsin, mehrere entzündliche Zytokine (unter anderem Interleukin (IL)-1 α , IL-1 β , IL-2; IL-12-, IL-15, Interferon α und γ , Tumornekrosefaktor α) und Komplement C3 (Fumagalli et al., 2012) sowie weitere Proteine. Gegenstand der aktuellen Forschung ist die weitere Differenzierung des Atemkondensat-Proteoms. Zumeist finden sich signalisierende und regulierende (34%) sowie strukturelle (33%) Proteine, gefolgt von proinflammatorischen Proteinen (24%), Transferproteinen (6%) und Enzymen (3%). Bei Lungenerkrankungen wie COPD oder Alpha-1-Antitrypsin-Mangel verschiebt sich das Verhältnis zugunsten der Zytokine. Daher bietet das Proteom auch Potential für eine weitere Krankheitsdifferenzierung. In Studien ließ sich Lysozym C nur bei Patienten mit Alpha-1-Antitrypsin-Mangel und bestehendem Emphysem nachweisen. Bestimmte Zytokine finden sich vor allem bei Lungenerkrankungen, zum Beispiel Interferon α 1 und IL-12 bei COPD oder IL-1 bei Alpha-1-Antitrypsinmangel (Fumagalli et al., 2012). Es gibt sogar Hinweise darauf, dass IL-6 mit dem Tumorstadium bei NSCLC korreliert (G.E. Carpagnano et al., 2002). Ähnlich wie andere Mediatoren findet sich im Rahmen einer COPD-Exazerbation ein Anstieg bestimmter Zytokine im Atemkondensat mit nachweisbarem Abfall unter Therapie (Gessner et al., 2005).

Auch für die Gesamtproteinkonzentration lassen sich krankheitsspezifische Variabilitäten nachweisen. Erhöhte Proteinwerte können Erkrankungen wie einem Alpha-1-Antitrypsin-Mangel zugeschrieben werden (Fumagalli et al., 2008). Zudem sind erhöhte Proteinkonzentrationen bei Rauchern beschrieben, erhöhen sich aber nicht weiter nach dem Konsum einer Zigarette (Garey et al., 2004).

Stickoxid- und Nitritkonzentration

Als ein weiterer häufig untersuchter Parameter gilt die Nitritkonzentration des Atemkondensates, welche gut mit den Nitritwerten der BAL korreliert (Gessner et al., 2006).

Erhöhte Nitritwerte finden sich bei Atemwegserkrankungen wie Asthma bronchiale (Hunt et al., 2000) und Mukoviszidose (Corradi et al., 2001; Francoeur and Denis, 1995). Sie korrelieren mit Entzündungsparametern wie Neutrophilen und Leukozyten (Ho et al., 1998), Wasserstoffperoxid im EBC (Ganas et al., 2001) sowie mit mechanischem Stress bei ARDS (Gessner et al., 2006). Unter einer ICS-Therapie (inhalatives Corticosteroid) ist eine Abnahme der Nitritkonzentration bei Asthmatikern zu verzeichnen. Widersprüchliche Ergebnisse finden sich im Aspekt des Tabakrauchens. Während Nitrit in niedrigeren Konzentrationen bei rauchenden Asthmatikern im Vergleich mit nichtrauchenden Asthmatikern (Ganas et al., 2001) gefunden wurde, fanden sich bei Lungengesunden Rauchern zum Teil gleiche oder erhöhte Werte gegenüber den Nichtrauchern (Corradi et al., 2001; Garey et al., 2004).

Stickstoffmonoxid (NO), welches durch Reaktion mit Sauerstoff und Zersetzung von Peroxynitrat zu Nitrit und Nitrat umgewandelt wird (Ahmadzai et al., 2013), spielt eine wichtige Rolle bei Entzündungen und der Tonusregulation der glatten Muskulatur (Grob et al., 2008). Es finden sich erhöhte Werte bei atopischem Asthma und eine Korrelation mit Entzündungsparametern. Im Gegensatz dazu sind reduzierte Werte bei zystischer Fibrose (CF) und primärer ziliärer Dyskinesie beschrieben (Kharitonov and Barnes, 2002).

Weitere Atemkondensatparameter und mögliche Anwendungsbereiche

Viele weitere Parameter des Atemkondensates können mit unterschiedlichen Erkrankungen assoziiert sein. Dazu zählt unter anderem 8-Isoprostan als Marker des oxidativen Stresses. Erhöhte Werte finden sich nicht nur bei unmittelbar pulmonalen Erkrankungen wie Mukoviszidose (Paolo Montuschi et al., 2000) und Asthma (Antczak et al., 2002; Baraldi et al., 2003), sondern können auch mit Tabakrauch (P. Montuschi et al., 2000) oder obstruktiven Schlafapnoesyndrom (Giovanna E. Carpagnano et al., 2002) in Verbindung gebracht werden.

Wasserstoffperoxid wird im Rahmen von Atemwegsentzündungen sowie bei oxidativem Stress freigesetzt. Erhöhte Werte im Atemkondensat lassen sich bei verschiedenen Lungenerkrankungen, wie Asthma, COPD, Bronchiektasen und ARDS, aber auch nach thoraxchirurgischen Eingriffen (Dekhuijzen et al., 1996; Kietzmann et al., 1993; Loukides et al., 1998; Teng et al., 2011) nachweisen.

Auch Leukotriene können im Atemkondensat untersucht und nachgewiesen werden. Sie spielen eine Rolle in der Pathophysiologie von Atemwegserkrankungen. Zudem korrelieren sie wie Isoprostan mit erhöhtem oxidativen Stress. Es finden sich erhöhte Leukotrien B₄ (LTB₄)-Werte im Atemkondensat von Asthma-, COPD- und Mukoviszidose-Patienten sowie nach thoraxchirurgischen Eingriffen (Barreto et al., 2009; Cáp et al., 2004; Carpagnano et al., 2003; Kostikas et al., 2002; Moloney et al., 2004; Paolo Montuschi et al., 2000).

Einige Parameter, wie Wasserstoffperoxid (Antczak et al., 2000; Dohlman et al., 1993), Nitrit (Ganas et al., 2001) und Adenosin (Huszár et al., 2002) können eine Dynamik im Rahmen

einer Asthmaexazerbation mit Besserung unter Therapie zugeschrieben werden. In der klinischen Anwendung könnten diese Werte gut zur Detektion von Exazerbationen und Therapiekontrolle angewendet werden.

Ein reizvolles und angestrebtes Einsatzgebiet der Atemkondensatmessung wäre eine nicht-invasive Tumorfrüherkennung bei Risikopatienten. Zytokine zeigen einen Anstieg je weiter die Ausdehnung des Lungenkarzinoms vorangeschritten ist (G.E. Carpagnano et al., 2002). Zudem lassen sich bei Tumorpatienten vermehrt Mikrosatellitenveränderungen detektieren (Carpagnano et al., 2005). Mutiertes KRAS ist nicht nur bei nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (NSCLC) erhöht (Kordiak et al., 2019), sondern fällt auch relevant nach einer kurativ-intendierten Operation (Kordiak et al., 2012), sodass sich hier auch eine Einsatzmöglichkeit in der Nachsorge ergibt.

2 Fragestellung

Auch wenn sich anhand der bisherigen Untersuchungen vielfältige Einsatzmöglichkeiten von Atemkondensatmessungen ergeben haben, muss die Methode einen gewissen Standard erfüllen und vor allem reproduzierbare Ergebnisse liefern, um sich im Praxisalltag durchzusetzen.

Wie bereits erwähnt, bietet die Industrie eine große Auswahl an Systemen zur Gewinnung von Atemkondensat. Und so wundert es nicht, dass auch die bisherigen Studien mit verschiedensten Geräten erfolgten. Doch zwischen Ihnen bestehen zum Teil erhebliche Unterschiede, die möglicherweise einen entscheidenden Einfluss auf die Messergebnisse nehmen können.

Das betrifft einen zum Teil sehr differenten Aufbau der Geräte, in welchem sich allein die Schlauchsysteme in Länge, Material und Durchmesser unterscheiden. Aber auch für die Sammelbehälter verwenden die Hersteller unterschiedliche Materialien, Oberflächen und Bauarten. Ebenso variiert die Temperatur, bei der die Atemkondensatgewinnung erfolgt.

Im Hinblick auf diese erheblichen baulichen Unterschiede ergibt sich die Frage, inwieweit diese Einfluss auf das Gewinnen bestimmter Parameter haben können bzw. ob man an unterschiedlichen Systemen vergleichbare Ergebnisse erhalten kann. Während zum Beispiel die Ergebnisse der bronchoalveolären Lavage unabhängig vom verwendeten Bronchoskop oder BAL-Katheter interpretierbar sind (Bauer et al., 2009; Davidson et al., 2020; Tötsch et al., 2007), muss noch bewiesen werden, ob dies auch für das Atemkondensat gilt. Lassen sich die bisherigen Studienergebnisse von einem Gerät auf das andere übertragen? Erst wenn eine Standardisierung gegeben ist, lassen sich Normwerte festlegen und würden so einen breiten Einsatz in der Diagnostik ermöglichen.

Ziel der Arbeit war es daher zwei unterschiedliche Systeme zur Atemkondensatgewinnung anhand bereits untersuchter Parameter zu vergleichen.

Als Referenzgerät gilt das EcoScreen-System der Firma Jaeger, welches bereits in multiplen Studien mit o.g. Parametern zum Einsatz kam (Antus et al., 2010; Czebe et al., 2008; Gessner, 2005; Liu et al., 2007; McCafferty et al., 2004; Papaioannou et al., 2011). Für den Vergleich wurde ein zweites Atemkondensatgerät gewählt, dass aufgrund der Größe praktikabler im Einsatz wäre und sich durch den Aufbau deutlich vom EcoScreen-Gerät unterscheidet. Die beiden Geräte arbeiten bei unterschiedlichen Temperaturen (-30°C bzw. -5,5°C) mit unterschiedlichen Kühlsystemen, haben differente Materialien (Metall bzw. Kunststoff) und Schlauchsysteme.

Folgende Fragen sollen bei diesen vergleichenden Untersuchungen in den beiden Sammelsystemen beantwortet werden:

1. Gibt es Unterschiede in der Menge des gesammelten Kondensates
2. Ist der pH-Wert ähnlich und kann man anhand der Ergebnisse zwischen Gesunden und Lungenkranken unterscheiden
3. Gibt es Unterschiede im Nitritgehalt und lässt sich dieser mit einem Krankheitsbild korrelieren?
4. Lässt sich ausreichend Protein sowie DNA für weitere spätere Untersuchungen sammeln und gibt es Unterschiede in der Proteinkonzentration?
5. Führen Veränderungen an einem Sammelsystem zu Veränderungen in der Kondensatmenge und -zusammensetzung?

Die Beantwortung dieser Fragen soll mithelfen, die Standardisierung beim Sammeln von Atemkondensat zu verbessern und damit den Einzug dieser nicht-invasiven Messmethode mit ihren vielfältigen Einsatzgebieten in die klinische Praxis näher rücken zu lassen.

3 Material und Methoden

3.1 Probanden/Patienten

Für diese Arbeit wurden insgesamt 10 gesunde Probanden und 38 Patienten mit Lungenkarzinom und COPD untersucht (20 Lungenkarzinom-Patienten, 18 COPD- Patienten).

Die Patienten befanden sich zum Zeitpunkt der Untersuchung in stationärer Behandlung bei COPD-Exazerbation, zur Diagnosesicherung oder Chemotherapie bei Lungenkarzinom.

Die Durchführung war bei beiden Geräten sowohl für Patienten als auch Probanden gleich. Um eine Nasenatmung zu verhindern, erhielten alle Personen eine Nasenklemme. An jedem Gerät erfolgte eine Sammelphase von je 2x 10 Minuten. Die Untersuchung fand dabei immer am gleichen Tag, nur unterbrochen von einer kurzen Pause, statt. So kann davon ausgegangen werden, dass für beide Geräte gleiche Bedingungen in den Atemwegen herrschten.

Nach Abschluss der Sammelphase erfolgte zügig die Bestimmung des pH-Wertes und des Volumens. Anschließend wurden die Proben bei -80°C verwahrt und erst für die weiteren Untersuchungen wieder aufgetaut.

3.2 Atemkondensat-Systeme

In dieser Studie wurden zwei unterschiedliche Systeme zur Gewinnung von Atemkondensat verwendet (EcoScreen und TURBO DECCS). Das EcoScreen System wurde bereits in verschiedenen Studien verwendet und hat bereits bewiesen, dass es signifikante Ergebnisse, zum Beispiel beim Nachweis des p53-Exon von NSCLC-Patienten (Gessner, 2005), liefern kann. Hierdurch bietet sich das EcoScreen gut zum Vergleich mit einem anderen System an. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist auch, dass die Produktion des EcoScreen Systems eingestellt wurde. Damit stellt sich die Frage, ob sich die bisherigen Ergebnisse auf andere Systeme zur Atemkondensatgewinnung übertragen lassen.

Der Vergleich in dieser Studie erfolgte mit dem TURBO DECCS System, welches sich bereits auf den ersten Blick durch die Größe und Praktikabilität, aber auch durch Aufbau und Material, unterscheidet.

3.2.1 EcoScreen

Der EcoScreen der Firma Jaeger besteht aus der Kühlmaschine, die über ein Schlauchsystem mit der Kühlmanschette verbunden ist. Darin befindet sich der metallische Sammeltube, an dem über ein Ein- und Ausatemventil das Mundstück befestigt ist.



Abbildung 1: EcoScreen – Atemkondensator der Firma Jaeger

(Erich Jaeger GmbH, 1999)

Die Sammeleinheit selbst besteht aus biologisch inertem sowie kälterestentem Material mit einer Teflonbeschichtung. Das Probensammelrohr ist dabei doppelwandig aufgebaut, so dass die Luft zunächst durch den Kern des Rohres bis zum Boden mit dem dort angebrachten Sammelgefäß strömt. Dort findet ein Richtungswechsel statt und die Luft strömt am äußeren Teil des Rohres wieder zurück. Dieser ist mit mehreren Lamellen versehen, um eine größere Oberfläche zu erzeugen. Durch diesen Aufbau kann sowohl eine Flussminderung mit Erhöhung der Durchflusszeit als auch eine Vergrößerung der Kontaktfläche erreicht werden. Mittels Gegenstromprinzip erfolgt eine Abkühlung auf -30 C° (Erich Jaeger GmbH, 1999). Hierdurch kann das Atemkondensat an der Oberfläche des Sammelrohres gefrieren. Zudem sammelt sich ein Teil bereits direkt im Sammelgefäß am unteren Teil des Rohres. Nach einer kurzen Abtauphase kann das vollständige Kondensat aus diesem gewonnen werden

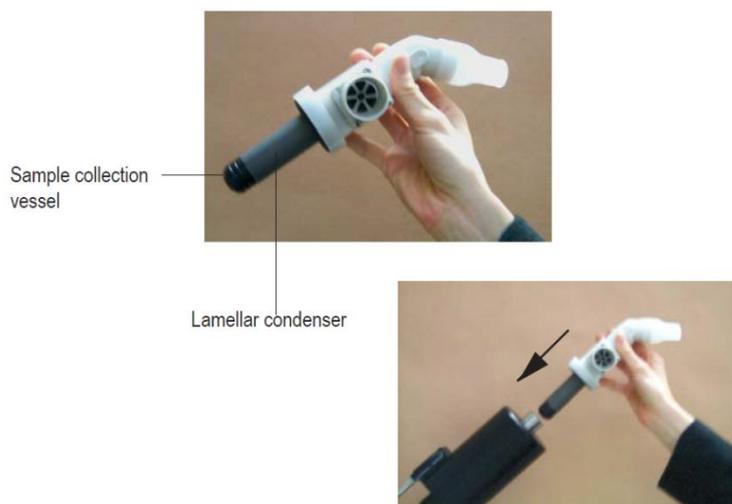


Abbildung 2: Sammeleinheit des EcoScreens

(Erich Jaeger GmbH, 1999)

3.2.2 TURBO DECCS

Die Firma Medivac hat das TURBO ("Transportable Unit for Research and Biomarkers Obtained from") DECCS System auf den Markt gebracht. Dieses Gerät ist mit den Maßen von 16 x 19 x 30 cm deutlich handlicher und kann damit auch als transportables Gerät genutzt werden. Hierdurch ist der Einsatz auch direkt am Patientenbett möglich.

Im Gegensatz zum Konkurrenzprodukt von Jaeger ist die Sammeleinheit samt zugehörigem Schlauchsystem ein Einmalprodukt und soll so bakterielle Kontamination sowie aufwendige Reinigungsverfahren vermeiden. Die Kühlung des Tubes erfolgt thermoelektrisch. Grundlage hierfür ist der Peltier-Effekt. In einem Peltier-Element befinden sich an Gleichstrom angeschlossene Halbleiter, wodurch eine Temperaturdifferenz zwischen Anode und Kathode entsteht. Um eine Abkühlung gegenüber der Umgebung zu gewährleisten, wird die entstandene Wärme abgeleitet. (Rossmann, 2014). Der Tube befindet sich in einem Aluminiumblock, welcher von einem Metallgehäuse zur Isolation umgeben ist.

Die Zieltemperatur kann im Bereich von -10.5 bis +10 °C gewählt werden. Die Standardeinstellung beträgt -5.5 °C. (Medivac, 2009)



Abbildung 3: Aufbau und Sammeleinheit des TURBO DECCS – Atemkondensator der Firma Medivac

(Konstantinidi et al., 2015)

Das Sammelsystem selbst besteht aus Kunststoff (Polyethylen oder Polypropylen) (Medivac, 2009). Das Mundstück ist mittels T-Adapter an ein ca. 20 cm langes Schlauchsystem angeschlossen. Hierdurch wird die Luft in den Tube geleitet, welcher im Aluminiumblock auf die voreingestellte Temperatur abgekühlt wird. An der unteren Seite des T-Stücks befinden sich das Einatemventil und die Speichelfalle, wodurch Kontaminationen vermieden werden. Aus dem Deckel des Tubes wird die Atemluft dann durch einen zweiten Schlauch wieder abgeleitet. Hier können im Bedarfsfall weitere Sammeleinheiten in Reihe angeschlossen werden. Im Gegensatz zum EcoScreen sind im Tube keine weiteren Lamellen angebracht.

Nach Abschluss der Sammelphase kann das Schlauchsystem entfernt und der Tube direkt verschlossen werden. Ein Umpipettieren ist nicht zwangsläufig notwendig, kann aber auch aus Platzgründen sinnvoll sein. Ein kurzes Zentrifugieren des Tubes bietet sich an, damit sich das gesamte Exhalat am Boden sammeln kann.

3.3 Parameterbestimmung

Da es in dieser Arbeit um den Vergleich zweier Atemkondensatsysteme geht, wurden Parameter gewählt, die in verschiedenen Studien ihren Stellenwert in der Atemkondensatmessung bewiesen haben.

Untersucht wurden direkt im Anschluss an die Kondensatgewinnung der pH sowie das Kondensatvolumen. Nachdem die Proben aller Probanden und Patienten gesammelt wurden, wurden Amylase als Parameter einer Speichelverunreinigung, Protein und Nitrit bestimmt. Zudem wurde mittels PCR die Frage der DNA-Nachweisbarkeit im Atemkondensat untersucht, welche eine Grundvoraussetzung einer Tumordiagnostik wäre.

3.3.1 Materialien

3.3.1.1 Geräte

Bezeichnung	Herstellerfirma
Agagel Maxi/Mini	Biometra GmbH
Elektrophoreseeinheit	
Elektrophoresis Power Supply-EPS600	Pharmacia Biotech
Molecular Imager	Bio-Rad
Gel DOC XR+ Imaging System	
MyiQTM Single-Color Real-Time PCR Detection System Bio Rad	Bio-Rad
Blutgasanalysegerät ABL 700	Radiometer
Spectra Classic Plate Reader	Tecan
Spectrometer basic	Eppendorf
Thermal Cycler MJMini	Bio-Rad
Vortexer	Scientific-Industries
Waage BP121S	Sartorius
Zentrifuge Rotine 46R	Hettich
Zentrifuge Biofuge pico	Kendro

3.3.1.2 Computersoftware

Software	Herstellerfirma
easyWin fitting V6.0a	Tecan
Image Lab 5.1	Biorad
SigmaPlot 13	Systat Software

3.3.1.3 Reagenzien und Chemikalien

Bezeichnung	Herstellerfirma
Actin 3/4-Primer	Thermo Fisher Scientific
Agarose	Serva
Aqua dest.	B.Braun
BCA-Micro-Protein-Assay	Thermo Scientific, Product No. 23235, Fisher Scientific Schweiz
Bromphenolblaupuffer	Sigma-Aldrich®
β-Amylase aus Gerste	SIGMA A-7130
dTNPs	Thermo Fisher Scientific
EnzChek Ultra Amylase Assay Kit	Thermo Scientific, Fisher Scientific Schweiz, E33651
Griess-Reagenz I (N-Naphthylethylendiamin)	Sigma-Aldrich®
Griess-Reagenz II (Sulfanilamid)	Sigma-Aldrich®
MgCl ₂	Sigma-Aldrich®
NaCl 0,9%	B.Braun
PBS.Puffer	Invitrogen™
10xReaktionspuffer	Thermo Fisher Scientific
Taq-Polymerase	Thermo Fisher Scientific

3.3.2 pH-Messung

Die Bestimmung des pH-Wertes erfolgte unmittelbar im Anschluss an die Sammelphase an einem Blutgasanalysegerät (Radiometer ABL700). Die Messung erfolgt mittels Potenziometrie.

