

Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie
Direktorin: Prof. Dr. G. Nöldge-Schomburg

Atemgasanalytik zur Erkennung von Bronchialkarzinomen

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock

Vorgelegt von
Annika Sawacki
Mai, 2011

Diese Arbeit wurde eingereicht am 20. Mai 2011.

1. Gutachter: Prof. Dr. Dipl. chem. Jochen Schubert
Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie
Universitätsklinikum Rostock (AÖR)

2. Gutachter: Prof. Dr. Hüseyin Ince
Zentrum für Innere Medizin, Abteilung für Kardiologie
Universitätsklinikum Rostock (AÖR)

3. Gutachter: Prof. Dr. Anton Amann
Institut für Atemgasanalytik
Medizinische Universität Innsbruck

Die Verteidigung erfolgte am 04. Oktober 2011.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Einführung	1
1.2	Untersuchung der Atemluft für die medizinische Diagnostik?	2
1.3	Zielstellung	4
2.	Material und Methoden	5
2.1	Entwicklung der Probennahmemethode	5
2.1.1	Probanden	5
2.1.2	Probennahmemethoden (im Rahmen der Methodenentwicklung)	5
2.1.2.1	CO ₂ -kontrollierte Probennahme	5
2.1.2.2	Gemischt-expiratorische Probennahme	6
2.1.2.3	Zeit-gesteuerte Probennahme	7
2.1.3	Probenanalyse	9
2.1.3.1	CO ₂ -Analyse	9
2.1.3.2	Analyse der volatilen organischen Substanzen	9
2.1.4	Normierung und statistische Analyse	10
2.2	Klinische Studie	11
2.2.1	Probanden	11
2.2.1.1	Kontrollgruppe	11
2.2.1.2	Rauchergruppe	11
2.2.1.3	Bronchialkarzinom-Patienten	11
2.2.2	Probennahme der klinischen Studie	12
2.2.3	Probenanalyse	13
2.2.3.1	CO ₂ -Analyse	13
2.2.3.2	Analyse der volatilen organischen Substanzen	13
2.2.4	Normierung und statistische Analyse	13

3.	Ergebnisse	15
3.1	Ergebnisse der Methodenentwicklung	15
3.1.1	Vergleich der CO ₂ -Konzentration als Marker für aus dem Blut kommende Substanzen	15
3.1.2	Vergleich der VOC-Konzentrationen bei verschiedenen Probennahmemethoden	17
3.1.3	Vergleich von VOC-Konzentrationen bei Bronchialkarzinompatienten und einer gesunden Kontrollgruppe	18
3.1.4	Einfluss der Konzentration eingeatmeter Substanzen auf expiratorische Konzentrationen von VOCs	19
3.2	Ergebnisse der klinischen Studie	20
3.2.1	Butan	20
3.2.2	Pentan	21
3.2.3	Heptan	22
3.2.4	Isopren	23
3.2.5	Isopropanol	24
3.2.6	Benzol	25
3.2.7	Toluol	26
3.2.8	Butanal	27
3.2.9	Hexanal	28
3.2.10	Aceton	29
3.2.11	2-Butanon	30
3.2.12	Dimethylsulfid	31
3.2.13	Acetonitril	32
3.2.14	CEA	33
3.2.15	CYFRA 21.1	34
3.2.16	NSE	35
3.2.17	Statistische Zusammenfassung VOCs und Serumentumormarkern	36
3.2.18	Vergleich von Butanal und nicht-volatilen Markern	37

4.	Diskussion	38
5.	Zusammenfassung	45
6.	Thesen	46
7.	Literaturverzeichnis	47
8.	Anhang	53
8.1	Selbstständigkeitserklärung	54
8.2	Danksagung	55
8.3	Publikationen und Tagungsbeiträge	56