Hierbei handelt es sich um eine elektrochemische Analysemethode, die die Konzentrationsabhängigkeit der Potenzialdifferenz zwischen einer Referenzelektrode und einer Messelektrode nutzt. (Arndt and Gressner, 2013)

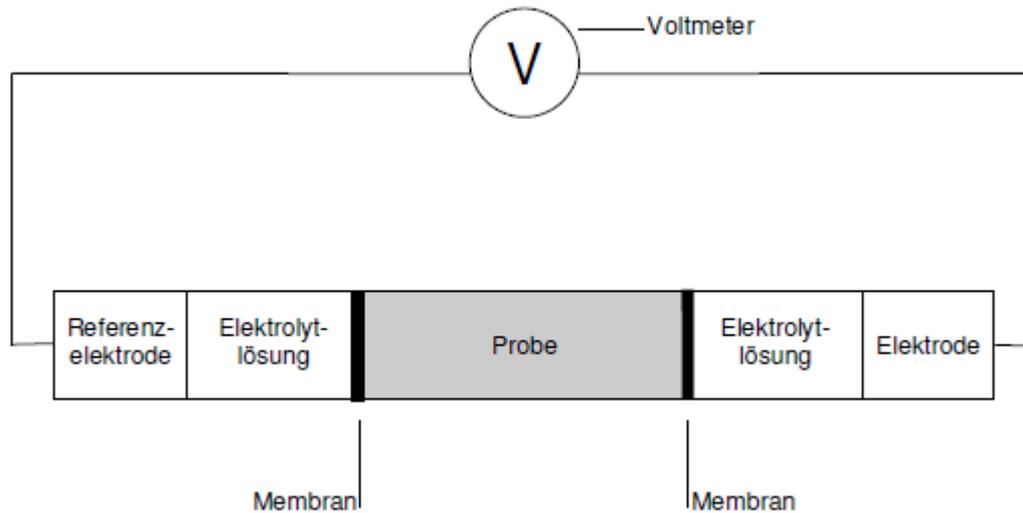


Abbildung 4: Potenziometrie (Radiometer Medical ApS, 2017)

In die Probe wird dabei eine Mess-(Indikator-) und eine Referenzelektrode (Bezugselektrode) getaucht und mit einem hochohmigen Potenziometer (Millivoltmeter) verbunden. Die Grundlage bildet die Nernst-Gleichung. Diese beschreibt die Abhängigkeit des Normalpotentials von Temperatur und Konzentration bzw. vom Druck der Retentionspartner (Kurzweil and Scheipers, 2010):

$$E_{\text{sample}} = E_0 + \frac{2.3RT}{nF} \log a_x$$

Abbildung 5: Nernst-Gleichung (Radiometer Medical ApS, 2017)

Wobei:

E_0 = Standard-Elektrodenspannung

R = Gaskonstante (8,3143 Joule x K^{-1} x mol^{-1})

T = Absolute Temperatur (37°C)

F = Faradaysche Konstante (96487 Coulomb x mol^{-1})

a_x = Aktivität von x

Nach Messung von E_{sample} kann die Aktivität berechnet werden, welche in die Konzentration umgewandelt wird (Aktivität = Aktivitätskoeffizient x Konzentration).

Die pH-Elektrode enthält eine Innenpuffer-Lösung mit einem bekannten pH-Wert. Die Potentialdifferenz über der Membran beruht auf einer Änderung des Ladungsgleichgewichts.

Wenn die H⁺-Konzentrationen auf beiden Seiten der Membran gleich groß sind, wird die Potentialdifferenz theoretisch 0 mV betragen.

Die theoretische Empfindlichkeit der pH-Elektrode bei 37 °C ist -61,5 mV pro pH Einheit unter Anwendung von $\text{pH} = -\log [\text{H}^+]$, sodass die Nernst-Gleichung wie folgt umgestellt werden kann (Radiometer Medical ApS, 2017)

$$E_{\text{sample}} = E_0 - 61.5 \times \text{pH mV}$$

3.3.3 Atemkondensatmenge und Atemminutenvolumen

Als ein weiterer Parameter, der als Maß der Kondensationseffektivität der Geräte dienen sollte, wurde das Volumen des Kondensates bestimmt. Dies geschah ebenso direkt nach der Kondensatgewinnung durch das Umpipettieren auf 0,1 ml genau.

Die Bestimmung des geatmeten Volumens erfolgte mit Hilfe eines Gasometers (Model GT4, GMT GmbH, Q_{min} 0,04 m³/h, Q_{max} 6 m³/h), der am expiratorischen Schenkel angeschlossen wurde. Dieser Balgengaszähler enthält vier Kammern, welche durch eine Membran (Balg) getrennt sind und als zwei Einheiten fungieren. Die Balgen sind miteinander verbunden und treiben durch wechselseitiges Füllen der Kammern über ein Kurbelbetrieb den Schieber und das Zählwerk an. (Prof. Dr.-Ing. Steinmetz et al., 2001)

3.3.4 Proteinmessung

Zur Proteinmessung wurde ein BCA-Micro-Protein-Assay (Thermo Scientific, Fisher Scientific Schweiz) verwendet. Hier erfolgt der kalorimetrische Nachweis und Quantifizierung des Gesamtproteins mittels Bicinchoninsäure (BCA). Nach Reduktion von Cu(II) zur Cu(I) (Biuret-Reaktion), wird im zweiten Schritt aus zwei BCA-Molekülen und einem Cu(I)-Ion ein Chelatkomplex gebildet. Dieser wasserlösliche Komplex zeigt eine starke Absorption bei 562 nm, die linear zur Erhöhung der Proteinkonzentration ist und so spektralphotometrisch analysiert werden kann. (Smith et al., 1985)

Zur Kalibrierung diente eine Proteinstandardreihe mit einem Proteingehalt von 0,625 µg/ml bis 100 µg/ml sowie als Leerwert zwei Proben destilliertes Wasser, um falsch positive oder negative Ergebnisse auszuschließen. Nach Zugabe von 100 µl Working-Reagenz (Pufferlösung, BCA und Kupfersulfatlösung in einem 25:24:1-Verhältnis) zu 100 µl Probe erfolgte die Inkubation über 60 Minuten bei 37°C. (Thermo Scientific, 2015)

Anhand der Absorptionwerte der Proteinstandardreihe konnte nun eine Kalibrierungskurve erstellt werden, mittels derer die Proteinkonzentration der Proben ermittelt wurden.

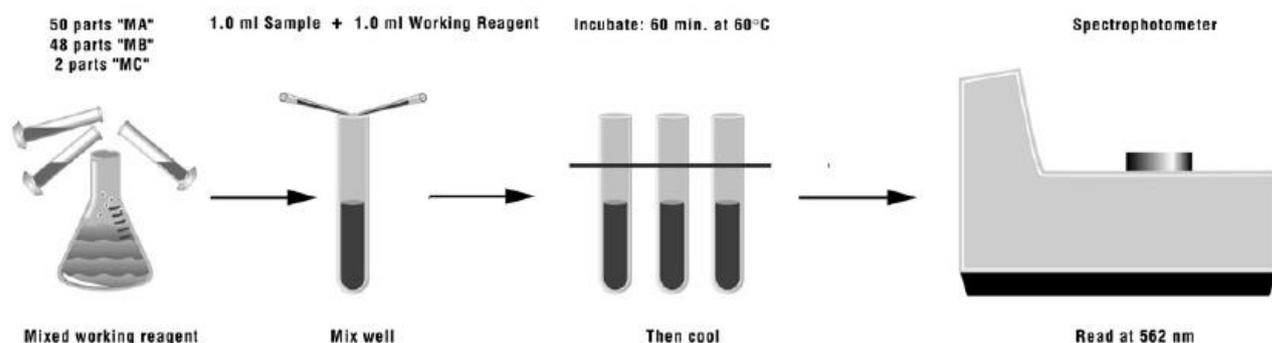


Abbildung 6: Ablauf des BCA-Micro-Protein-Assays (Thermo Scientific, 2015)

3.3.5 Amylaseaktivität

Da die Kontamination mit Speichel eine wichtige Fehlerquelle im Rahmen der Atemkondensatmessung darstellt und u.a. eine Verfälschung des Proteingehaltes verursachen kann, erfolgte zudem die Bestimmung der Amylaseaktivität. Hierzu wurde das EnzChek Ultra Amylase Assay Kit (Thermo Scientific, Fisher Scientific Schweiz) verwendet.

Dieses Kit arbeitet mit einem Stärkederivat das mit BODIPY® FL-Farbstoff markiert ist, der die Fluoreszenz löscht. Das Substrat wird durch die Amylase abgebaut und ergibt hochfluoreszierende Fragmente. Die Zunahme der Fluoreszenz ist direkt proportional zur Amylaseaktivität und wird mit einem Mikroplattenreader oder Fluorometer gemessen.

Durch den Test wird die Amylaseaktivität bis zu einer Konzentration von 2×10^{-3} U/ml gemessen, wobei eine Einheit definiert wird als Enzymmenge, die benötigt wird um 1 mg Maltose (über 3 Minuten bei 20°C sowie pH 6,9) freizusetzen.

Für die Herstellung der Pufferlösung wurden 2 ml der 10X Reaktionspuffer MOPS (3-(N-Morpholino)propansulfonsäure) mit 18 ml destilliertem Wasser verdünnt. Anschließend wurde eine Stammlösung des DQ-Stärkederivates mit einer Konzentration von 1 mg/ml vorbereitet, indem 100 µl der 50mM der Natriumacetatpufferlösung (Komponente C) in eine der Durchstechflaschen eingebracht wurde, welche das lyophilisierte Substrat (Komponente A = mit BODIPY® FL-Farbstoff markiertes DQ-Stärkederivat) enthielt. Diese wurde anschließend für 20 Sekunden mittels Vortexen gemischt und bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Mixen stehen gelassen. Durch Zugabe von weiteren 4,9 ml 1xPufferlösung wurde die Konzentration der Stammlösung auf 200 µg/ml gesenkt.

Zur Herstellung der Standardkurve wurde β -Amylase aus Gerste (SIGMA A-7130) verwendet, welche eine Enzymaktivität von 41,6 U/mg enthielt. Hiermit wurde eine Standardreihe mit einer Konzentration von 0 bis 200 mU/ml erzeugt. Hierzu wurde die β -Amylase mit destilliertem Wasser auf eine Konzentration von 1 mg/ml verdünnt. Um die Konzentration von 200 mU/ml

zu erreichen, wurde anschließend 5 µl der hergestellten Amylase-Lösung in 995 µl Puffer vermischt. Mittels weiterer Verdünnung (jeweils 1:2 pro Schritt) wurde die Standardreihe hergestellt.

Bei der eigentlichen Messung wurden zu 50 µl der Proben bzw. der Standards 50 µl der erstellten Substratlösung (Komponente A) hinzugefügt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Anschließend wurde die Fluoreszenz mittels Fluoreszenz-Mikrotiterplatten-Lesegeräte gemessen. Für die durch Amylase aufgespaltenen Substratfragmente liegt das Maximum der Absorption bei ~ 505 nm und der Fluoreszenzemission bei ~ 512 nm. Wie für die β -Amylase empfohlen, wurde für die Fluoreszenzmessung die Anregung bei 485 nm und zur Emissionsdetektion bei 530 nm gewählt.

Um falsch positive oder negative Ergebnisse auszuschließen erfolgte eine Leerwertmessung mit Wasser im zweifachen Ansatz. Die Standardreihe wurde als Triplikate angesetzt und entsprechend gemessen.

3.3.6 Nitrit-Messung

Das Prinzip der Nitritbestimmung beruht auf der Griess-Reaktion.

Im ersten Schritt wird Nitrit mit einem Diazotierungsreagenz auf Basis einer salpetrigen Säure behandelt (Griess-Reagenz II), wodurch sich ein Diazoniumsalz bildet. Dieses Zwischenprodukt reagiert anschließend mit einem Kupplungsreagens, N-Naphthylethylendiamin (Griess-Reagenz I). So entsteht eine stabile Azoverbindung, deren intensive rotviolette Farbe eine photometrische Messung ermöglicht. Die Absorption dieses Addukts bei 540 nm ist linear proportional zur Nitritkonzentration in der Probe. (Schwedt, 2015)

Für die Standardkurve wurde 100 mM Natrium-Nitrat verwendet. Durch Verdünnung mit Wasser wurde eine Standardreihe im Bereich von 0,195 µM bis 100 µM erstellt. Als Leerwert wurde Wasser genutzt.

Zu 100 µl Probe wurden jeweils 50 µl Griess Reagenz I (Sulfanilamid) und II (N-Naphthylethylendiamin) hinzugefügt. Die entstandene rotviolette Verbindung wurde anschließend bei 560 nm photometrisch gemessen.

3.3.7 Nachweis von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Um das Atemkondensat z.B. für die Tumordiagnostik nutzen zu können, muss das Kondensat nachweisbares DNA-Material enthalten. Aus diesem können dann tumorspezifische Genabschnitte wie z.B. das p53-Exon untersucht werden (Gessner, 2005).

Es wurde daher an Proben beider Geräte eine Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt, um zu untersuchen, ob ausreichend DNA-Material für eine entsprechende Diagnostik vorhanden ist.

Die Polymerase-Kettenreaktion ermöglicht eine Vervielfältigung (Amplifikation) kleiner DNA-Mengen. In einem ersten Schritt erfolgt die Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei 94°C. An die nun entstandenen Einzelstränge lagern sich die Primer an den 5'- und 3'-Ende des zu amplifizierenden Abschnitts an (Annealing). Diese werden anschließend durch eine DNA-Polymerase verlängert (elongiert). Dazu ist die Anwesenheit von freien Desoxynucleosid-Triphosphaten notwendig.

Da die Sensivität sehr hoch ist, reichen bereits geringste Mengen (< 1pg) an DNA für einen Nachweis eines entsprechenden Genes aus (Müller and Prange, 2016).

1.	Initiale Denaturierung		
	95°C 3 min	Enzymaktivierung	
2.	Amplifizierung		
	95°C 30 sec	Denaturierung	} 50 Zyklen
	59° C 30 sec	Annealing	
	72°C 30 sec	Elongation	
3.	72°C 10 min		
4.	Kühlen		
	4 °C		

Tabelle 3 Thermo-Cycler Programm

Auch wenn im Praxisalltag das Ziel der Nachweis von Tumorgenen durch das nicht-invasive Verfahren der Atemkondensatsammlung ist, lag in dieser Arbeit das Augenmerk auf dem Vergleich der DNA-Nachweisbarkeit der beiden Atemkondensatgeräte. Daher erfolgte die PCR für das β -Actin-Gen. Actin ist als Baustein der Mikrofilamente ein permanent produziertes Protein in eukaryotischen Zellen (Koolman and Röhm, 2003). Es wird deshalb auch als house keeping-Gen bezeichnet und lässt sich gut nachweisen.

Die folgende Tabelle zeigt die verwendeten Primer:

Tabelle 4 Primersequenzen

Name	Sequenz 5'-3'
β-actin (s)	5'-CCT TCC TGG GCA TGG AGT CCT G
β-actin (as)	5'-GGA GCA ATG ATC TTG ATC TTC

Im Folgenden wird das verwendete Pipertierschema aufgeführt:

destilliertes Wasser	12 µl
10X Puffer	2 µl
MgCl ₂ (200µM)	0,8 µl
Actin 3/4-Primer	jeweils 0,2 µl
Taq-Polymerase	0,2 µl
dTNPs	1,6 µl
Probe/Template	1 µl

Beim Ansetzen der PCR-Proben wurden zudem Negativ- und Positivkontrollen mitgeführt, um falsch positive oder falsch negative Ergebnisse auszuschließen. Die angesetzten Proben wurden mittels Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert und anschließend in den Thermocycler gestellt. Nach Abschluss der PCR wurden die Proben auf 4°C abkühlt.

Die PCR-Ansätze wurden anschließend mittels Gelelektrophorese untersucht. Dazu wurde ein 2%iges Agarosegel hergestellt. Dabei wurden 2g Agarose in 100 ml Puffer aufgekocht und in die entsprechende Form gegossen und ein Probenkamm eingesetzt.

In die Geltaschen wurde jeweils 10 µl Probe mit 2µ Bromphenolblaupuffer eingebracht. Die Elektrophorese erfolgte anschließend über 60 Minuten bei 310 Volt, 305 mA und 30 Watt bis eine zufriedenstellende Auftrennung sichtbar war. Anschließend wurden die Banden (202bp) mittels UV-Licht und CCD-Kamera analysiert.

3.4 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mittels SigmaPlot 14.0 (Systat Software).

Für die Parameter pH und Volumen wurden die Probenpaare (Proben eines Patienten) des DECCS und EcoScreens mit dem gepaartem t-Test untersucht. Bei fehlender Normalverteilung wurde der Wilcoxon Signed Rank Test angewandt.

Bei der Untersuchung der Amylaseaktivität, der Protein- und Nitritkonzentration gab es Proben, die unterhalb des messbaren Bereiches lagen. Diese Proben wurden in der statistischen Auswertung beim Vergleich der Konzentrationen beider Systeme nicht mit eingerechnet. Sie wurden jedoch im Punkt „Nachweisbarkeit“ gesondert analysiert. Für die statistische Auswertung dieser Proben (sowohl bei der Konzentrationsbestimmung als auch bei der Nachweisbarkeit) wurde beim Vergleich der Systeme der t-Test verwendet. Bei fehlender Normalverteilung wurde die statistische Auswertung mit dem Mann Whitney Rank Sum Test durchgeführt.

Zusätzlich wurden die Untergruppen von Lungengesunden sowie COPD- und Lungenkarzinompatienten innerhalb jedes Systems gegeneinander mittels One Way Anova Analyse (bei fehlender Normalverteilung: Anova on Ranks) untersucht.

Der dritte Punkt unserer Untersuchungen bezog sich dann auf den Vergleich der Untergruppen zwischen den beiden Systemen. Die statistische Untersuchung hierfür wurde mit dem t-Test (bei fehlender Normalverteilung: Mann Whitney Rank Sum Test) durchgeführt

Generell galt ein Ergebnis bei $P < 0,05$ (Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner 5%) als signifikant.

Um eine einheitliche Darstellung zu gewährleisten, wurden die Daten unabhängig von einer bestehenden Normalverteilung als Box Plots dargestellt und mit Median und IQR (Inter Quartile Range) angegeben. Dies ist insofern vertretbar, da im Falle einer Normalverteilung der Median etwa dem Mittelwert entspricht.

4 Ergebnisse

Zunächst wurden die ermittelten Werte der Atemkondensatproben beider Geräte miteinander verglichen. Zusätzlich wurde untersucht, ob sich bezüglich der ermittelten Werte zwischen den untersuchten Gruppen (Probanden, COPD- und Lungenkarzinompatienten) an den jeweiligen Geräten ein Unterschied bezogen auf die einzelnen Parameter nachweisen ließ. Abschließend wurden die Ergebnisse der einzelnen Gruppen zwischen den beiden Systemen miteinander verglichen.

4.1 Amylaseaktivität

Die Amylase wurde bestimmt, um eine relevante Kontamination der Proben mit Speichel auszuschließen.

In den untersuchten 48 Proben lagen beim DECCS-System 8 und beim EcoScreen-System 10 Proben über der Nachweisgrenze. Obwohl damit beim EcoScreen zwei Proben mehr kontaminiert waren, ergab sich bezüglich der Kontaminationshäufigkeit keine signifikante Differenz. Allerdings zeigte sich bei den Analysen des EcoScreen-Systems, dass in den kontaminierten Proben die Amylaseaktivität im Vergleich zu den kontaminierten Proben des DECCS-Systems erhöht war (Abbildung 7). So lag der Wert für die Amylaseaktivität bei den kontaminierten Proben des EcoScreen-Systems mit einem Median von 70,01 mU/ml (IQR: 18,77 – 135,01 mU/ml) deutlich über dem Wert des DECCS-Systems (Median 13,62 mU/ml; IQR: 10,41 – 17,65 mU/ml). Dieser Unterschied war signifikant ($P=0,003$).

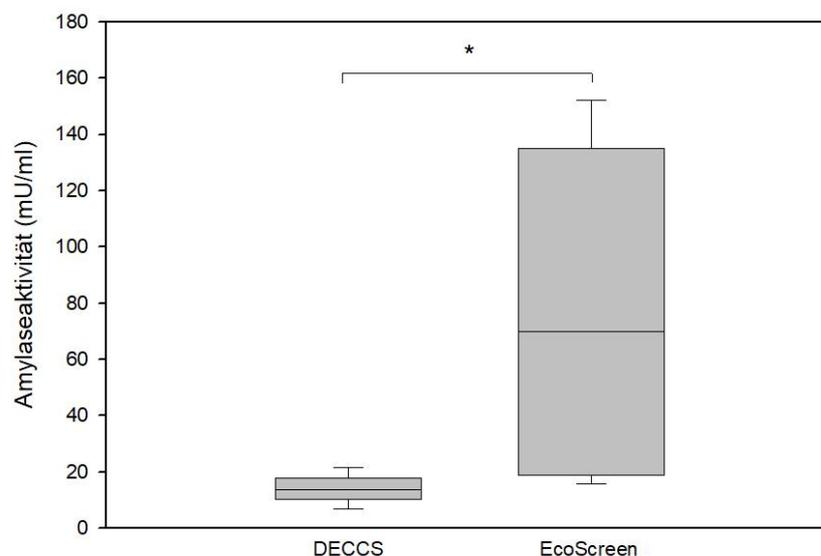


Abbildung 7: Amylaseaktivität in den EBC-Proben Vergleich der Amylaseaktivität in den Amylase-positiven EBC-Proben, welche mittels DECCS- und EcoScreen-System gesammelt wurden

Als Referenz wurde die Amylase-Aktivität in 6 Speichelproben von Probanden untersucht. Die Amylaseaktivität befand sich im Durchschnitt bei 98,77 mU/ml. Sie variierte jedoch relativ stark. Der niedrigste Wert lag bei 46,32 mU/ml und damit bei nur etwa einem Drittel des höchsten Wertes von 151,26 mU/ml.

Lag in einer Atemkondensatprobe die Amylaseaktivität oberhalb des niedrigsten Wertes aus den Speichelproben, wurde diese aus der Statistik ausgeschlossen. Dies betraf ausschließlich Proben des EcoScreens (n=6, jeweils 2 Lungenkarzinom- und COPD-Patienten sowie Probanden). Die Amylase-Aktivität in den verbliebenen Atemkondensatproben bewegte sich in einem Bereich unterhalb von 22 mU/ml.

4.2 Atemkondensatmenge

Die Analyse der gesammelten Volumina der Atemkondensatproben aller untersuchten Patientengruppen ergab einen signifikanten Unterschied ($P < 0,001$) zwischen den beiden Geräten (Abbildung 8). Beim DECCS wurde im Schnitt eine Menge von 0,78 ml Atemkondensat (IQR: 0,6 – 0,9 ml) in 10 Minuten gesammelt. Hingegen konnte beim EcoScreen in gleicher Zeit eine signifikant größere Menge gewonnen werden – im Median 1,1 ml (IQR: 0,8 – 1,44 ml).

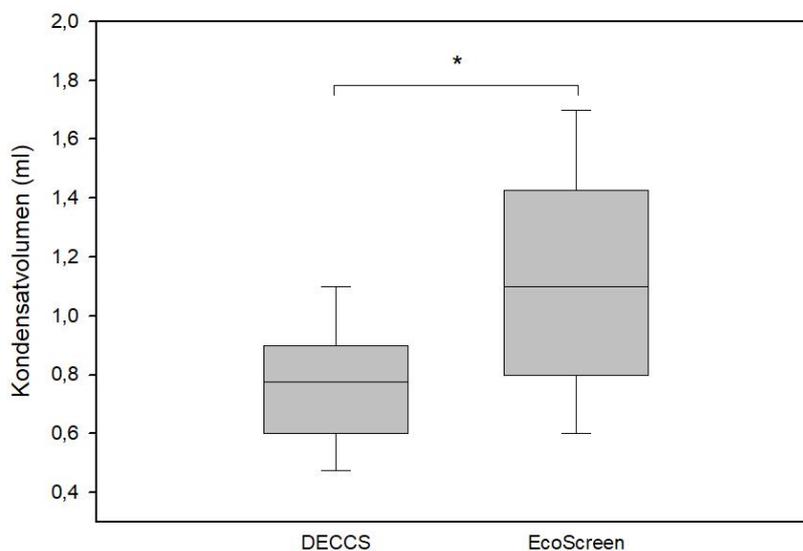


Abbildung 8: Atemkondensatvolumen beider Atemkondensatgeräte Vergleich aller Kondensatmengen, welche mittels DECCS- und dem EcoScreen-System gesammelt wurden

Zwischen den einzelnen Gruppen (Patienten, Gesunde) ergab sich bei den Proben des DECCS-Systems bezüglich der gewonnenen Probenmenge keine signifikante Differenz. Im Median konnten bei alle Gruppen ähnliche Mengen gesammelt werden. Dies entspricht bei den Probanden 0,6 ml (IQR: 0,6 – 1,0 ml), bei den COPD-Patienten 0,775 ml (IQR: 0,55 – 0,85 ml) und den Lungenkarzinompatienten 0,8 ml (IQR: 0,65 – 1,05 ml).

Ein ähnliches Ergebnis ergab sich für die Proben des EcoScreens, wobei, wie bereits beschrieben, die Atemkondensatmenge im Schnitt höher lag. Im Median entstand bei den Probanden 0,9 ml (IQR: 0,65 – 1,65 ml), bei den COPD-Patienten 1,05 ml (IQR: 0,73 – 1,6 ml) und bei den Lungenkarzinompatienten 1,1 ml (IQR: 0,9 – 1,3 ml) Atemkondensat. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen bestand dabei auch hier nicht.

Die höhere Kondensatausbeute durch das EcoScreen-System konnte auch bei der Analyse der untersuchten Gruppen (Probanden, COPD und Lungenkarzinompatienten) bestätigt werden (Abbildung 9). In allen Untergruppen ergab sich ein signifikant höheres Kondensatvolumen am EcoScreen-System (Probanden $P=0,037$, Lungen-Ca $P=0,003$, COPD $P=0,002$).

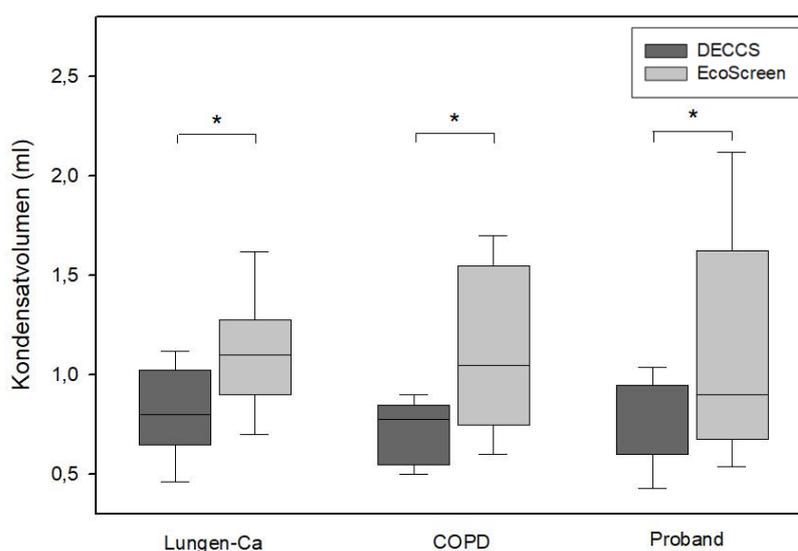


Abbildung 9: Atemkondensatvolumen aller Gruppen Vergleich der mit beiden Atemkondensatsystemen gewonnenen Kondensatmenge aller untersuchten Gruppen (Proband, COPD- und Lungenkarzinompatienten)

4.3 pH-Messung

Bei den untersuchten EBC-Proben ergab sich beim DECCS-System ein medianer pH von 7,21 (IQR: 6,86 – 7,3). In den Proben, die mit dem EcoScreen-System gemessen wurden, wurde ein medianer pH-Wert von 7,368 ermittelt (IQR: 7,22 – 7,74). Es konnte ein statistisch signifikanter Unterschied ($P=<0,001$) zwischen den beiden Systemen bei den pH-Werten in den Proben nachgewiesen werden (Abbildung 10).

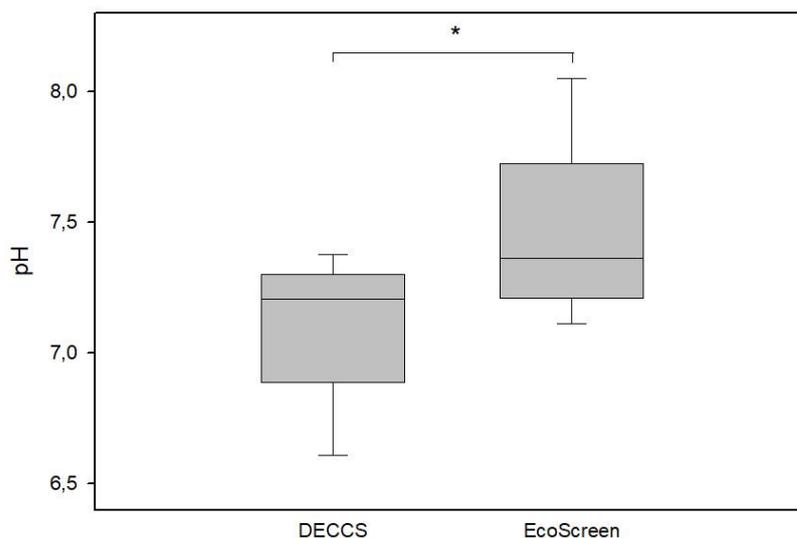


Abbildung 10: Proben-pH beider Atemkondensatgeräte Vergleich der mittels Radiometer (Potenziometrie) bestimmten pH-Werte aller Atemkondensatproben, welche mittels DECCS- und dem EcoScreen-System gesammelt wurden

Betrachtet man für die Proben des DECCS die Patientengruppen untereinander, ergibt sich für den pH ein medianer Wert von 7,15 (IQR: 6,63 – 7,3) bei den Probanden, 7,17 bei den COPD- (IQR: 6,74 – 7,28) und 7,24 bei den Karzinom-Patienten (IQR: 7,05 – 7,37). Eine signifikante Differenz ließ sich damit zwischen den Gruppen an diesem Gerät nicht nachweisen.

Im Vergleich dazu konnte bei den EBC-Proben des EcoScreens ein Unterschied zwischen den pH-Werten der Gruppen nachgewiesen werden (Abbildung 11). Bei den Probanden befand sich der pH im Median bei 7,19 (IQR: 7,06 - 7,45) und damit niedriger als in den Proben der COPD- (pH 7,49, IQR: 7,29 - 7,9) und Lungenkarzinompatienten (pH 7,36, IQR: 7,26 - 7,76). Eine statistische Signifikanz besteht dabei zwischen der Probanden-Gruppe und den COPD-Patienten ($P=0,019$). Auch wenn sich im Vergleich von Probanden- und Lungenkarzinomproben eine ähnliche Tendenz zu niedrigeren pH-Werten bei den Lungengesunden zeigte, konnte hier keine Signifikanz beobachtet werden ($P=0,126$). Die pH-Werte der Lungenkranken (COPD- und Lungenkarzinompatienten) befanden sich auf einem ähnlichen Niveau.

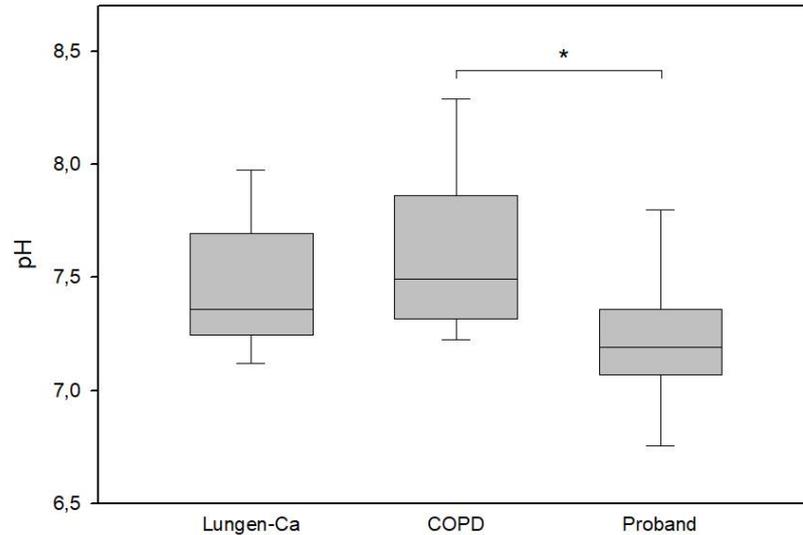


Abbildung 11: Proben-pH der untersuchten Gruppen am EcoScreen-Gerät Vergleich des mittels Radiometer (Potenziometrie) bestimmten Atemkondensat-pH der untersuchten Gruppen (Proband, COPD- und Lungenkarzinompatienten), welche mittels EcoScreen-Gerät gesammelt wurden

Betrachtet man die einzelnen Gruppen bezüglich des pH-Wertes, so konnte bei den COPD- und Lungenkarzinompatienten ein signifikant ($P < 0,001$) niedrigerer pH-Wert in den Proben des DECCS-Systems nachgewiesen werden (Abbildung 12). Obwohl auch die Probandenproben des DECCS-Systems einen niedrigeren pH-Wert aufweisen, waren diese Unterschiede nicht signifikant.

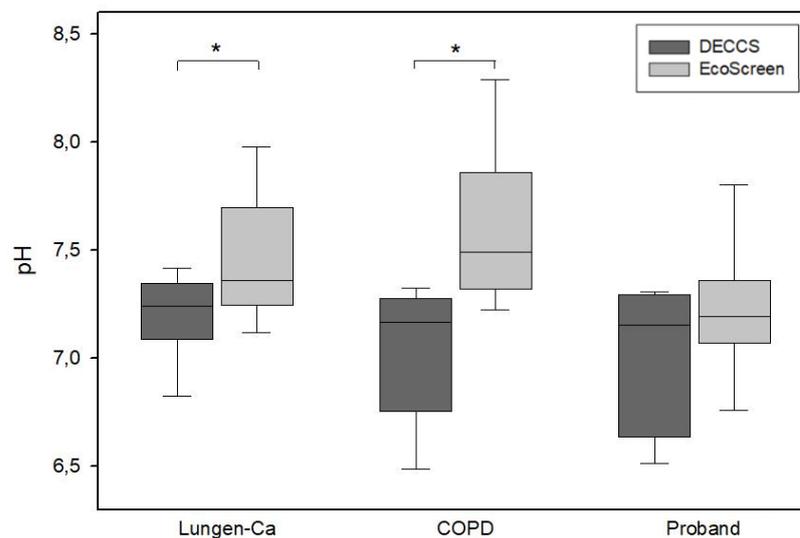


Abbildung 12: Proben-pH der Atemkondensatproben aller Gruppen Vergleich des mittels Radiometer (Potenziometrie) bestimmten Atemkondensat-pHs aller untersuchten Gruppen (Proband, COPD- und Lungenkarzinompatienten) beider Atemkondensatsysteme gegeneinander

4.4 Proteinnachweisbarkeit

Die Proteinkonzentration in EBC-Proben wurde bestimmt, um festzustellen, ob für das Charakterisieren von Protein ausreichend Material zur Verfügung steht. Da es zahlreiche

Proben gab, in denen ein messbarer Proteingehalt fehlte, wurde zusätzlich die generelle Proteinnachweisbarkeit zwischen den Sammelsystemen verglichen.

Von den untersuchten Proben lag die Proteinkonzentration in den am DECCS gesammelten Kondensaten 23 Mal unterhalb des Messbereichs, während dies beim EcoScreen nur 1 Probe betraf (Abbildung 13). Die meisten Proben mit zu niedrigen Proteinwerten fanden sich in der Gruppe der Lungenkarzinompatienten (13 DECCS-Proben und 1 EcoScreen-Probe). Bei den COPD-Patienten lagen 9 DECCS-Proben unterhalb der Nachweisgrenze, keine beim EcoScreen und bei der Untergruppe der Probanden betraf es nur eine negative Probe beim DECCS-System. Damit war der Proteinnachweis in den Proben des DECCS signifikant schlechter ($P < 0,001$).

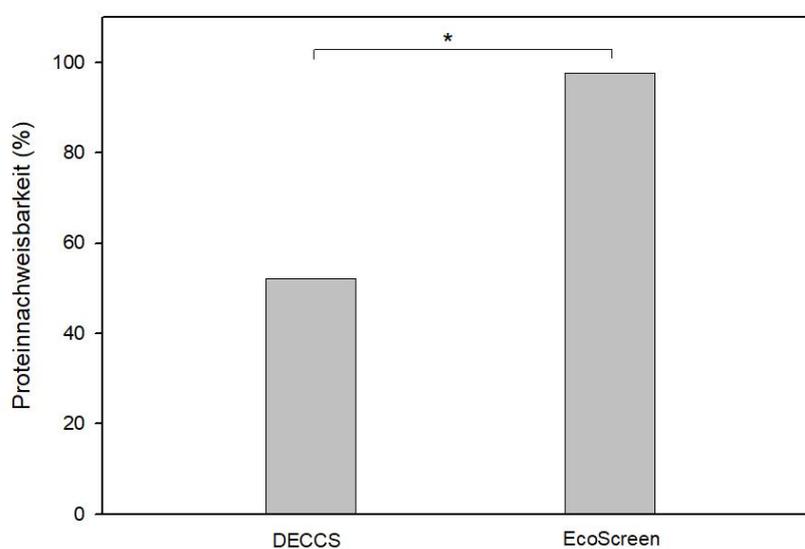


Abbildung 13: Proteinnachweisbarkeit in den Proben des DECCS- gegenüber denen des EcoScreen-Geräts Vergleich aller untersuchten EBC-Proben bezüglich des Anteils derjenigen EBC-Proben, in welchen mittels BCA-Micro-Protein-Assay ein Proteinnachweis gelang

Betrachtet man die Untergruppen bestätigt sich dies ebenso für die COPD- und Lungenkarzinompatienten mit signifikant ($P < 0,001$) schlechterer Proteinnachweisbarkeit beim DECCS-System (Abbildung 14). Bei den gesunden Probanden wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Atemkondensatgeräten festgestellt.

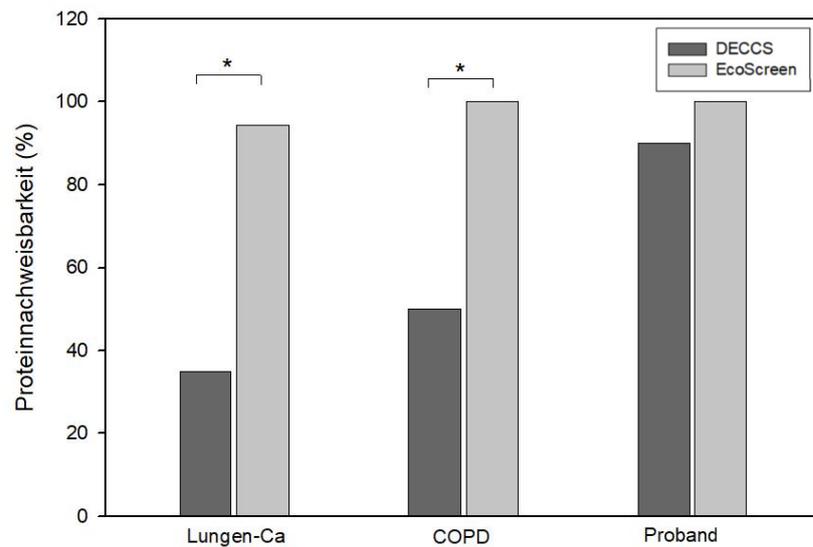


Abbildung 14: Proteinnachweisbarkeit der Atemkondensatproben der untersuchten Gruppen Vergleich der Nachweisbarkeit des mittels BCA-Micro-Protein-Assay bestimmten Proteins der Atemkondensatproben aller untersuchten Gruppen (Proband, COPD- und Lungenkarzinompatienten)

4.5 Proteinkonzentration

Für die Proteinkonzentration wurden durch den Ausschluss der Proben mit hohen Amylasewerten ($n=6$) sowie derjenigen unterhalb der Nachweisgrenze (23 DECCS-Proben: 13 Lungenkarzinompatienten, 9 COPDler, 1 Proband, 1 EcoScreen-Probe eines Lungenkarzinompatienten) letztendlich 25 bzw. 41 Proben untersucht.

Für diese Proben konnte eine signifikant höhere Proteinkonzentration beim EcoScreen-System ($P=<0,001$) nachgewiesen werden (Abbildung 15). Diese lag im Median bei 24,57 $\mu\text{g/ml}$ (IQR: 20,57 - 37,78 $\mu\text{g/ml}$), während in den Proben des DECCS-Systems die Proteinkonzentration im Median bei 14,07 $\mu\text{g/ml}$ (IQR: 13,33 - 16,65 $\mu\text{g/ml}$) lag.

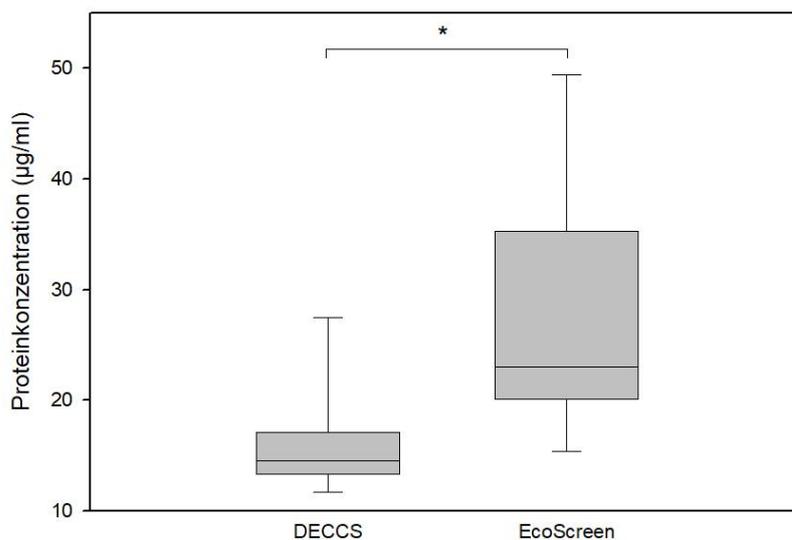


Abbildung 15: Proteinkonzentration der EBC-Proben beider Atemkondensatgeräte Vergleich der mittels BCA-Micro-Protein-Assay bestimmten Proteinkonzentration aller untersuchten Kondensatproben des DECCS- gegenüber des EcoScreen-Systems

Betrachtet man die Gruppen beim DECCS untereinander ergibt sich für die Probanden im Median eine Konzentration von 14,17 µg/ml (IQR: 11,1 – 19,90 µg/ml), für die Karzinompatienten 13,63 µg/ml (IQR: 12,87 - 14,52 µg/ml) sowie für die COPDler 14,56 µg/ml (IQR: 13,42 - 21,33 µg/ml). Eine signifikante Differenz ließ sich nicht nachweisen.

Die höchsten Proteinkonzentrationen in den Atemkondensatproben des EcoScreens fanden sich bei den Probanden (32,68 µg/ml, IQR: 21,29 - 52,85 µg/ml). Eine Signifikanz ließ sich gegenüber den Lungenkranken nicht nachweisen. Der Proteingehalt der Lungenkarzinom- und COPD-Patienten befindet sich auf einem ähnlichen Niveau (27,71 bzw. 22,84 µg/ml, IQR: 19,75 – 38,91 µg/ml und 19,58 - 33,78 µg/ml).

Wie bereits gezeigt, gelang mittels EcoScreen-System relevanter häufiger ein Proteinnachweis. Obwohl sich in 13 von 20 DECCS-Proben der Lungenkarzinompatienten und 9 von 18 DECCS-Proben der COPD-Patienten kein Protein nachweisen ließ, konnte auch in den verbliebenen Proben in allen untersuchten Gruppen (Probanden, COPD- und Lungenkarzinompatienten) eine signifikant niedrigere Proteinkonzentration, im Vergleich zu den Proben nachgewiesen werden, welche mittels EcoScreen asserviert wurden (Abbildung 16)

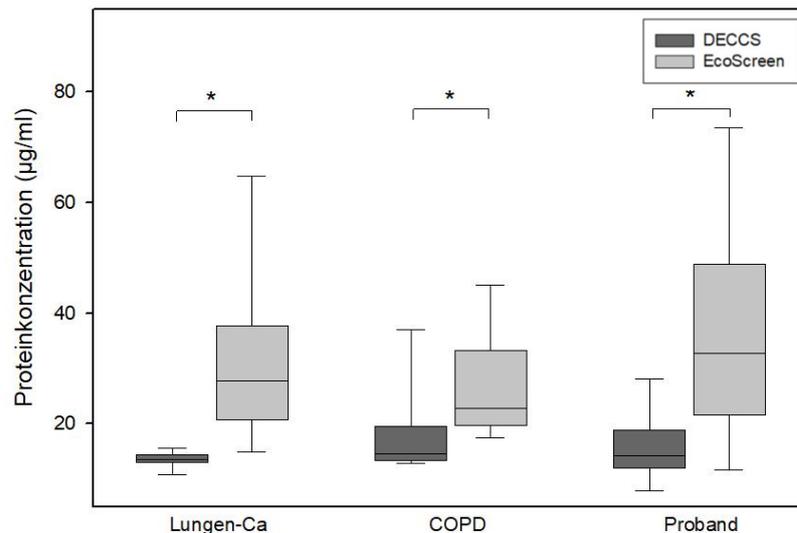


Abbildung 16: Proteinkonzentration der Atemkondensatproben der untersuchten Gruppen Vergleich der EBC-Proben aller untersuchten Gruppen (Proband, COPD- und Lungenkarzinompatienten) bezüglich der Proteinkonzentration, welche mittels BCA-Micro-Protein-Assay gelang

4.6 Nitrit-Messung

Von den untersuchten EBC-Proben konnten neben den sechs Proben, die eine zu hohe Amylaseaktivität aufwiesen, vier weitere Proben, welche mittels DECCS-System gesammelt worden waren, aufgrund zu niedriger Nitritkonzentration in der Auswertung nicht berücksichtigt werden. Dies betraf jedoch ausschließlich Probandenproben. In allen übrigen Gruppen sowie in den EcoScreen-Proben befand sich die Nitritkonzentration oberhalb der Nachweisgrenze. Ein signifikanter Unterschied in der Nitritnachweisbarkeit zwischen den beiden Atemkondensatsystemen konnte nicht nachgewiesen werden.

Bei den DECCS-Proben ergab sich im Median ein Wert von 4,65 µmol/l (IQR: 2,76 – 8,33 µmol/l), welcher damit signifikant ($P < 0,001$) unterhalb der Nitritkonzentration in den EcoScreen-Proben (19,26 µmol/l, IQR: 10,48 – 33,23 µmol/l) lag (Abbildung 17).

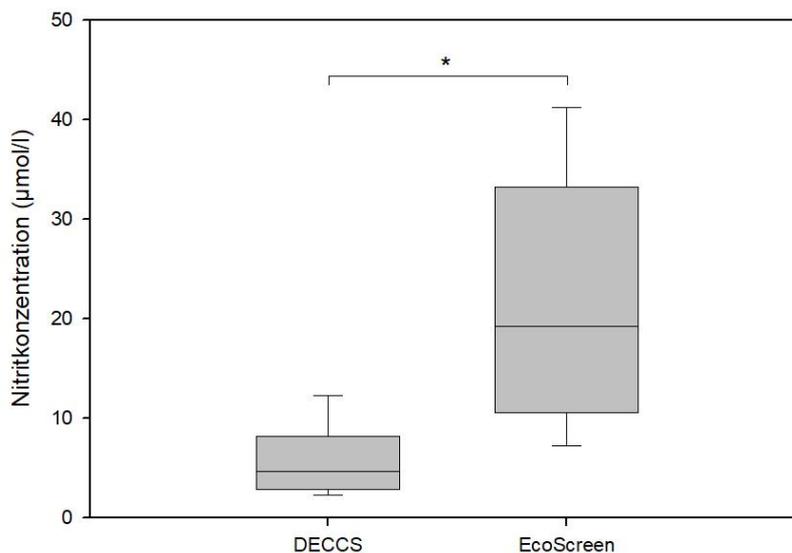


Abbildung 17: Nitritkonzentration der Kondensatproben beider Atemkondensatsysteme *Untersuchung der Nitritkonzentration aller Kondensatproben des DECCS im Vergleich zu denen des EcoScreens*

In den Atemkondensatproben des DECCS war die Nitritkonzentration mit 3,41 µmol/l (IQR: 2,31 - 7,72 µmol/l) bei den Probanden am niedrigsten. Vier Proben lagen in dieser Gruppe sogar unterhalb der Nachweisgrenze. Die höchste Nitritkonzentration fand sich in den Proben der COPD-Patienten mit 5,5 µmol/l (IQR: 3,43 - 8,49 µmol/l), während sie bei den an Lungenkrebserkrankten bei 4,89 µmol/l (IQR: 2,76 - 8,53 µmol/l) lag. Eine signifikante Differenz ergab sich zwischen den einzelnen Gruppen nicht.

Für die Proben des EcoScreens ergab sich eine im Verhältnis ähnliche Verteilung der Nitritkonzentrationen in den Untergruppen, wobei die Konzentrationen im Mittel deutlich höher lagen. Die höchsten Nitritwerte mit 29,38 µmol/l (IQR: 15,76 – 38,99 µmol/l) waren bei den COPD-Erkrankten nachweisbar, während bei den Lungengesunden die Konzentration mit 11,47 µmol/l (IQR: 6,65 – 16,07 µmol/l) am niedrigsten lag (Abbildung 18). Der Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen war signifikant ($P=0,017$). Für die Lungenkarzinompatienten lag das Nitrit im Median bei 19,01 µmol/l (IQR: 9,96 – 24,77 µmol/l). Signifikante Unterschiede zu den anderen beiden Gruppen waren nicht vorhanden, wobei die niedrigere Konzentration gegenüber den COPD-Patienten als Trend ($P=0,06$) gewertet werden kann.

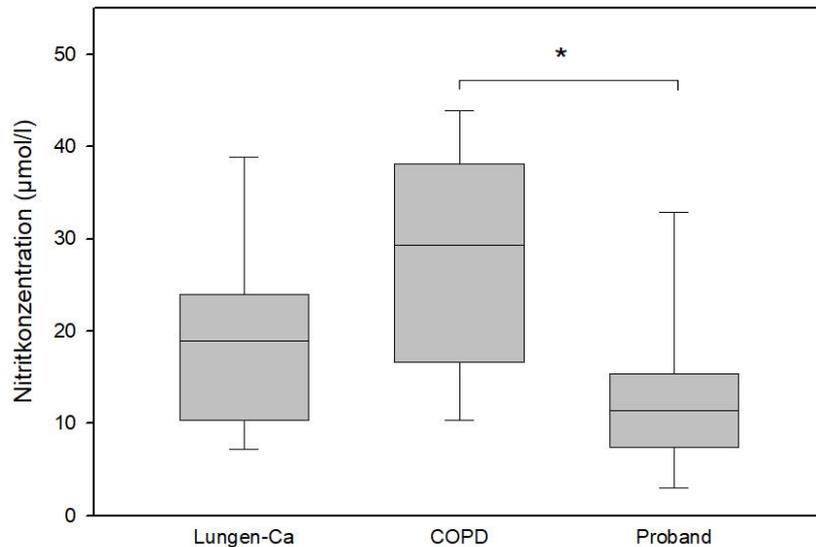


Abbildung 18: Nitritkonzentration der Atemkondensatproben der untersuchten Gruppen am EcoScreen
 Vergleich der Untergruppen Lungenkarzinom-, COPD-Patient und Proband im Hinblick auf die Nitritkonzentration, der am EcoScreen gewonnenen Atemkondensatproben

Betrachtet man die Nitritkonzentration in den Untergruppen zwischen beiden Geräten (Probanden, COPD und Lungenkarzinompatienten), so bestätigte sich, dass die Konzentrationen in den EcoScreen-Proben, generell höher waren - mit Erreichen der Signifikanz zwischen den Lungenkranken ($P < 0,001$) und deutlichem Trend zwischen den Probandenproben ($P = 0,07$) (Abbildung 19).

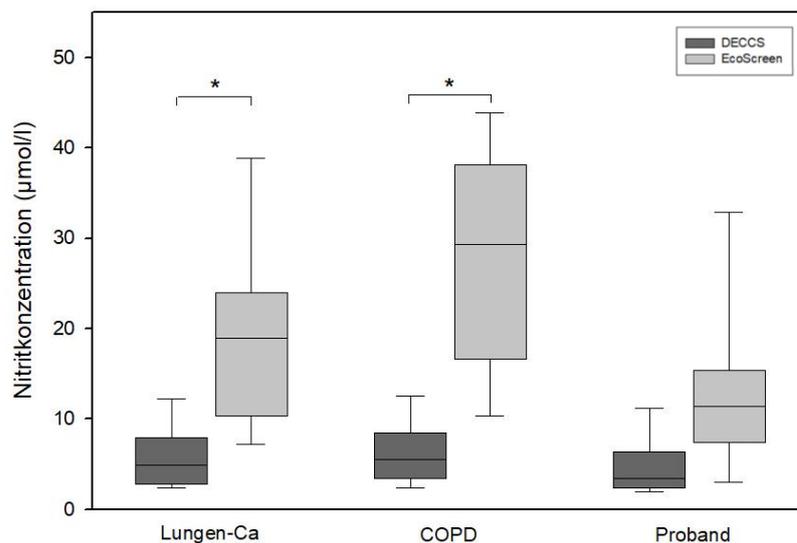


Abbildung 19: Nitritkonzentration der Atemkondensatproben der untersuchten Gruppen Vergleich des mit beiden Atemkondensatsystemen gewonnenen Atemkondensats aller untersuchten Gruppen (Proband, COPD- und Lungenkarzinompatienten) im Hinblick auf die Nitritkonzentration

4.7 Nachweisbarkeit von DNA mittels PCR

Es wurden insgesamt 30 Proben beider Geräte mittels PCR auf Actin untersucht. Dabei gelang in den EcoScreen-Proben bei 13 Proben ein DNA-Nachweis (Abbildung 21). Die EBC-Proben

des DECCS-Systems waren in der PCR 28 Mal negativ. Lediglich in 2 Proben konnte DNA nachgewiesen werden. Damit lässt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Geräten nachweisen ($P < 0,001$) (Abbildung 21).

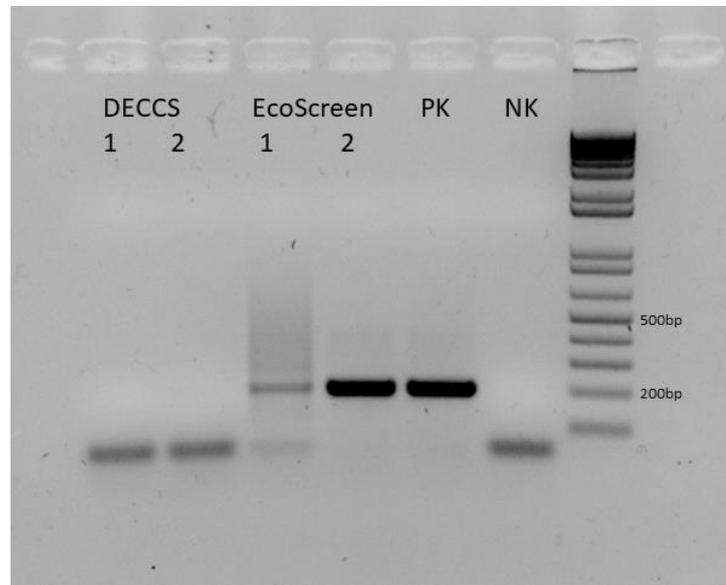


Abbildung 20: Gelelektrophorese für die β -Actin PCR-Produkte Vergleich der DNA-Nachweisbarkeit in den Atemkondensatproben beider Sammelgeräte mittels PCR für das β -Actin-Gen. Ergebnis der Gelelektrophorese zweier EBC-Proben des DECCS- und des EcoScreen-Gerätes sowie Positiv- (PK) und Negativkontrolle (NK)

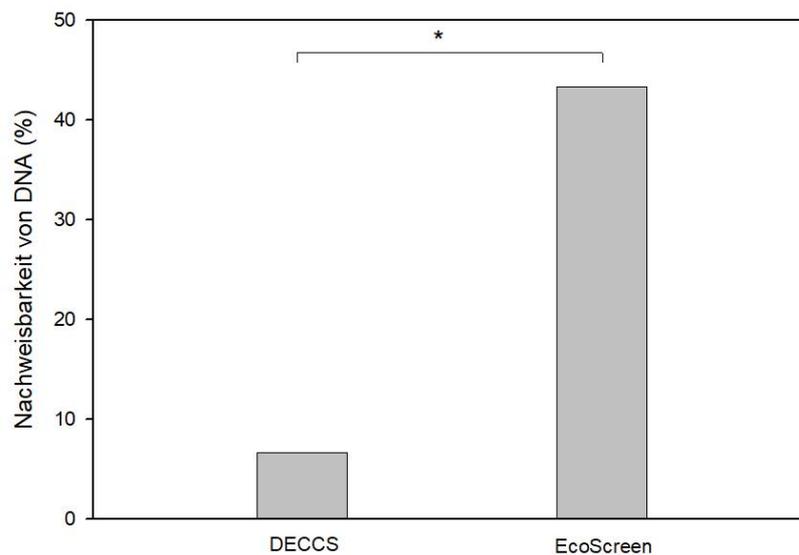


Abbildung 21: Nachweisbarkeit von DNA in den Proben des DECCS- gegenüber denen des EcoScreens-Geräts Vergleich der 30 untersuchten EBC-Proben bezüglich des Anteils derjenigen EBC-Proben, in welchen ein DNA-Nachweis gelang

4.8 Volumen und Proteinkonzentration bei Veränderung des DECCS-Testaufbaus

Aufgrund der deutlich schlechteren Ausbeute an Kondensatmenge und der geringen Proteinkonzentration bei den Proben, die mit dem DECCS-System gesammelt worden waren, wurden Veränderungen am DECCS-System ausgetestet, um eine Verbesserung der genannten Faktoren zu erzielen.

Eine Überlegung war, dass die niedrigere Temperatur des EcoScreens eine größere Ausbeute bedingt. Zum anderen wurde die Hypothese aufgestellt, dass der lange Schlauch zwischen Mundstück und Sammeleinheit einen negativen Einfluss haben könnte.

Um diese Hypothesen zu überprüfen, wurde zum einen der Schlauch vor der DECCS Sammeleinheit so stark gekürzt, dass sich nur noch des T-Stück zwischen Sammeleinheit und Mundstück befand. Des Weiteren wurde die Temperatur um den Tube von bisher - 5,5°C auf - 25°C reduziert. An einer kleinen Probandengruppe von 8 Lungengesunden wurden diese Veränderungen beim Versuchsaufbau des DECCS an den Faktoren Volumen des gesammelten Atemkondensats und Proteinkonzentration überprüft.

Beim normalen Versuchsaufbau entstand im Median 1 ml Atemkondensat (IQR: 0,65 - 1,2 ml). Durch Kürzen des Schlauchs blieb das Volumen in etwa unverändert (1 ml, IQR: 0,68 - 1,33 ml, P=0,871). Durch die Reduktion der Temperatur konnte eine signifikante Steigerung (P= 0,003) des Kondensatvolumens auf 1,65 ml (IQR: 1,08 - 2,45 ml) erreicht werden (Abbildung 22).

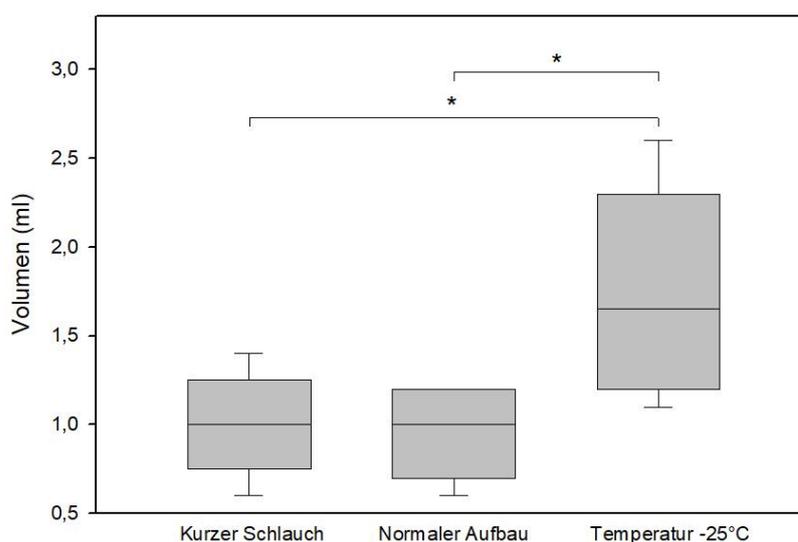


Abbildung 22: Atemkondensatmenge bei Veränderung des DECCS-Sammelsystems Vergleich der Atemkondensatvolumen in 10-Minuten-Sammelphase durch Kürzen des Schlauchsystems bzw. Reduktion der Sammeltemperatur im Vergleich zum normalen Versuchsaufbau

Einen Einfluss auf die Proteinkonzentration konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Diese befand sich bis auf 2 Proben eines Probanden immer unterhalb der Nachweisgrenze.

4.9 Atemminutenvolumen

Da sich eine signifikante Differenz der Atemkondensatmengen in allen Untergruppen zeigen ließ, wurden verschiedene Hypothesen aufgestellt. Da beide Geräte einen anderen Aufbau mit unterschiedlichem Durchmesser der Mundstücke und Schlauchsysteme besitzen, wurde überlegt, ob dies einen Einfluss auf das geatmete Atemminutenvolumen haben könnte.

In einer Gruppe von 8 Probanden wurden am Expirationsschenkel mittels Gasuhr das in 10 Minuten ventilierte Volumen bestimmt und so das Atemminutenvolumen berechnet. In anderen Arbeiten wurde bereits bewiesen, dass das Atemminutenvolumen in linearem Zusammenhang mit dem Kondensatvolumen steht. (Gessner et al., 2001)

Trotz gleicher Bedingungen und Ruheatmung wurde am EcoScreen signifikant mehr ventiliert ($P=0,033$). Im Median lag das Atemminutenvolumen am EcoScreen bei 9,12 l/min (IQR: 6-11,39 l/min). Hingegen beim DECCS nur bei 6,62 l/min (IQR: 5,05-8,15 l/min) (Abbildung 23).

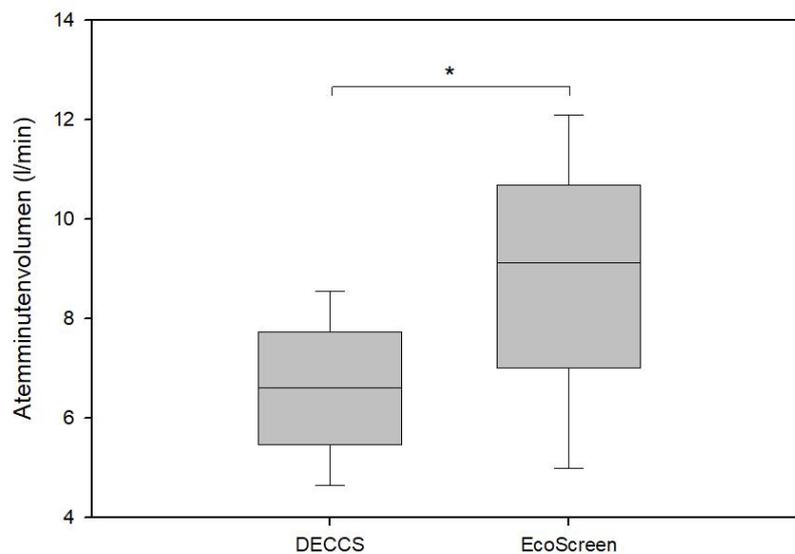


Abbildung 23: Atemminutenvolumen an beiden Atemkondensatgeräten im Vergleich Vergleich des ventilierten Atemminutenvolumens bei Gezeitenatmung an beiden Atemkondensatgeräten im Vergleich – gemessen mittels Gasometer

5 Diskussion

Das Atemkondensat (EBC = exhaled breath condensate) besteht aus einer Vielzahl flüchtiger und nicht-flüchtiger Substanzen (Pauling et al., 1971), welches für ein großes Einsatzspektrum bei Lungenerkrankungen genutzt werden könnte. Dies reicht von der Verlaufskontrolle und Therapieüberwachung bei entzündlichen Atemwegserkrankungen (Antczak et al., 2000; Dohlman et al., 1993; Ganas et al., 2001; Gessner, 2005; Hunt et al., 2000; Vaughan et al., 2003) bis hin zur Tumordiagnostik und -nachsorge (G.E. Carpagnano et al., 2002; Kordiak et al., 2012).

Um diesen Einsatz zu realisieren, muss die Methode der EBC-Gewinnung standardisiert sein und reproduzierbare Ergebnisse liefern. Diese Studie untersuchte den Einfluss zweier Sammelsysteme für Atemkondensat auf die Messergebnisse verschiedener Parameter.

Bei gleicher Patienten- bzw. Probandengruppe fiel bei unseren Untersuchungen vor allem ins Auge, dass beim EcoScreen-System sowohl die Kondensatausbeute als auch die Protein- und Nitritwerte in den gewonnen Proben signifikant erhöht waren. Ebenso waren die Werte für die PCR-Fähigkeit des EcoSystems deutlich besser als im zweiten verwendeten EBC-Gewinnungssystem, dem DECCS-System.

Die Kondensatmenge ist nicht nur entscheidend für die Gewinnung von ausreichend Material hinsichtlich weiterer Untersuchungen. Auch die benötigte Zeit für die Gewinnung spielt eine wichtige Rolle. Je mehr Kondensat in kurzer Zeit gesammelt werden kann, desto weniger belastend und aufwendig ist dies für den Patienten.

Mit 1,1 ml im Vergleich zu 0,78 ml konnte mit dem EcoScreen signifikant mehr Atemkondensat in einer 10 Minuten-Sammelphase gewonnen werden. Betrachtet man das EBC-Volumen der untersuchten Gruppen innerhalb jedes Gerätes, so ergab sich zwischen diesen Gruppen kein Unterschied. Dies war insofern zu erwarten, da die Kondensatausbeute kein Marker einer Krankheitsaktivität ist, sondern Ausdruck der Effektivität der Kondensatgewinnung. So wurde bereits gezeigt, dass es keinen Zusammenhang zwischen den Lungenfunktionseinschränkungen (FEV oder FVC) und dem EBC-Volumen gibt (Gessner et al., 2001). Allerdings existiert ein linearer Zusammenhang zwischen dem EBC-Volumen und dem Atemzugvolumen bzw. mit dem Atemminutenvolumen (Debley et al., 2011; Gajdocsi et al., 2011; Gessner et al., 2001; Goldoni et al., 2005; Hüttmann et al., 2011; Liu and Thomas, 2007; McCafferty et al., 2004). Aus diesem Wissen resultierte die Hypothese, dass durch den verschiedenen Aufbau der Atemkondensatgeräte eine unbewusste Änderung des Atemmusters ebenso zu dem Unterschied an Kondensatausbeute beiträgt. Dies bestätigt sich insofern, als dass beim EcoScreen mit 9,12 l/min im Vergleich zu 6,62 l/min beim DECCS-System ein höheres Atemminutenvolumen bei den untersuchten Probanden nachweisbar war.

Die genaue Ursache ist dabei aktuell spekulativ. Allerdings scheint eine Erhöhung des Atemwiderstandes durch das schmalere Mundstück oder Ventile möglich.

Ein führender Faktor der EBC-Produktion scheint die Temperatur des Kühlsystems zu sein. In der zusätzlich durchgeführten Testreihe an 8 Probanden konnte beim DECCS-System durch die Reduktion der Temperatur von $-5,5^{\circ}\text{C}$ auf -20°C eine Steigerung der durchschnittlichen Kondensatmenge von 1 ml auf 1,65 ml erzielt werden. Dies wird unterstützt durch die Untersuchungen anderer Autoren, welche durch Temperaturreduktion (-20°C auf -70°C bzw. 4°C auf -20°C) eine signifikant bessere EBC-Ausbeute erzielen konnten (Czebe et al., 2008; Vyas et al., 2012). Auch in den Untersuchungen von Goldoni et al. bestätigt sich der Trend zur Erhöhung des EBC-Volumens bei sinkenden Temperaturen (Goldoni et al., 2005). Da der Atemkondensator der Firma Medivac bei höheren Temperaturen als der EcoScreen arbeitet, wäre dies eine Erklärung für die geringere Kondensatproduktion beim DECCS-System.

Der Einfluss der Temperatur kommt auch bei einem anderen System, dem „R-Tube“, zum Tragen. Hier startet zwar die EBC-Gewinnung bei einer ähnlichen Temperatur wie der EcoScreen, ist diesem aber trotzdem in der Atemkondensatausbeute unterlegen (Liu et al., 2007). Dies kann zum Teil durch das verwendete Kühlsystem erklärt werden. Der R-Tube verwendet einen „Cooling sleeve“ (Kühlhülle) aus Aluminium, welcher sich im Verlauf der Sammelphase erwärmt und damit die Temperatur nicht auf dem gleichen Niveau halten kann. Es bleibt jedoch zu vermuten, dass dies nicht der einzige Faktor ist, der die Kondensatbildung beeinflusst. Ein weiterer Faktor wäre der Aufbau des Sammelbehälters. Der Sammelbehälter (Tube) des EcoScreen-Systems weist im Vergleich zu dem des DECCS und des R-Tubes mehrere metallene Trennwände auf, die den Sammelbehälter selbst zusätzlich in mehrere Kammern teilt. Dadurch erhöht sich die Kondensationsoberfläche erheblich und bedingt so eine höhere Kondensatbildung. Unterstützt wird dies durch die Untersuchung von Gessner et al, welche durch eine Verdopplung der Kondensationsoberfläche eine fast doppelt so hohe Kondensatausbeute erzielen konnten (Gessner et al., 2001).

Auch die Materialauswahl des Sammelbehälters kann entscheidend sein. Da Metalle im Vergleich zu Kunststoff eine deutlich bessere Temperaturleitfähigkeit aufweisen (Hopmann et al., 2015), kann der Tube des EcoScreens, der aus Teflon ist, die Kälte besser leiten. Dies ist insofern entscheidend, da bereits gezeigt wurde, welchen Einflussfaktor die Temperatur auf das EBC-Volumen hat. Aufgrund dieser Faktoren ist der EcoScreen in der Kondensatbildung dem DECCS deutlich überlegen. Hierdurch ermöglicht das höhere Probenvolumen bei gleicher Untersuchungszeit eine größere Anzahl an möglichen Untersuchungen.

Neben dem Probenvolumen wurde ebenso der pH-Wert der EBC-Proben untersucht. Der Proben pH-Wert gilt laut einiger Autoren als ein robuster Parameter, welcher unabhängig von Entnahmedauer, Lagerung oder Atemmuster ist (Hüttmann et al., 2011; McCafferty et al.,

2004; Vaughan et al., 2003). Auch eine durch Metacholin-ausgelöste Obstruktion bei sonst gut eingestelltem Asthma, hatte keinen Einfluss auf den pH-Wert. Niedrigere pH-Werte korrelieren mit verschiedenen Atemwegserkrankungen, sowie oxidativem Stress und Entzündungsparametern im Sputum (Hunt et al., 2000; Kostikas et al., 2002; Leung et al., 2006; Papaioannou et al., 2011). Im aktuellen Gerätevergleich konnte ein signifikanter Unterschied des pH-Wertes gezeigt werden. Mit 7,368 lag dieser beim EcoScreen-System höher als bei den EBC-Proben des DECCS-Systems (pH 7,21).

Obwohl der pH-Wert als Marker für eine akute Exazerbation und Infektion von chronischen Atemwegserkrankungen beschrieben ist, ließ sich bei den Atemkondensatproben der Lungengesunden, COPD- und Lungenkarzinompatienten ein ähnlicher pH-Wert in den Proben des DECCS nachweisen (pH 7,15, 7,17 und 7,24). Eine signifikante Differenz, die den Einsatz im klinischen Alltag erlauben würde, bestand nicht.

Anders gestaltet sich dies beim EcoScreen. Die Proben der Probanden sind signifikant azidotischer (pH 7,19) als die der COPD-Patienten (pH 7,49). Auch im Vergleich der Probanden mit den Lungenkarzinompatienten zeigt sich die gleiche Tendenz mit niedrigeren pH-Werten bei den Lungengesunden (pH 7,19 vs. 7,36). Der mediane pH-Wert der Probandenproben des EcoScreen-Gerätes liegt etwa auf dem Niveau der pH-Werte aller Gruppen des DECCS. Allerdings widersprechen unsere Ergebnisse diesbezüglich den bisherigen Studiendaten, welche vor allem bei einer schweren COPD niedrige pH-Werte fanden (Kostikas et al., 2002; Papaioannou et al., 2011). Der Proben pH-Wert bei COPD-Patienten lag in diesen Studien bei 7,16 und 7,21, während die Probanden bei 7,57 und 7,5 lagen. Die Ergebnisse sind dahingehend sehr kongruent und überzeugend. Als physiologischen Hintergrund postulierten Hunt et al. einen antimikrobiellen Effekt durch die Atemwegsazidose und erhöhten Nitritwerte, da NO_2^- nur bei niedrigem pH-Wert in relevanten Mengen als bakteriotoxisches HNO_2 vorläge (Hunt et al., 2000). Auch Gessner et al. gehen von einem pathophysiologischen Zusammenhang mit erhöhter Surfactantproduktion und – Funktion sowie einem antibakteriellem Effekt aus (Gessner, 2005). Zudem gibt es pathophysiologische Überlegungen, dass der niedrigere pH-Wert im Zusammenhang mit der Atemwegsobstruktion (Ricciardolo et al., 1999) steht. Da in den beiden genannten Studien vor der pH-Messung eine Entlüftung der Proben mittels Argon erfolgte, sind die Absolutwerte nicht unmittelbar vergleichbar. Das pH-Verhältnis von COPD-Patienten und Probanden sollte allerdings gleich sein. Allerdings muss eingeräumt werden, dass diese Studie nicht darauf ausgelegt war, einen Vergleich zwischen Lungengesunden und – kranken zu beweisen, sondern seinen Schwerpunkt auf der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zwischen verschiedenen Kondensatoren bei gleichen Probandengut hat. Daher sollte dieses Ergebnis kritisch betrachtet werden. Anzunehmen ist, dass viele der COPD-Patienten aufgrund ihrer hospitalisierungspflichtigen Exazerbation unter einer hochdosierten Glukokortikoidtherapie

standen. Antus et al fanden zwar keine Differenz des EBC-pH im Rahmen einer Exazerbation und nach Therapie, allerdings fand sich in dieser Studie auch kein Unterschied zwischen Lungengesunden und COPD-Patienten. Entsprechend der Annahme, dass der pH-Wert das Entzündungsgeschehen sowie oxidativen Stress widerspiegelt, sollte sich unter Therapie ein Wiederanstieg erreichen lassen. Zumindest für Asthmatiker wurde dieser Effekt bereits mehrfach gezeigt (Antus et al., 2010; Brunetti et al., 2006; Hunt et al., 2000). Aber auch für COPD-Patienten konnte in einer anderen Studie ein solcher Effekt nachgewiesen werden (Warwick et al., 2013). Hinzu kommt, dass auch aktiver Tabakkonsum Einfluss auf den EBC pH-Wert hat (Antus et al., 2010). Die von uns untersuchten Personen wurden jedoch nicht nach diesem Parameter differenziert. Möglicherweise sind die oben genannten Ursachen für das unerwartete pH-Verhältnis zwischen COPD-Patienten und Lungengesunden verantwortlich.

Unabhängig davon zeigte sich, dass die pH-Werte an den beiden Geräten different waren, wenn man die EBC-Proben ein und derselben Personen miteinander verglich. Der Atemkondensator der Firma Medivac sammelt dabei signifikant saurere Proben, jedoch gilt dies nur für die Untergruppe der Lungenkranken (7,17 zu 7,49 bzw. 7,24 zu 7,36, $P < 0,001$). Auch wenn ebenso eine geringe Tendenz zu einem niedrigeren EBC pH-Wert in den DECCS-Proben der Lungengesunden bestand, konnte hier keine Signifikanz beobachtet werden (7,15 zu 7,19, $P = 0,374$). Es finden sich einige Studien, welche den pH-Wert in Abhängigkeit vom Atemkondensatsystem untersuchten. Obwohl zum Teil ein ähnliches Kollektiv gewählt wurde, fanden sich im Vergleich des Eco-Screens mit dem bereits oben erwähnten R-Tube-System uneinheitliche Ergebnisse. Während zum Teil alkalischere Proben dem EcoScreen zugeschrieben werden konnten (Antus et al., 2010; Czebe et al., 2008; Leung et al., 2006; Prieto et al., 2007), fanden andere keinen Unterschied (Hüttmann et al., 2011; Koczulla et al., 2009; Soyer et al., 2006). Ein ähnliches Bild zeichnet sich bei Betrachtung der Untersuchungen ab, welche den Einfluss der Temperatur auf den pH-Wert untersuchten. Czebe et al. fanden am R-Tube bei Lungengesunden einen signifikanten Einfluss der Sammeltemperatur auf den pH-Wert (Czebe et al., 2008). Die EBC-Proben waren bei -70°C saurer als jene, welche bei -20°C gesammelt wurden, wobei sich die Differenz in einem sehr kleinen Rahmen (pH 5,99 zu 5,82) bewegte. Ein ähnliches Probandenkollektiv fand sich in der Studie von Vaughan et al. Hier konnte jedoch kein Einfluss der Sammeltemperatur ($+13^{\circ}\text{C}$ bis -44°C) auf den pH-Wert gezeigt werden (Vaughan et al., 2003). Die Autoren diskutierten den fehlenden Einfluss auf den pH-Wert kritisch und stellten die Hypothese auf, dass sich bei Erkrankungen der Atemwege doch eine Beeinflussung zeigen lassen müsste, da flüchtige wasserlösliche Säuren hier vermehrt nachzuweisen sind und sie vermuteten, dass diese besser in einer flüssigen Phase eingefangen werden könnten. Diese Theorie könnte eine Erklärung für unsere Ergebnisse bieten. Die Proben des DECCS-Systems werden in flüssiger Phase gesammelt

und könnten demnach mehr flüchtige Säuren lösen und auf diese Weise einen niedrigeren pH aufweisen als die Proben des EcoScreens, welche in fester Phase gesammelt werden. Ebenso würde dies den fehlenden Unterschied bei den Probanden-Proben erklären.

Obwohl der pH-Wert als robuster Parameter gilt, fallen bei den Recherchen die differenten Ergebnisse in den bisherigen Studien auf. Möglicherweise liegt dies auch an den unterschiedlichen Verfahrensweisen bezüglich der Entlüftung von Proben vor der pH-Wert-Messung, da die CO₂-Konzentration der Proben den pH-Wert relevant beeinflusst (Kullmann et al., 2007). Einige Autoren bevorzugen daher eine Behandlung mit Argon oder mit CO₂. Dabei unterscheiden sich aber auch hier die Protokolle der Verfahren, zum Beispiel bezüglich Dauer oder Fluss (Koczulla et al., 2009; Prieto et al., 2011). Andere verwerten den pH-Wert direkt nach der Sammelphase ohne die Proben zu entlüften. Es herrscht diesbezüglich Uneinigkeit, da die Verfahren einen zusätzlichen Aufwand bedürfen und auch bei unentlüfteten Proben signifikante Differenzen zwischen Erkrankten und Gesunden zu finden sind (Leung et al., 2006). Zudem sind die pH-Werte auch dann reproduzierbar (Leung et al., 2006; Liu et al., 2007). Es scheint daher weitere Studien mit größeren Kollektiven von Lungengesunden und -erkrankten zu benötigen, um die Frage der standardisierten pH-Messung zu klären. Danach kann der Einfluss einzelner Parameter wie Kondensatortemperatur und Oberfläche des Sammelbehälters auf den pH-Wert besser untersucht werden.

Nachweisbares Protein ist Grundvoraussetzung für eine weitere Analyse des Proteoms, welche die Entdeckung und Analyse von Biomarkern verschiedener entzündlicher und tumoröser Atemwegserkrankungen ermöglicht (Fumagalli et al., 2012; López-Sánchez et al., 2017). Für viele Parameter der Atemkondensatmessung gilt, dass sich deren Konzentrationen in einem sehr niedrigem Bereich bewegen und so zum Teil an der Nachweisbarkeitsgrenze der Testverfahren liegen (Horváth et al., 2005). Für eine erfolgreiche Proteom-Analyse muss der Atemkondensator zunächst ausreichend Protein einfangen, sodass sich für den Vergleich der beiden EBC-Sammelgeräte die Gesamtproteinkonzentration als Parameter anbot und gewählt wurde. Auch bei diesem Parameter konnten mit dem EcoScreen-Kondensator bessere Ergebnisse erzielt werden. Während in fast der Hälfte (n=23) der Atemkondensatproben des DECCS-Systems die Proteinkonzentration unterhalb der Nachweisgrenze lag, traf dies nur auf eine Probe des EcoScreen-Systems zu. Mit dem EcoScreen-System konnte nicht nur signifikant in mehr Proben Protein nachgewiesen werden, auch die Proteinkonzentration war in den Protein-positiven Proben relevant höher als in den Proben, die mit dem DECCS-System gesammelt wurden (14,07 µg/ml vs. 24,57 µg/ml). Dies unterstreicht die Vorteile des EcoScreens-Systems auch bezüglich der Fähigkeit Protein im Atemkondensat zu gewinnen.

Insgesamt ergab sich ein Trend zu höherem Proteinanteil bei den Probanden, ohne dass jedoch eine signifikante Differenz zu den anderen Gruppen bestand (32,68 µg/ml zu 27,71

bzw. 22,84 µg/ml). Durch weitere Differenzierung der Proteine mittels Flüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie könnte in zukünftigen Arbeiten geklärt werden, inwieweit Verschiebungen, Up- oder Downregulation von Proteinen dieses Phänomen verursachen.

Es bleibt die Frage zu klären, warum die beiden Geräte sich auch hier so relevant unterscheiden. Bereits andere Studien zeigten bezüglich der Proteinausbeute eine Überlegenheit des EcoScreen-Systems gegenüber anderen Atemkondensatgeräten (Czebe et al., 2008). Dabei scheint die niedrige Temperatur, welche so entscheidend für die Kondensatmenge ist, keinen Einfluss auf die Proteinkonzentration zu haben. Durch Temperaturreduktion konnte weder beim R-Tube-System noch bei einem anderen selbstgebauten System die Proteinkonzentration beeinflusst werden (Czebe et al., 2008; Vyas et al., 2012). Unsere Ergebnisse stützen diese Daten. Trotz Reduktion der Temperatur von -5°C auf -25°C konnte bei sonst unveränderten Gegebenheiten mit dem DECCS-System nicht mehr Protein nachgewiesen werden.

Eine andere Hypothese war der Proteinverlust durch das Schlauchsystem, welches dem Sammelbehälter des DECCS-Systems vorgeschaltet ist und so die nachfolgende Proteinausbeute reduzieren könnte. Allerdings veränderte auch eine Kürzung des Schlauchsystems die Proteinausbeute nicht, sodass dies nicht ursächlich zu sein scheint. Dies passt zu den Ergebnissen von Gessner et al., welcher in einem zweiten nachgeschalteten Tube die gleiche Proteinkonzentration erzielen konnten (Gessner et al., 2001).

Wahrscheinlicher erscheint, dass die Oberfläche des Sammelbehälters für die Adhäsion der Proteine entscheidend sein könnte, um die Differenz zwischen den Geräten zu erklären. Ein in-vitro-Versuch mit verschiedenen Sammelbehältern aus Silikon, Borosilikatglas, Aluminium, Polypropylen und Teflon konnte bereits zeigen, welchen entscheidenden Einfluss die Oberfläche auf die Proteinausbeute hat (Rosias et al., 2006). Die Albuminausbeute variierte aus einer definierten Albumin-Kochsalz-Mischung zwischen 22,9% und 94,7% in Abhängigkeit des verwendeten Materials. Dabei stachen vor allem die Glas- und Silikonoberfläche heraus. Mit diesen Materialien wurde signifikant mehr Albumin gesammelt, wobei sich dieser Effekt für die in-vivo-Versuchsreihe nur für die Glasoberfläche reproduzieren ließ. Allerdings konnte in der in-vitro-Reihe dieser Studie kein relevanter Unterschied zwischen Polypropylen und Teflon nachgewiesen werden, was den Materialien der hier verwendeten Sammelbehälter entspricht und somit keine ausreichende Erklärung für die schlechte Proteinausbeute des DECCS-Systems bieten würde (Rosias et al., 2006). Kritisch anzumerken bei dieser Studie ist, dass in dieser in nur einer von vierzig mit EcoScreen gesammelten Proben Protein gefunden wurde und dies deutlich unter unseren Werten liegt. Aufgrund dieser Arbeit führten Liu et al. weitere Untersuchungen bezüglich der verwendeten Materialien durch. Hier ließ sich bei Probanden eine Überlegenheit des EcoScreen-Systems im Vergleich zu Glas oder silikonisiertem Glas

sowie dem R-Tube-System nachweisen (Liu et al., 2007) und steht damit nicht im Einklang mit der zuvor erwähnten Studie. Es muss angenommen werden, dass nicht nur die Adhäsion an der Oberfläche selbst, sondern auch weitere Unterschiede im Aufbau der Kondensatoren, welche Atmung, Luftfluss, Wirbelbildungen etc. verändern, Einfluss auf die Proteinausbeute nehmen.

Proteine unterscheiden sich in ihrer spezifischen Gestalt und Oberflächenladung voneinander (Selzer et al., 2004; Tomiuk and Loeschcke, 2017; Watson et al., 2011), was wiederum einen Einfluss auf die Bindungs- und Löslichkeitseigenschaften hat (Jansohn and Rothhämel, 2012; Tippkötter, 2010; Voet et al., 2010). Daher ist zu diskutieren, ob auch Unterschiede im Proteom selbst durch verschiedene Löslichkeiten oder Adhäsionseigenschaften der Proteine eine Varianz im Ergebnis bedingen. Es wäre zumindest eine Erklärung, warum in den o.g. Studien eine differente Proteinausbeute am gleichen Atemkondensator bei Veränderung im untersuchten Patientengut zu finden ist.

Das höhere Atemminutenvolumen am EcoScreen scheint nicht der ausschlaggebende Faktor für die besseren Proteinwerte zu sein. Weder McCafferty, noch Gessner et al. fanden eine höhere Proteinkonzentration bei höheren Atemminutenvolumen. Die Gesamtproteinmenge stieg linear zum ventilierten Volumen und damit auch Atemkondensatvolumen an (Gessner et al., 2001; McCafferty et al., 2004). Demgegenüber steht eine Studie, in welcher durch eine gezielte 10-minütige Hyperventilation eine Steigerung der absoluten Proteinmenge aber auch -konzentration am EcoScreen-System erzielt werden konnte (Hüttmann et al., 2011). Allerdings wurden hier noch höhere Atemminutenvolumen erreicht als in den Untersuchungen von Gessner und McCafferty. Möglicherweise sind bei einem hohen expiratorischem Fluss noch andere Mechanismen relevant, welche den Proteinanteil beeinflussen können (Hüttmann et al., 2011). Diese Theorie wurde durch die Korrelation von höheren expiratorischen Luftströmen mit der Proteinkonzentration in einem größeren Tierversuch (n=352) unterstützt (Reinhold et al., 2006).

Doch das EcoScreen-System zeigte sich nicht nur in seiner Fähigkeit Proteine zu sammeln überlegen. Auch in der Asservierung von DNA-Material, welches entscheidend für den Einsatz der Atemkondensatmessung in Tumorüberwachung oder Screeningverfahren ist, dominiert dieses Atemkondensatgerät. Obwohl mit den Actinprimern bereits ein sogenanntes house keeping Gen gewählt wurde, welches sowohl bei Lungengesunden als auch -kranken gut nachzuweisen sein müsste, gelang lediglich in 2 der 30 untersuchten DECCS-Proben ein Nachweis. Deutlich besser sah das Ergebnis beim EcoScreen aus. Hier ließen sich in 13/30 Proben PCR-Produkte in relevanter Menge nachweisen.

In der Literatur finden sich vorwiegend Untersuchungen, welche molekulargenetische Veränderungen bei Karzinompatienten im Atemkondensat untersuchen. Die EBC-Gewinnung erfolgt dabei meist mit dem EcoScreen-Gerät der Firma Jaeger (Carpagnano et al., 2005;

Chen et al., 2015; Gessner, 2004; Kordiak et al., 2019; Youssef et al., 2018). Vergleiche zwischen Geräten, die den Einfluss auf die Asservierung von DNA-Material untersuchen, finden sich nicht. Unsere Ergebnisse zeigen jedoch, dass die Wahl des Atemkondensatgerätes einen signifikanten Einfluss auch auf die Nachweisbarkeit von DNA hat und daher weiterführende Studien notwendig sind. Anzunehmen ist, dass die bereits diskutierten Punkte, welche die Proteinkonzentration beeinflussen, ebenso einen Einfluss auf die Gewinnung von DNA-Material haben.

Als ein weiterer häufig untersuchter Parameter wurde die Nitritkonzentration verglichen, welche mit verschiedenen Atemwegserkrankungen wie Asthma bronchiale (Hunt et al., 2000) oder Mukoviszidose (Corradi et al., 2001) in Verbindung gebracht wird und u.a. mit Entzündungsparametern (Ho et al., 1998) und mechanischem Stress (Gessner et al., 2006) korreliert. Auch bei der Nitritkonzentration gab es beim DECCS-Systems mehr Proben, welche sich unterhalb der Nachweisgrenze befanden. Allerdings war die Anzahl dieser nicht so hoch wie bei der Proteinmessung. Insgesamt war in vier Proben des DECCS der Nitritgehalt zu niedrig. Dies betraf ausschließlich die Lungengesunden und ist dadurch erklärbar, dass erhöhte Nitritwerte vor allem bei Atemwegserkrankungen zu finden sind. Hinzu kommt, dass der DECCS-Atemkondensator offensichtlich auch in der Fähigkeit Nitrit in den Proben einzufangen schlechter ist und sich dadurch die Konzentrationen vermehrt an der Nachweisgrenze der Assays befanden. So lag das Mittel vom Nitrit in den Proben des EcoScreens bei 19,26 $\mu\text{mol/l}$, während die des DECCS nur 4,65 $\mu\text{mol/l}$ enthielten. Die Signifikanz zwischen den Sammelsystemen war auch in den Gruppen der Lungenkarzinom- und COPD-Patienten nachweisbar. In der Untergruppe der Probanden ergab sich ein Trend ($P=0,06$) zu einer deutlich niedrigeren Nitritkonzentrationen in jenen Proben, welche mittels DECCS-Gerät gesammelt wurden.

Die einzelnen Gruppen innerhalb beider Systeme zeigten ein ähnliches Verteilungsmuster. Die höchsten Werte fanden sich bei den COPD-Patienten. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Daten anderer Arbeiten, in welchen eine Korrelation hoher Nitritwerte mit Atemwegserkrankungen und Entzündungen beschrieben ist (Ho et al., 1998). Zudem konnte bei invasiver Beatmung ein Zusammenhang zwischen hohen Nitritwerten und mechanischer Dehnung nachgewiesen werden (Gessner et al., 2006). Ob dies ebenso für die dynamische und statische Überblähung bei COPD-Patienten zutrifft, ist aktuell nicht ausreichend untersucht, würde aber zu den Ergebnissen passen.

Wie auch bei den anderen Parametern bleibt zu diskutieren, wieviel Einfluss die Differenz in Temperatur, Tube-Oberfläche oder anderen Aufbaudifferenzen wie verfügbare Kondensationsoberfläche, Widerstandserhöhungen etc. einen Einfluss auf die Parameter haben.

Durch Temperaturreduktion konnte eine Steigerung der Kondensatausbeute jedoch ohne gleichzeitige Erhöhung der Proteinkonzentration gezeigt werden. Auch für Nitrit konnte durch eine Temperaturreduktion von 4°C auf -20°C keine relevante Änderung der Werte erbracht werden (Vyas et al., 2012). Dies kann dadurch bedingt sein, dass durch die Temperaturreduktion eben nicht nur vermehrt flüchtige und nicht-flüchtige Substanzen zu EBC kondensieren, sondern auch ein hoher Anteil an Wasser, sodass letztendlich die Konzentration nur wenig beeinflusst wird. Für Wasserstoffperoxid und Malondialdehyd konnte gezeigt werden, dass deren Absolutmenge durch ein Absenken der Temperatur erhöht wird, die Konzentration aber durch eine zunehmende Verdünnung abnimmt (Goldoni et al., 2005). Da für Nitrit und Protein gezeigt werden konnte, dass deren Konzentration gleich bleibt, ist anzunehmen, dass die Kondensatbildung dieser Bestandteile im gleichen Verhältnis mit denen des Wassers steigt (Czebe et al., 2008; Vyas et al., 2012). Die einzelnen EBC-Bestandteile scheinen sich hier temperaturabhängig unterschiedlich zu verhalten bzw. unterschiedliche Löslichkeiten zu zeigen.

Untersucht man die Atemkondensatproben mittels Flüssig- und Gaschromatographie, fällt auf, dass der Aggregatzustand der EBC-Proben (flüssig oder Eis) einen großen Einfluss auf die darin enthaltenen Verbindungen hat. So lassen sich vor allem flüchtige und polare nichtflüchtige Verbindungen bei sehr niedrigen Temperaturen nachweisen. Einige Metabolite wie Peptide oder Aminosäuren (u.a. Serin, Valin) konnten sogar nur bei -56°C nachgewiesen werden (Zamuruyev et al., 2018). Generell muss eingeschätzt werden, dass die unterschiedliche Löslichkeit einzelner EBC-Bestandteile sowohl von der Temperatur als auch dem Aggregatzustand abhängig sein kann. Dies bedeutet, dass keine pauschale Aussage getroffen werden kann, bei welcher Temperatur das beste Sammelergebnis erzielt wird, sondern dies kann für jeden Parameter unterschiedlich sein und müsste entsprechend ausgetestet werden.

Dass das Material des Sammelbehälters sowie dessen Oberflächenbeschichtung einen relevanten Einfluss auf die Zusammensetzung des Atemkondensates nimmt, wurde bereits für die Proteinkonzentration gezeigt. Es ist daher anzunehmen, dass auch die Nitritkonzentration hierdurch beeinträchtigt wird. Für Stickoxid, welches durch Reaktion mit Sauerstoff und Zersetzung von Peroxynitrat zu Nitrit und Nitrat umgewandelt wird (Ahmadzai et al., 2013), konnten im Teflon-beschichteten Tube des EcoScreens signifikant höhere Werte ($25,7 \pm 9,1$ nmol) als bei silikonisiertem Glas ($3,0 \pm 0,7$ nmol) nachgewiesen werden (Liu et al., 2007).

Die Tube-Oberfläche scheint jedoch auch nicht alle Parameter gleichwertig zu beeinflussen. Während bei einem in-vitro-Versuch mit mehreren Oberflächen, die Proteinausbeute durch Verwendung von Silikon und Glas gesteigert werden konnte, lag die Ausbeute für Isoprostan bei allen Materialien (Glas, Silikon, Teflon, Aluminium, Polypropylen) gleich hoch (Rosias et al., 2006). Es wurde gezeigt, dass eine Vielzahl an Verbindungen an der Oberfläche des

Sammelbehälters verbleibt und so gar nicht seinen Weg in das gesammelte Atemkondensat findet. Es erscheint logisch, dass dies abhängig von der Adhäsionseigenschaft des Tubes bei verschiedenen Oberflächen bzw. Materialien ein unterschiedliches Ausmaß annimmt und so ebenso Einfluss auf den Gehalt der Parameter im EBC hat (Zamuruyev et al., 2018).

Der Einfluss des Atemmusters ist noch nicht abschließend geklärt. Fest steht die Korrelation mit der Kondensatmenge. Obwohl einige EBC-Parameter wie Cysteinylleukotrien, pH-Wert aber auch Nitrit unabhängig von der Ventilation zu sein scheinen (Czebe et al., 2008; Debley et al., 2011; Gessner et al., 2006; McCafferty et al., 2004; Vaughan et al., 2003), gibt es auch Hinweise, dass der Atemfluss einen Einfluss auf andere Bestandteile des Atemkondensates, wie zum Beispiel Wasserstoffperoxid hat. Mit höheren Atemzugvolumen bzw. höheren expiratorischen Flüssen sinkt die Wasserstoffperoxidkonzentration (Gajdocsi et al., 2011; Schleiss et al., 2000). Für andere Bestandteile wie das Protein finden sich differente Ergebnisse. Hüttmann et al. erreichten eine Konzentrationssteigerung bei starker Hyperventilation, während McCafferty et al. und Gessner et al. keinen relevanten Unterschied bei milder Hyperventilation fanden (Gessner et al., 2001; Hüttmann et al., 2011; McCafferty et al., 2004). Möglich wäre, dass das ventilierte Atemminutenvolumen einen ähnlichen Effekt wie eine Temperaturreduktion hat und so eine höhere Kondensatausbeute bei aber nahezu gleichbleibendem Verhältnis der EBC-Bestandteile zum Wasseranteil bedingt.

Diese Studie zeigt eindrucksvoll, dass das gewählte Atemkondensatgerät ausschlaggebend für die Zusammensetzung des EBCs ist. Vor allem die niedrigere Arbeitstemperatur bedingt die deutlich bessere Kondensatausbeute durch das EcoScreen-System. Der Einfluss auf die Kondensatmenge durch Temperatur und Atemminutenvolumen ist dabei gut untersucht. Schwieriger wird es bei den flüchtigen und nicht-flüchtigen Bestandteilen des EBCs. Obwohl für Nitrit und Protein eine ähnliche Konzentrationsverteilung zwischen den untersuchten Gruppen an beiden Geräten bestand, lagen die Werte beim DECCS-System mehrfach unter der unteren Sensitivitätsgrenze der Assays. Hier hat nicht nur die Löslichkeit bei verschiedenen Temperaturen, sondern vor allem auch die Tube-Oberfläche durch unterschiedliche Adhäsionen mit den EBC-Bestandteilen einen wichtigen Einfluss. Es gibt Hinweise, dass dies für einzelne Verbindungen unterschiedlich ist. Es sind deshalb größere Untersuchungen notwendig, in welcher die Veränderung einzelner Parameter auf die Konzentrationen untersucht werden müssen.

In dieser Studie zeigt sich weiterhin deutlich, dass sich aktuell in der Atemkondensatgewinnung aufgrund der Unterschiede in den kommerziellen Systemen keine einheitlichen Ergebnisse erzielen lassen können. Die Konzentrationen der EBC-Parameter kann durch das verwendete System signifikant beeinträchtigt werden.

Trotz der zahlreichen Untersuchungen zur Atemkondensatmessung, welche gute Ansätze zum Einsatz im klinischen Alltag bietet, scheitert dies aktuell an der fehlenden

Standardisierung. Zudem existiert auf dem Markt mittlerweile eine Vielzahl etablierter Systeme, welche sich eben in diesen entscheidenden Bauteilen unterscheiden und so unweigerlich nicht die gleichen Ergebnisse erzielen können. Der Einfluss dieser Parameter muss weiter mit dem Ziel untersucht werden, den Aufbau der Geräte zu optimieren und so Untersuchungen vergleichbar zu machen. Erst dann wird die Nutzung von Atemkondensat in der klinischen Praxis möglich sein.

Zusammenfassung

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

Atemkondensat ein standardisierbares Messverfahren?

- Vergleichende Untersuchung zur Atemkondensatgewinnung mittels zweier unterschiedlicher Sammelsysteme -

Eingereicht von:

Sandra Wappler

Angefertigt in:

Abteilung für Pneumologie, Universitätsklinikum Leipzig

Betreut von:

Prof. Dr. med. H. Wirtz und

Dr. rer. nat. H. Kuhn

April 2022

Die Methode der Atemkondensatmessung kann als nicht-invasive Methode die Situation der tiefen Atemwege widerspiegeln und vermag Entzündungen, Exazerbationen aber auch maligne Prozesse zu identifizieren. Auch wenn sich anhand der bisherigen Untersuchungen diese vielfältigen Einsatzmöglichkeiten von Atemkondensat ergeben haben, muss diese wie jede Methode einen gewissen Standard erfüllen und vor allem reproduzierbare Ergebnisse liefern, um sich im Praxisalltag durchzusetzen. Doch zwischen den zur Verfügung stehenden

Systemen bestehen zum Teil erhebliche Unterschiede. Inwieweit Ergebnisse von verschiedenen Sammelsystemen vergleichbar sind, ist dabei noch nicht vollständig geklärt. Ziel der Arbeit war es daher zwei unterschiedliche Systeme (EcoScreen und TURBO DECCS) zur Atemkondensatgewinnung anhand bereits untersuchter Parameter bei gleichen Bedingungen und Probanden zu vergleichen und daraus neue Erkenntnisse zu gewinnen.

Bei unseren Untersuchungen zeigte sich eine starke Abhängigkeit der Atemkondensatbildung und der Konzentration der Bestandteile vom verwendeten Atemkondensatsystem.

Allein die Kondensatmenge unterschied sich signifikant mit höheren Volumina bei den EcoScreen-Proben. Dies erlaubt im Alltag eine kürzere Untersuchungsdauer bei gleicher Ausbeute.

Der Proben-pH gilt als robuster Parameter und konnte in verschiedenen Studien mit Verlauf und der Stärke entzündlichen Atemwegserkrankungen korreliert werden. In unseren Untersuchungen zeigte sich, dass die pH-Werte der Kondensatproben vom DECCS-System deutlich azidotischer im Vergleich zum EcoScreen-System waren. Eine Abgrenzung von Lungenkranken zu Lungengesunden gelang nur in den EcoScreen-Proben. Die Atemkondensatproben des DECCS-Systems lagen bezüglich des pH-Wertes für alle untersuchten Gruppen auf einem ähnlichen Niveau.

Ebenso wie bei der pH-Messung konnte bei der Bestimmung von Nitrit eine signifikante Differenzierung zwischen COPD und Lungengesunden nur bei den Proben des EcoScreens beobachtet werden. In allen untersuchten Gruppen wiesen die Proben des DECCS-Systems signifikant niedrigere Nitritkonzentrationen auf.

Um die Entdeckung und Analyse von Biomarkern verschiedener entzündlicher und tumoröser Atemwegserkrankungen zu ermöglichen, ist eine ausreichende Proteinkonzentration in den Atemkondensatproben notwendig. Fast die Hälfte aller Proben, welche mit dem DECCS-System gesammelt wurden, enthielten kein messbares Protein, während dies beim EcoScreen nur 1 Probe betraf. Auch die Proteinkonzentration in den Protein-positiven Proben war am EcoScreen signifikant höher.

Die Nutzung von DNA-Analysen ist ein wichtiger Faktor zur Früherkennung oder Nachsorge von Lungenkrebskrankungen. In den 30 untersuchten Proben gelang in 13 EcoScreen-Proben der Nachweis von DNA-Material, während dies nur auf 2 der Proben zutraf, welche mittels DECCS-System gewonnen wurden.

Diese Differenzen in den Kondensatergebnissen zwischen den Systemen scheinen ihre Ursache im unterschiedlichen Aufbau der verwendeten Systeme haben.

Die in dieser Studie verwendeten Systeme unterschieden sich in ihrer Arbeitstemperatur erheblich (EcoScreen-System: -30°C und DECCS-System: $-5,5^{\circ}\text{C}$), sodass hier ein Einfluss

auf das Ergebnis zu vermuten war. Entsprechende eigene Untersuchungen zeigten eine Zunahme der Kondensatmenge in Abhängigkeit von der verwendeten Temperatur beim DECCS-System. Einen Einfluss auf die Proteinkonzentration konnte nicht nachgewiesen werden.

Als weiterer wichtiger Faktor, der die Eigenschaften eines Sammelsystems bestimmt, rückt auch das verwendete Material des Sammelbehälters in den Vordergrund. Obwohl dieser Faktor in unseren Untersuchungen nicht getestet wurde, scheint das beim EcoSystem verwendete Teflon Vorteile gegen über dem Kunststoff-Tube aus Polyethylen/Polypropylen, welches beim DECCS-System genutzt wird, zu besitzen. Dieser Parameter wird auch in der Literatur entsprechend breit diskutiert.

Zusammenfassend kann man sagen, dass aktuell eine Vielzahl kommerzieller Atemkondensatsysteme existieren, welche sich zum Teil erheblich in ihrem Aufbau unterscheiden. Unsere Untersuchungen legen dar, welchen entscheidenden Einfluss das verwendete Sammelsystem auf die Ergebnisse hat und warum deshalb keine einheitlichen Ergebnisse erzielt werden konnten. Diesem Aspekt muss in der Zukunft mehr Bedeutung zugemessen werden, da sonst ein Einsatz der Atemkondensatmessung im klinischen Alltag schwer möglich ist.

Insgesamt ist deshalb eine Standardisierung beim Sammeln von Atemkondensat notwendig, um so den Einzug dieser nicht-invasiven Messmethode mit vielfältigem Einsatzgebiet in die klinische Praxis zu ebnen.

Literaturverzeichnis

- Ahmadzai, H., Huang, S., Hettiarachchi, R., Lin, J.-L., Thomas, P.S., Zhang, Q., 2013. Exhaled breath condensate: a comprehensive update. *Clin. Chem. Lab. Med.* 51. <https://doi.org/10.1515/cclm-2012-0593>
- Akmatov, M.K., Steffen, A., Holstiege, J., Bätzing, J., n.d. Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) in der ambulanten Versorgung in Deutschland – Zeitliche Trends und kleinräumige Unterschiede. <https://doi.org/10.20364/VA-19.06>
- Antczak, A., Kurmanowska, Z., Kasielski, M., Nowak, D., 2000. Inhaled glucocorticosteroids decrease hydrogen peroxide level in expired air condensate in asthmatic patients. *Respir. Med.* 94, 416–421. <https://doi.org/10.1053/rmed.1999.0801>
- Antczak, A., Montuschi, P., Kharitonov, S., Gorski, P., Barnes, P.J., 2002. Increased exhaled cysteinyl-leukotrienes and 8-isoprostane in aspirin-induced asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 166, 301–306. <https://doi.org/10.1164/rccm.2101021>
- Antus, B., Barta, I., Kullmann, T., Lazar, Z., Valyon, M., Horvath, I., Csiszer, E., 2010. Assessment of exhaled breath condensate pH in exacerbations of asthma and chronic obstructive pulmonary disease: A longitudinal study. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 182, 1492–1497. <https://doi.org/10.1164/rccm.201003-0451OC>
- Arndt, T., Gressner, A.M., 2013. *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik.*, 2., überarbeitete und erw. Aufl. ed. Springer.
- Arzneimittelkommission Der Deutschen Apotheker (AMK), Arzneimittelkommission Der Deutschen Ärzteschaft (AkdÄ), Bundesarbeitsgemeinschaft SELBSTHILFE (BAG SELBSTHILFE), Deutsche Atemwegsliga, Deutsche Forschungsgruppe Pneumologie In Der Primärversorgung (DFPP), Deutsche Gesellschaft Für Allergologie Und Klinische Immunologie (DGAKI), Deutsche Gesellschaft Für Allgemeinmedizin Und Familienmedizin (DEGAM), Deutsche Gesellschaft Für Arbeitsmedizin Und Umweltmedizin (DGAUM), Deutsche Gesellschaft Für Gynäkologie Und Geburtshilfe (DGGG), Chirurgie (DGHNOKHC), D.G.F.H.-N.-O.-H., Kopf-Und Hals-, Deutsche Gesellschaft Für Innere Medizin (DGIM), Deutsche Gesellschaft Für Internistische Intensivmedizin Und Notfallmedizin (DGIIN), Deutsche Gesellschaft Für Kinder- Und Jugendmedizin (DGKJ), Deutsche Gesellschaft Für Physikalische Und Rehabilitative Medizin (DGPRM), Deutsche Gesellschaft Für Pneumologie Und Beatmungsmedizin (DGP), Deutsche Gesellschaft Für Psychosomatische Medizin Und Ärztliche Psychotherapie (DGPM), Deutsche Gesellschaft Für Rehabilitationswissenschaften (DGRW), Deutsche Gesellschaft Für Schlafforschung Und Schlafmedizin (DGSM), Deutscher Verband Für Physiotherapie (ZVK), Deutsches Kollegium Für Psychosomatische Medizin Und Psychotherapie (DKPM), FORUM Chronisch Kranker Und Behinderter Menschen Im Paritätischen Gesamtverband, Gesellschaft Für Neonatologie Und Pädiatrische Intensivmedizin (GNPI), Gesellschaft Für Pädiatrische Allergologie Und Umweltmedizin (GPA), Gesellschaft Für Pädiatrische Pneumologie (GPP), Gesellschaft Für Phytotherapie (GPT), Ärztliches Zentrum Für Qualität In Der Medizin (ÄZQ), 2018. NVL Asthma – Langfassung, 4. Auflage. Bundesärztekammer (BÄK); Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV); Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF). <https://doi.org/10.6101/AZQ/000469>
- Baraldi, E., Ghio, L., Piovan, V., Carraro, S., Ciabattoni, G., Barnes, P.J., Montuschi, P., 2003. Increased exhaled 8-isoprostane in childhood asthma. *Chest* 124, 25–31. <https://doi.org/10.1378/chest.124.1.25>
- Barnes, P.J., 2004. Mediators of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Pharmacol. Rev.* 56, 515–548. <https://doi.org/10.1124/pr.56.4.2>
- Barreto, M., Villa, M.P., Olita, C., Martella, S., Ciabattoni, G., Montuschi, P., 2009. 8-Isoprostane in exhaled breath condensate and exercise-induced bronchoconstriction in asthmatic children and adolescents. *Chest* 135, 66–73. <https://doi.org/10.1378/chest.08-0722>

- Bauer, P.C., Bonella, F., Tötsch, M., Theegarten, D., Guzman, J., Costabel, U., 2009. Die bronchoalveoläre Lavage aus klinischer Sicht. *Pneumol.* 6, 233–242. <https://doi.org/10.1007/s10405-008-0304-y>
- Bégin, R., Drapeau, G., Boileau, R., Vézina, Y., Cantin, A., Desmarais, Y., Martel, M., 1986. Enzyme activities of lung lavage in asbestosis. *Clin. Biochem.* 19, 240–243. [https://doi.org/10.1016/S0009-9120\(86\)80034-0](https://doi.org/10.1016/S0009-9120(86)80034-0)
- Bhowmik, A., Seemungal, T.A., Sapsford, R.J., Devalia, J.L., Wedzicha, J.A., 1998. Comparison of spontaneous and induced sputum for investigation of airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 53, 953–956. <https://doi.org/10.1136/thx.53.11.953>
- Biedermann, A., Köhnlein, T., 2006. Alpha-1-Antitrypsin-Mangel – eine versteckte Ursache der COPD: Überblick über Pathogenese, Diagnostik, Klinik und Therapie. *Deutsches Ärzteblatt.*
- Bondesson, E., Jansson, L.T., Bengtsson, T., Wollmer, P., 2009. Exhaled breath condensate-site and mechanisms of formation. *J. Breath Res.* 3, 016005. <https://doi.org/10.1088/1752-7155/3/1/016005>
- Brunetti, L., Francavilla, R., Tesse, R., Strippoli, A., Polimeno, L., Loforese, A., Miniello, V.L., Armenio, L., 2006. Exhaled breath condensate pH measurement in children with asthma, allergic rhinitis and atopic dermatitis. *Pediatr. Allergy Immunol. Off. Publ. Eur. Soc. Pediatr. Allergy Immunol.* 17, 422–427. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3038.2006.00426.x>
- Cáp, P., Chládek, J., Pehal, F., Malý, M., Petru, V., Barnes, P.J., Montuschi, P., 2004. Gas chromatography/mass spectrometry analysis of exhaled leukotrienes in asthmatic patients. *Thorax* 59, 465–470. <https://doi.org/10.1136/thx.2003.011866>
- Carpagnano, G.E., Barnes, P.J., Geddes, D.M., Hodson, M.E., Kharitonov, S.A., 2003. Increased leukotriene B4 and interleukin-6 in exhaled breath condensate in cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 167, 1109–1112. <https://doi.org/10.1164/rccm.200203-179OC>
- Carpagnano, G.E., Foschino-Barbaro, M.P., Mulé, G., Resta, O., Tommasi, S., Mangia, A., Carpagnano, F., Stea, G., Susca, A., Di Gioia, G., De Lena, M., Paradiso, A., 2005. 3p microsatellite alterations in exhaled breath condensate from patients with non-small cell lung cancer. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 172, 738–744. <https://doi.org/10.1164/rccm.200503-439OC>
- Carpagnano, Giovanna E., Kharitonov, S.A., Resta, O., Foschino-Barbaro, M.P., Gramiccioni, E., Barnes, P.J., 2002. Increased 8-isoprostane and interleukin-6 in breath condensate of obstructive sleep apnea patients. *Chest* 122, 1162–1167. <https://doi.org/10.1378/chest.122.4.1162>
- Carpagnano, G.E., Resta, O., Foschino-Barbaro, M.P., Gramiccioni, E., Carpagnano, F., 2002. Interleukin-6 is Increased in Breath Condensate of Patients with Non-Small Cell Lung Cancer. *Int. J. Biol. Markers* 17, 141–145. <https://doi.org/10.1177/172460080201700211>
- Carpenter, C.T., Price, P.V., Christman, B.W., 1998. Exhaled Breath Condensate Isoprostanes Are Elevated in Patients With Acute Lung Injury or ARDS. *Chest* 114, 1653–1659. <https://doi.org/10.1378/chest.114.6.1653>
- Chen, J.-L., Chen, J.-R., Huang, F.-F., Tao, G.-H., Zhou, F., Tao, Y.-J., 2015. Analysis of p16 gene mutations and their expression using exhaled breath condensate in non-small-cell lung cancer. *Oncol. Lett.* 10, 1477–1480. <https://doi.org/10.3892/ol.2015.3426>
- Corradi, M., Montuschi, P., Donnelly, L.E., Pesci, A., Kharitonov, S.A., Barnes, P.J., 2001. Increased Nitrosothiols in Exhaled Breath Condensate in Inflammatory Airway Diseases. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 163, 854–858. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.163.4.2001108>
- Czebe, K., Barta, I., Antus, B., Valyon, M., Horváth, I., Kullmann, T., 2008. Influence of condensing equipment and temperature on exhaled breath condensate pH, total protein and leukotriene concentrations. *Respir. Med.* 102, 720–725. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2007.12.013>

- Davidson, K.R., Ha, D.M., Schwarz, M.I., Chan, E.D., 2020. Bronchoalveolar lavage as a diagnostic procedure: a review of known cellular and molecular findings in various lung diseases. *2020* 12, 4991–5019.
- Davidsson, A., Naidu Sjöswärd, K., Lundman, L., Schmekel, B., 2005. Quantitative assessment and repeatability of chlorine in exhaled breath condensate. *Respir. Int. Rev. Thorac. Dis.* 72, 529–536. <https://doi.org/10.1159/000087679>
- De La Fuente, P.T., Romagnoli, M., Carlsson, L., Godard, P., Bousquet, J., Chanez, P., 1999. Eosinophilic inflammation assessed by induced sputum in corticosteroid-dependent asthma. *Respir. Med.* 93, 183–189. [https://doi.org/10.1016/S0954-6111\(99\)90006-9](https://doi.org/10.1016/S0954-6111(99)90006-9)
- Debley, J.S., Ohanian, A.S., Spiekerman, C.F., Aitken, M.L., Hallstrand, T.S., 2011. Effects of bronchoconstriction, minute ventilation, and deep inspiration on the composition of exhaled breath condensate. *Chest* 139, 16–22. <https://doi.org/10.1378/chest.10-0101>
- Dekhuijzen, P.N., Aben, K.K., Dekker, I., Aarts, L.P., Wiolders, P.L., van Herwaarden, C.L., Bast, A., 1996. Increased exhalation of hydrogen peroxide in patients with stable and unstable chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 154, 813–816. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.154.3.8810624>
- Deutsche Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V., Deutsche Atemwegsliga e.V., Gesellschaft für Pädiatrische Pneumologie e.V., Österreichische Gesellschaft für Pneumologie, 2017. S2k-Leitlinie zur Diagnostik und Therapie von Patienten mit Asthma (No. AWMF-Registernummer 020-00).
- Dohlman, A.W., Black, H.R., Royall, J.A., 1993. Expired breath hydrogen peroxide is a marker of acute airway inflammation in pediatric patients with asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* 148, 955–960. https://doi.org/10.1164/ajrccm/148.4_Pt_1.955
- Donohue, J.F., Jain, N., 2013. Exhaled nitric oxide to predict corticosteroid responsiveness and reduce asthma exacerbation rates. *Respir. Med.* 107, 943–952. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2013.02.018>
- Dweik, R.A., Boggs, P.B., Erzurum, S.C., Irvin, C.G., Leigh, M.W., Lundberg, J.O., Olin, A.-C., Plummer, A.L., Taylor, D.R., American Thoracic Society Committee on Interpretation of Exhaled Nitric Oxide Levels (FENO) for Clinical Applications, 2011. An official ATS clinical practice guideline: interpretation of exhaled nitric oxide levels (FENO) for clinical applications. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 184, 602–615. <https://doi.org/10.1164/rccm.9120-11ST>
- Erich Jaeger GmbH, 1999. Eco-Screen Benutzerhandbuch.
- Fairchild, C.I., Stampfer, J.F., 1987. Particle Concentration in Exhaled Breath. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 48, 948–949. <https://doi.org/10.1080/15298668791385868>
- Felixberger, J.K., 2017. Chemie für Einsteiger, Lehrbuch. Springer Spektrum, Berlin.
- Francoeur, C., Denis, M., 1995. Nitric oxide and interleukin-8 as inflammatory components of cystic fibrosis. *Inflammation* 19, 587–598. <https://doi.org/10.1007/BF01539138>
- Fumagalli, M., Dolcini, L., Sala, A., Stolk, J., Fregonese, L., Ferrari, F., Viglio, S., Luisetti, M., Iadarola, P., 2008. Proteomic analysis of exhaled breath condensate from single patients with pulmonary emphysema associated to alpha1-antitrypsin deficiency. *J. Proteomics* 71, 211–221. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2008.03.002>
- Fumagalli, M., Ferrari, F., Luisetti, M., Stolk, J., Hiemstra, P.S., Capuano, D., Viglio, S., Fregonese, L., Cerveri, I., Corana, F., Tinelli, C., Iadarola, P., 2012. Profiling the proteome of exhaled breath condensate in healthy smokers and COPD patients by LC-MS/MS. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 13894–13910. <https://doi.org/10.3390/ijms131113894>
- Gajdocsi, R., Bikov, A., Antus, B., Horvath, I., Barnes, P.J., Kharitonov, S.A., 2011. Assessment of reproducibility of exhaled hydrogen peroxide concentration and the effect of breathing pattern in healthy subjects. *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.* 24, 271–275. <https://doi.org/10.1089/jamp.2011.0875>
- Ganas, K., Loukides, S., Papatheodorou, G., Panagou, P., Kalogeropoulos, N., 2001. Total nitrite/nitrate in expired breath condensate of patients with asthma. *Respir. Med.* 95, 649–654. <https://doi.org/10.1053/rmed.2001.1117>
- Garey, K.W., Neuhauser, M.M., Robbins, R.A., Danziger, L.H., Rubinstein, I., 2004. Markers of Inflammation in Exhaled Breath Condensate of Young Healthy Smokers. *Chest* 125, 22–26. <https://doi.org/10.1378/chest.125.1.22>

- Gessner, C., 2005. Das Atemkondensat - nicht-invasiv gewonnene biochemische Informationen aus der Lunge. Medizinische Fakultät des Uniklinikums Leipzig.
- Gessner, C., 2004. Detection of p53 gene mutations in exhaled breath condensate of non-small cell lung cancer patients. *Lung Cancer* 43, 215–222. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2003.08.034>
- Gessner, C., Hammerschmidt, S., Kuhn, H., Seyfarth, H.-J., Engelmann, L., Sack, U., Wirtz, H., 2006. Nitrit im Atemkondensat: Ein Marker für den mechanischen Stress unter Beatmung? *Intensivmed. Notfallmedizin* 43, 270–278. <https://doi.org/10.1007/s00390-006-0713-2>
- Gessner, C., Hammerschmidt, S., Kuhn, H., Seyfarth, H.-J., Sack, U., Engelmann, L., Schauer, J., Wirtz, H., 2003. Exhaled breath condensate acidification in acute lung injury. *Respir. Med.* 97, 1188–1194. [https://doi.org/10.1016/S0954-6111\(03\)00225-7](https://doi.org/10.1016/S0954-6111(03)00225-7)
- Gessner, C., Kuhn, H., Seyfarth, H.-J., Pankau, H., Winkler, J., Schauer, J., Wirtz, H., 2001. Factors influencing breath condensate volume. *Pneumologie* 55, 414–419. <https://doi.org/10.1055/s-2001-16947>
- Gessner, C., Kuhn, H., Toepfer, K., Hammerschmidt, S., Schauer, J., Wirtz, H., 2004. Detection of p53 gene mutations in exhaled breath condensate of non-small cell lung cancer patients. *Lung Cancer Amst. Neth.* 43, 215–222. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2003.08.034>
- Gessner, C., Scheibe, R., Wötzel, M., Hammerschmidt, S., Kuhn, H., Engelmann, L., Hoheisel, G., Gillissen, A., Sack, U., Wirtz, H., 2005. Exhaled breath condensate cytokine patterns in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir. Med.* 99, 1229–1240. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2005.02.041>
- Goldoni, M., Caglieri, A., Andreoli, R., Poli, D., Manini, P., Vettori, M.V., Corradi, M., Mutti, A., 2005. Influence of condensation temperature on selected exhaled breath parameters. *BMC Pulm. Med.* 5, 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2466-5-10>
- Grob, N.M., Aytekin, M., Dweik, R.A., 2008. Biomarkers in exhaled breath condensate: a review of collection, processing and analysis. *J. Breath Res.* 2, 037004. <https://doi.org/10.1088/1752-7155/2/3/037004>
- Herold, G., 2020. Innere Medizin: eine vorlesungsorientierte Darstellung, unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung, mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis.
- Ho, L.P., Innes, J.A., Greening, A.P., 1998. Nitrite levels in breath condensate of patients with cystic fibrosis is elevated in contrast to exhaled nitric oxide. *Thorax* 53, 680–684. <https://doi.org/10.1136/thx.53.8.680>
- Hoffmann, H.J., Tabaksblat, L.M., Enghild, J.J., Dahl, R., 2008. Human skin keratins are the major proteins in exhaled breath condensate. *Eur. Respir. J.* 31, 380–384. <https://doi.org/10.1183/09031936.00059707>
- Hoffmeyer, F., Raulf-Heimsoth, M., Merget, R., Brüning, T., 2009. Atemkondensat: Eine neue Matrix zur Erfassung entzündlicher Veränderungen der Atemwege/Lunge. *Pneumologie* 426.
- Hogg, J.C., Chu, F., Utokaparch, S., Woods, R., Elliott, W.M., Buzatu, L., Cherniack, R.M., Rogers, R.M., Sciurba, F.C., Coxson, H.O., Paré, P.D., 2004. The Nature of Small-Airway Obstruction in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *N. Engl. J. Med.* 350, 2645–2653. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa032158>
- Hopmann, C., Michaeli, W., Greif, H., Wolters, L., 2015. Technologie der Kunststoffe: Lern- und Arbeitsbuch für die Aus- und Weiterbildung, 4., aktualisierte Auflage. ed. Hanser, München.
- Horváth, I., Hunt, J., Barnes, P.J., 2005. Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. *Eur. Respir. J.* 26, 523–548. <https://doi.org/10.1183/09031936.05.00029705>
- Hunt, J.F., Fang, K., Malik, R., Snyder, A., Malhotra, N., Platts-Mills, T.A., Gaston, B., 2000. Endogenous Airway Acidification: Implications for Asthma Pathophysiology. *Am. J. Respir. Crit. CARE Med.* 694.

- Huszár, E., Vass, G., Vizi, E., Csoma, Z., Barát, E., Molnár Világos, G., Herjavec, I., Horváth, I., 2002. Adenosine in exhaled breath condensate in healthy volunteers and in patients with asthma. *Eur. Respir. J.* 20, 1393–1398. <https://doi.org/10.1183/09031936.02.00005002>
- Hüttmann, E.-M., Greulich, T., Hatteso, A., Schmid, S., Noeske, S., Herr, C., John, G., Jörres, R.A., Müller, B., Vogelmeier, C., Koczulla, A.R., 2011. Comparison of Two Devices and Two Breathing Patterns for Exhaled Breath Condensate Sampling. *PLoS ONE* 6, e27467. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027467>
- Jansohn, M., Rothhämel, S. (Eds.), 2012. *Gentechnische Methoden*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-8274-2430-3>
- Karg, O., Avsar, K., Hoffmann, H., 2018. Sputumgewinnung - Schritt für Schritt. (German). *Pneumologie* 72, 782.
- Khanavkar, B., Scherff, A., 2009. Bildatlas der Bronchoskopie und Thorakoskopie, in: Nakhosteen, J.A., Khanavkar, B., Darwiche, K., Scherff, A., Hecker, E., Ewig, S. (Eds.), *Atlas und Lehrbuch der Thorakalen Endoskopie*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 261–356. https://doi.org/10.1007/978-3-540-79940-5_11
- Kharitonov, S.A., Barnes, P.J., 2002. Biomarkers of some pulmonary diseases in exhaled breath. *Biomark. Biochem. Indic. Expo. Response Susceptibility Chem.* 7, 1–32. <https://doi.org/10.1080/13547500110104233>
- Kietzmann, D., Kahl, R., Müller, M., Burchardi, H., Kettler, D., 1993. Hydrogen peroxide in expired breath condensate of patients with acute respiratory failure and with ARDS. *Intensive Care Med.* 19, 78–81. <https://doi.org/10.1007/BF01708366>
- Kireeva, G., Ryabokon, A., Kononikhin, A., Bagrov, V., Anaev, E., Pikin, O., Popov, I., Nikolaev, E., Varfolomeev, S., 2012. Protein markers in the exhaled breath condensate of lung carcinoma patients. *Eur. Respir. J.* 40, P2203.
- Koczulla, A.R., Bals, R., Vogelmeier, C., 2008. Therapie der COPD – Fortschritte und Perspektiven. *Arzneimitteltherapie, Arzneimitteltherapie* 451–60.
- Koczulla, A.-R., Greulich, T., Schmid, S., Kenn, K., Heinzlmann, I., Vogelmeier, C., 2011. COPD. *Pneumol.* 8, 359–371. <https://doi.org/10.1007/s10405-011-0515-5>
- Koczulla, R., Dragonieri, S., Schot, R., Bals, R., Gauw, S.A., Vogelmeier, C., Rabe, K.F., Sterk, P.J., Hiemstra, P.S., 2009. Comparison of exhaled breath condensate pH using two commercially available devices in healthy controls, asthma and COPD patients. *Respir. Res.* 10, 78. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-10-78>
- Konstantinidi, E.M., Lappas, A.S., Tzortzi, A.S., Behrakis, P.K., 2015. Exhaled Breath Condensate: Technical and Diagnostic Aspects. *Sci. World J.* 2015, 1–25. <https://doi.org/10.1155/2015/435160>
- Koolman, J., Röhm, K.-H., 2003. *Taschenatlas der Biochemie, 3., vollständig überarbeitete und erw. Aufl. ed*, Thieme flexibook. Georg Thieme, Stuttgart ; New York.
- Kordiak, J., Szemraj, J., Grabska-Kobylecka, I., Bialasiewicz, P., Braun, M., Kordek, R., Nowak, D., 2019. Intratumor heterogeneity and tissue distribution of KRAS mutation in non-small cell lung cancer: implications for detection of mutated KRAS oncogene in exhaled breath condensate. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 145, 241–251. <https://doi.org/10.1007/s00432-018-2779-1>
- Kordiak, J., Szemraj, J., Hamara, K., Bialasiewicz, P., Nowak, D., 2012. Complete surgical resection of lung tumor decreases exhalation of mutated KRAS oncogene. *Respir. Med.* 106, 1293–1300. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2012.06.019>
- Kostikas, K., Papatheodorou, G., Ganas, K., Psathakis, K., Panagou, P., Loukides, S., 2002. pH in Expired Breath Condensate of Patients with Inflammatory Airway Diseases. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 165, 1364–1370. <https://doi.org/10.1164/rccm.200111-068OC>
- Kroegel, C., Costabel, U. (Eds.), 2014. *Klinische Pneumologie: Das Referenzwerk für Klinik und Praxis*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart. <https://doi.org/10.1055/b-002-57146>
- Kullmann, T., Barta, I., Lazar, Z., Szili, B., Barat, E., Vallyon, M., Kollai, M., Horvath, I., 2007. Exhaled breath condensate pH standardised for CO₂ partial pressure. *Eur. Respir. J.* 29, 496–501. <https://doi.org/10.1183/09031936.00084006>

- Kurzweil, P., Scheipers, P., 2010. *Chemie: Grundlagen, Aufbauwissen, Anwendungen und Experimente*. Springer-Verlag.
- Lacombe, M., Marie-Desvergne, C., Combes, F., Kraut, A., Bruley, C., Vandenbrouck, Y., Chamel Mossuz, V., Couté, Y., Brun, V., 2018. Proteomic characterization of human exhaled breath condensate. *J. Breath Res.* 12, 021001. <https://doi.org/10.1088/1752-7163/aa9e71>
- Leader of the Working Group: P.L. Paggiaro, Members of the Working Group: Chanez, P., Holz, O., Ind, P.W., Djukanovic, R., Maestrelli, P., Sterk, P.J., 2002. Sputum induction. *Eur. Respir. J.* 20, 3S – 8s. <https://doi.org/10.1183/09031936.02.00000302>
- Leitlinienprogramm Onkologie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (AWMF), Deutschen Krebsgesellschaft e.V. (DKG), Deutschen Krebshilfe (DKH), 2018. S3-Leitlinie Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms (S3-Leitlinie No. AWMF-Registernummer: 020/007OL).
- Leung, T.F., Li, C.Y., Yung, E., Liu, E.K.H., Lam, C.W.K., Wong, G.W.K., 2006. Clinical and Technical Factors Affecting pH and Other Biomarkers in Exhaled Breath Condensate. *Pediatr. Pulmonol.* 41, 87–94. <https://doi.org/10.1002/ppul.20296>
- Liu, J., Conrad, D.H., Chow, S., Tran, V.H., Yates, D.H., Thomas, P.S., 2007. Collection devices influence the constituents of exhaled breath condensate. *Eur. Respir. J.* 30, 807–808. <https://doi.org/10.1183/09031936.00080207>
- Liu, J., Thomas, P.S., 2007. Relationship between Exhaled Breath Condensate Volume and Measurements of Lung Volumes. *Respiration* 74, 142–145. <https://doi.org/10.1159/000094238>
- López-Sánchez, L.M., Jurado-Gámez, B., Feu-Collado, N., Valverde, A., Cañas, A., Fernández-Rueda, J.L., Aranda, E., Rodríguez-Ariza, A., 2017. Exhaled breath condensate biomarkers for the early diagnosis of lung cancer using proteomics. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 313, L664–L676. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00119.2017>
- Lorenz, J., Nowak, D.A., Eberhardt, R., Herth, F., 2009. Checkliste XXL Pneumologie: inkl. CD-ROM; [mit Videosequenzen zur Bronchoskopie]; 136 Tabellen, 3., vollst. überarb. Aufl. ed, Checklisten der aktuellen Medizin. Thieme, Stuttgart.
- Loukides, S., Horvath, I., Wodehouse, T., Cole, P.J., Barnes, P.J., 1998. Elevated levels of expired breath hydrogen peroxide in bronchiectasis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 158, 991–994. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.158.3.9710031>
- Maier, H.G., 1990. *Lebensmittel- und Umweltanalytik: Methoden und Anwendungen*. Steinkopff, Darmstadt.
- Maniscalco, M., Vitale, C., Vatrella, A., Molino, A., Bianco, A., Mazzarella, G., 2016. Fractional exhaled nitric oxide-measuring devices: technology update. *Med. Devices Auckl. NZ* 9, 151–160. <https://doi.org/10.2147/MDER.S91201>
- McCafferty, J.B., Bradshaw, T.A., Tate, S., Greening, A.P., Innes, J.A., 2004. Effects of breathing pattern and inspired air conditions on breath condensate volume, pH, nitrite, and protein concentrations. *Thorax* 59, 694–698. <https://doi.org/10.1136/thx.2003.016949>
- Medivac, 2009. *Users Manual Turbo DECCS System*.
- Moloney, E.D., Mumby, S.E., Gajdocsi, R., Cranshaw, J.H., Kharitonov, S.A., Quinlan, G.J., Griffiths, M.J., 2004. Exhaled breath condensate detects markers of pulmonary inflammation after cardiothoracic surgery. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 169, 64–69. <https://doi.org/10.1164/rccm.200307-1005OC>
- Montuschi, P., Collins, J.V., Ciabattoni, G., Lazzeri, N., Corradi, M., Kharitonov, S.A., Barnes, P.J., 2000. Exhaled 8-isoprostane as an in vivo biomarker of lung oxidative stress in patients with COPD and healthy smokers. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 162, 1175–1177. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.162.3.2001063>
- Montuschi, Paolo, Kharitonov, S.A., Ciabattoni, G., Corradi, M., van Rensen, L., Geddes, D.M., Hodson, M.E., Barnes, P.J., 2000. Exhaled 8-isoprostane as a new non-invasive biomarker of oxidative stress in cystic fibrosis. *Thorax* 55, 205. <https://doi.org/10.1136/thorax.55.3.205>

- Müller, F.-M., Bend, J., Huttegger, I., Möller, A., Schwarz, C., Abele-Horn, M., Ballmann, M., Bargon, J., Baumann, I., Bremer, W., Bruns, R., Brunsmann, F., Fischer, R., Geidel, C., Hebestreit, H., Hirche, T.O., Hogardt, M., Illing, S., Koitschev, A., Kohlhäufel, M., Mahlberg, R., Mainz, J.G., Pfeiffer-Auler, S., Puderbach, M., Riedler, J., Schulte-Hubbert, B., Sedlacek, L., Sitter, H., Smaczny, C., Staab, D., Tümmler, B., Vonberg, R.-P., Wagner, T.O.F., Zerlik, J., Rietschel, E., 2015. S3-Leitlinie „Lungenerkrankung bei Mukoviszidose“: Modul 1: Diagnostik und Therapie nach dem ersten Nachweis von *Pseudomonas aeruginosa*. *Monatsschr. Kinderheilkd.* 163, 590–599. <https://doi.org/10.1007/s00112-015-3354-3>
- Müller, H.-J., Prange, D.R., 2016. PCR - Polymerase-Kettenreaktion, 2. Auflage. ed. Springer Spektrum, Berlin Heidelberg.
- Mutlu, G.M., Garey, K.W., Robbins, R.A., Danziger, L.H., Rubinstein, I., 2001. Collection and Analysis of Exhaled Breath Condensate in Humans. *Am. J. Respir. Crit. CARE Med.* 731.
- Papiaoannou, A.I., Loukides, S., Minas, M., Kontogianni, K., Bakakos, P., Gourgoulianis, K.I., Alchanatis, M., Papiris, S., Kostikas, K., 2011. Exhaled breath condensate pH as a biomarker of COPD severity in ex-smokers. *Respir. Res.* 12, 67. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-12-67>
- Pauling, L., Robinson, A.B., Teranishi, R., Cary, P., 1971. Quantitative Analysis of Urine Vapor and Breath by Gas-Liquid Partition Chromatography. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 68, 2374–2376.
- Phillips, M., Herrera, J., Krishnan, S., Zain, M., Greenberg, J., Cataneo, R.N., 1999. Variation in volatile organic compounds in the breath of normal humans. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.* 729, 75–88. [https://doi.org/10.1016/s0378-4347\(99\)00127-9](https://doi.org/10.1016/s0378-4347(99)00127-9)
- Prieto, L., Ferrer, A., Palop, J., Domenech, J., Llusar, R., Rojas, R., 2007. Differences in exhaled breath condensate pH measurements between samples obtained with two commercial devices. *Respir. Med.* 101, 1715–1720. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2007.02.023>
- Prieto, L., Orosa, B., Barato, D., Marin, J., 2011. The Effect of Different Periods of Argon Deaeration on Exhaled Breath Condensate pH. *J. Asthma* 48, 319–323. <https://doi.org/10.3109/02770903.2011.560321>
- Prof. Dr.-Ing. Steinmetz, Dr.-Ing. Martin Kahmann, Dipl.-Ing. Bernd Hömberg, 2001. *Messinformationstechnik für die liberalisierten Energiemärkte Elektrizität und Gas.* expert-Verlag, Essen.
- Pschyrembel, W. (Ed.), 2020. *Pschyrembel: klinisches wörterbuch*, 268th ed. De Gruyter, Boston.
- Radiometer Medical ApS, 2017. *ABL800 FLEX Referenzhandbuch*.
- Reinhold, P., Jaeger, J., Schroeder, C., 2006. Evaluation of methodological and biological influences on the collection and composition of exhaled breath condensate. *Biomarkers* 11, 118–142. <https://doi.org/10.1080/13547500600572764>
- Respiratory Research, 2019. *RTube™ Breath Condensate Collection Device*.
- Ricciardolo, F.L., Rado, V., Fabbri, L.M., Sterk, P.J., Di Maria, G.U., Geppetti, P., 1999. Bronchoconstriction induced by citric acid inhalation in guinea pigs: role of tachykinins, bradykinin, and nitric oxide. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 159, 557–562. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.159.2.9804022>
- RKI, 2017. 12-Monats-Prävalenz der bekannten chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) in Deutschland. <https://doi.org/10.17886/RKI-GBE-2017-053>
- Robert-Koch-Institut - Zentrum für Krebsregisterdaten, 2020. *Krebs in Deutschland für 2015/2016 (Korrigierte Fassung vom 17.08.2020) (No. 12. Ausgabe)*.
- Rosias, P.P., Robroeks, C.M., Niemarkt, H.J., Kester, A.D., Vernooy, J.H., Suykerbuyk, J., Teunissen, J., Heynens, J., Hendriks, H.J., Jobsis, Q., Dompeling, E., 2006. Breath condenser coatings affect measurement of biomarkers in exhaled breath condensate. *Eur. Respir. J.* 28, 1036–1041. <https://doi.org/10.1183/09031936.06.00110305>
- Rossmann, A., 2014. *Strukturbildung und Simulation Band 6: Simulierte Messwandler und Stellglieder.* epubli.

- Russell, R.E.K., Culpitt, S.V., DeMatos, C., Donnelly, L., Smith, M., Wiggins, J., Barnes, P.J., 2002. Release and Activity of Matrix Metalloproteinase-9 and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 by Alveolar Macrophages from Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 26, 602–609. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.26.5.4685>
- Schaberg, T., Bauer, T., Brinkmann, F., Diel, R., Feiterna-Sperling, C., Haas, W., Hartmann, P., Hauer, B., Heyckendorf, J., Lange, C., Nienhaus, A., Otto-Knapp, R., Priwitzer, M., Richter, E., Rumetshofer, R., Schenkel, K., Schoch, O., Schönfeld, N., Stahlmann, R., 2017. S2k-Leitlinie: Tuberkulose im Erwachsenenalter: Eine Leitlinie zur Diagnostik und Therapie, einschließlich Chemoprävention und -prophylaxe des Deutschen Zentralkomitees zur Bekämpfung der Tuberkulose e.V. im Auftrag der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V. *Pneumologie* 71, 325–397. <https://doi.org/10.1055/s-0043-105954>
- Schleiss, M., Holz, O., Behnke, M., Richter, K., Magnussen, H., Jorres, R., 2000. The concentration of hydrogen peroxide in exhaled air depends on expiratory flow rate. *Eur. Respir. J.* 16, 1115.
- Schröder, C., 2006. Untersuchung zu Inhaltsstoffen des Atemkondensates beim Kalb. Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin, Berlin.
- Schwedt, G., 2015. Dynamische Chemie: schnelle Analysen mit Teststäbchen. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Selzer, P.M., Marhöfer, R.J., Rohwer, A., 2004. Angewandte Bioinformatik: eine Einführung ; sowie Übungen und Lösungen, Springer-Lehrbuch. Springer, Berlin.
- Simpson, J.L., Wood, L.G., Gibson, P.G., 2005. Inflammatory mediators in exhaled breath, induced sputum and saliva. *Clin. Exp. Allergy* 35, 1180–1185. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2005.02327.x>
- Smith, C.M., Anderson, S.D., 1989. Inhalation provocation tests using nonisotonic aerosols. *J. Allergy Clin. Immunol.* 84, 781–790. [https://doi.org/10.1016/0091-6749\(89\)90309-6](https://doi.org/10.1016/0091-6749(89)90309-6)
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76–85.
- Soyer, O.U., Dizdar, E.A., Keskin, O., Lilly, C., Kalayci, O., 2006. Comparison of two methods for exhaled breath condensate collection. *Allergy* 61, 1016–1018. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2006.01064.x>
- Statistisches Bundesamt (Destatis), 2021. Gestorbene: Deutschland, Jahre, Todesursachen (Jahre 2015-2019).
- Statistisches Bundesamt (Destatis), 2020. Sterbefälle durch Krebs insgesamt 2019.
- Strumpf, I.J., Feld, M.K., Cornelius, M.J., Keogh, B.A., Crystal, R.G., 1981. Safety of Fiberoptic Bronchoalveolar Lavage in Evaluation of Interstitial Lung Disease. *Chest* 80, 268–271. <https://doi.org/10.1378/chest.80.3.268>
- Teng, Y., Sun, P., Zhang, J., Yu, R., Bai, J., Yao, X., Huang, M., Adcock, I.M., Barnes, P.J., 2011. Hydrogen peroxide in exhaled breath condensate in patients with asthma: a promising biomarker? *Chest* 140, 108–116. <https://doi.org/10.1378/chest.10-2816>
- Thermo Scientific, 2015. INSTRUCTIONS Micro BCA Protein Assay Kit.
- Tippkötter, N., 2010. Reaktionssysteme zur Aufarbeitung und Umsetzung nachwachsender Rohstoffe: Einsatz chromatographischer Verfahren sowie Membran- und Festbettreaktoren zur Verarbeitung von Molke, Stärke und Cellulose. Logos, Berlin.
- Tomiuk, J., Loeschcke, V., 2017. Grundlagen der Evolutionsbiologie und Formalen Genetik. Springer Spektrum, Berlin Heidelberg.
- Tötsch, M., Guzman, J., Theegarten, D., Schmid, K.W., Costabel, U., 2007. Bronchoalveoläre Lavage. *Pathol.* 28, 346–353. <https://doi.org/10.1007/s00292-007-0926-6>
- Vass, G., Huszár, E., Barát, E., Valyon, M., Kiss, D., Péntzes, I., Augusztinovicz, M., Horváth, I., 2003. Comparison of nasal and oral inhalation during exhaled breath condensate collection. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 167, 850–855. <https://doi.org/10.1164/rccm.200207-716BC>

- Vaughan, J., Ngamtrakulpanit, L., Pajewski, T.N., Turner, R., Nguyen, T.-A., Smith, A., Urban, P., Hom, S., Gaston, B., Hunt, J., 2003. Exhaled breath condensate pH is a robust and reproducible assay of airway acidity. *Eur. Respir. J.* 22, 889–894. <https://doi.org/10.1183/09031936.03.00038803>
- Voet, D., Voet, J.G., Pratt, C.W., Beck-Sickinger, A., Hahn, U., Häcker, B., 2010. *Lehrbuch der Biochemie, 2., aktualisierte und erw. Aufl.* ed. Wiley-VCH-Verl, Weinheim.
- Vyas, A., Zhang, Q., Gunaratne, S., Lee, W., Lin, J.-L., Lin, J.-S., Warwick, G., Thomas, P.S., 2012. The effect of temperature on exhaled breath condensate collection. *J. Breath Res.* 6, 036002. <https://doi.org/10.1088/1752-7155/6/3/036002>
- Warwick, G., Thomas, P.S., Yates, D.H., 2013. Non-invasive biomarkers in exacerbations of obstructive lung disease. *Respirol. Carlton Vic* 18, 874–884. <https://doi.org/10.1111/resp.12089>
- Watson, J.D., Biele, C., Mörl, M. (Eds.), 2011. *Molekularbiologie, 6., aktualisierte Aufl.*, [1. dt. Ausg.] ed, bio - Biologie. Pearson Studium, München.
- Youssef, O., Knuutila, A., Piirilä, P., Böhlring, T., Sarhadi, V., Knuutila, S., 2018. Hotspot Mutations Detectable by Next-generation Sequencing in Exhaled Breath Condensates from Patients with Lung Cancer. *Anticancer Res.* 38, 5627–5634. <https://doi.org/10.21873/anticancer.12897>
- Zamuruyev, K.O., Borrás, E., Pettit, D.R., Aksenov, A.A., Simmons, J.D., Weimer, B.C., Schivo, M., Kenyon, N.J., Delplanque, J.-P., Davis, C.E., 2018. Effect of temperature control on the metabolite content in exhaled breath condensate. *Anal. Chim. Acta* 1006, 49–60. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.12.025>
- Zhu, A., Ge, D., Zhang, J., Teng, Y., Yuan, C., Huang, M., Adcock, I.M., Barnes, P.J., Yao, X., 2014. Sputum myeloperoxidase in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur. J. Med. Res.* 19, 12. <https://doi.org/10.1186/2047-783X-19-12>
- Zweifel, M., Rechsteiner, T., Hofer, M., Boehler, A., 2013. Detection of pulmonary amylase activity in exhaled breath condensate. *J. Breath Res.* 7, 046007. <https://doi.org/10.1088/1752-7155/7/4/046007>

Anlagen

Anlagenverzeichnis

	<u>Seite</u>
Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit.....	79
Lebenslauf.....	80
Danksagung.....	81

Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar eine Vergütung oder geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Die aktuellen gesetzlichen Vorgaben in Bezug auf die Zulassung der klinischen Studien, die Bestimmungen des Tierschutzgesetzes, die Bestimmungen des Gentechnikgesetzes und die allgemeinen Datenschutzbestimmungen wurden eingehalten. Ich versichere, dass ich die Regelungen der Satzung der Universität Leipzig zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis kenne und eingehalten habe.

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Sandra Wappler
Geboren am: 26. Januar 1988
Geburtsort: Rochlitz

Schule & Studium

1994-1998 100. Grundschule, Leipzig
1998-2004 Georg-Christoph-Lichtenberg-Gymnasium, Leipzig
2004 - 2006 Max-Klinger-Gymnasium, Leipzig
06/2006 Abitur
2006 - 2012 Studium der Humanmedizin an der Universität Leipzig
09/2008 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
12/2012 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Staatsexamen

Praktika, Berufspraxis

08/2011-12/2011 Praktisches Jahr, Innere Medizin und Pneumologie sowie internistische Intensivmedizin, Universitätsklinikum Leipzig
12/2011-04/2012 Praktisches Jahr, Anästhesie, Intensivmedizin, Schmerztherapie und Palliativmedizin, Helios Klinikum Borna
04/2012-07/2012 Praktisches Jahr, Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie, Helios Klinikum Borna
2013-2021 Assistenzärztin in der Abteilung für Innere Medizin Pneumologie und Kardiologie, Helios Park-Klinikum Leipzig
seit 04/2021 Fachärztin für Innere Medizin und Pneumologie

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt der Klinik für Pneumologie des Universitätsklinikums Leipzig unter Leitung von Herrn Prof. Dr. med. H. Wirtz für die Möglichkeit der Durchführung meiner Promotion.

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. H. Wirtz danke ich nicht nur herzlich für die Überlassung des Themas meiner Dissertation, sondern auch für seine stetige Förderung und Unterstützung. Dies hat mein Interesse an dem Fachbereich der Pneumologie geweckt und mich letztendlich dazu veranlasst auch meinen beruflichen Werdegang diesem Gebiet zu widmen.

Gleichermaßen gilt mein herzlicher Dank den Kollegen des Forschungslabors, Herrn Dr. rer. nat. H. Kuhn und Frau C. Hänel, die stets für einen unkomplizierten Austausch und Problemlösung erreichbar waren. Mit viel Geduld und Zeit unterstützten sie mich konstruktiv bei meinem wissenschaftlichen Arbeiten, standen insbesondere für Datenerhebung und –auswertung, aber auch für allgemeine wissenschaftliche Diskussionen jederzeit zur Verfügung und haben so einen wesentlich Beitrag zum Abschluss meiner Dissertation geleistet.

Weiterhin danke ich Herrn H. Pankau, der mir insbesondere in der Anfangszeit meiner Arbeit mit Rat und Tat zur Seite stand und mir so mit seiner Erfahrung über die ersten Startschwierigkeiten hinweghalf.

Mein Dank gilt nicht zuletzt auch meiner Familie und meinen Freunden. Sie motivierten mich stets zu meiner wissenschaftlichen Arbeit und halfen mir bei der Erstellung der Dissertation mit konstruktiven Gedanken und Kritiken.