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Kapnogramm	7
Abb. 2	Probennahmesystem	8
Abb. 3	Probennahmesystem-schematische Darstellung	8
Abb. 4	Quotient aus CO ₂ -Konzentrationen verschiedener Atemgasproben und endtidalen CO ₂ -Konzentrationen, gemessen bei 10 gesunden Probanden	15
Abb. 5	Quotient aus CO ₂ -Konzentrationen verschiedener Atemgasproben und endtidalen CO ₂ -Konzentrationen, 10 repetitive Messungen bei einer Probandin	16
Abb. 6	Quotient aus alveolaren (Calv) und gemischt-expiratorischen (Cmix) Konzentrationen bei 13 ausgewählten volatilen organischen Substanzen aus einer Gruppe von 10 gesunden Probanden	17
Abb. 7	Quotient aus alveolaren (Calv) und gemischt-expiratorischen Konzentrationen (Cmix) von 10 gesunden Probanden und 8 Bronchialkarzinompatienten	18
Abb. 8	Differenz zwischen alveolaren Konzentrationen (Calv) und Konzentrationen der Raumluft (CRI) normiert auf alveolare Konzentrationen (Calv-CRI/Calv)	19
Abb. 9	Vergleich expiratorischer Konzentrationen von Butan in ppb	20
Abb. 10	Vergleich der Konzentrationen (Expiration-Inspiration) von Butan in ppb	20
Abb. 11	Vergleich expiratorischer Konzentrationen von Pentan in ppb	21
Abb. 12	Vergleich der Konzentrationen (Expiration-Inspiration) von Pentan in ppb	21
Abb. 13	Vergleich expiratorischer Konzentrationen von Heptan in ppb	22
Abb. 14	Vergleich der Konzentrationen (Expiration-Inspiration) von Heptan in ppb	22
Abb. 15	Vergleich expiratorischer Konzentrationen von Isopren	23
Abb. 16	Vergleich der Konzentrationen (Expiration-Inspiration) von Isopren in ppb	23
Abb. 17	Vergleich expiratorischer Konzentrationen von Isopropanol in ppb	24
Abb. 18	Vergleich der Konzentrationen (Expiration-Inspiration) von Isopropanol in ppb	24
Abb. 19	Vergleich expiratorischer Konzentrationen von Benzol in ppb	25
Abb. 20	Vergleich der Konzentrationen (Expiration-Inspiration) von Benzol in ppb	25
Abb. 21	Vergleich expiratorischer Konzentrationen von Toluol in ppb	26
Abb. 22	Vergleich der Konzentrationen (Expiration-Inspiration) von Toluol in ppb	26
Abb. 23	Vergleich expiratorischer Konzentrationen von Butanal in ppb	27
Abb. 24	Vergleich der Konzentrationen (Expiration-Inspiration) von Butanal in ppb	27
Abb. 25	Vergleich expiratorischer Konzentrationen von Hexanal in ppb	28
Abb. 26	Vergleich der Konzentrationen (Expiration-Inspiration) von Hexanal in ppb	28
Abb. 27	Vergleich expiratorischer Konzentrationen von Aceton in ppb	29
Abb. 28	Vergleich der Konzentrationen (Expiration-Inspiration) von Aceton in ppb	29
Abb. 29	Vergleich expiratorischer Konzentrationen von 2-Butanon in ppb	30
Abb. 30	Vergleich der Konzentrationen (Expiration-Inspiration) von 2-Butanon in ppb	30

Abb. 31	Vergleich expiratorischer Konzentrationen von Dimethylsulfid in ppb	31
Abb. 32	Vergleich der Konzentrationen (Expiration-Inspiration) von Dimethylsulfid in ppb	31
Abb. 33	Vergleich expiratorischer Konzentrationen von Acetonitril in ppb	32
Abb. 34	Vergleich der Konzentrationen (Expiration-Inspiration) von Acetonitril in ppb	32
Abb. 35	Serumkonzentration von CEA in ng/ml im Vergleich der verschiedenen Untersuchungsgruppen (Kontrolle, Raucher, Bronchialkarzinompatienten)	33
Abb. 36	Serumkonzentration von Cyfra 21.1 in ng/ml im Vergleich der verschiedenen Untersuchungsgruppen (Kontrolle, Raucher, Bronchialkarzinompatienten)	34
Abb. 37	Serumkonzentration von NSE in µg/l im Vergleich der Verschiedenen Untersuchungsgruppen (Kontrolle, Raucher, Bronchialkarzinompatienten)	35
Abb. 38	ROC-Kurven von NSE, Butanal, CEA und CYFRA 21.1	37

Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Probennahmeübersicht	12
Tab. 2	Probandenübersicht der klinischen Studie	14
Tab. 3	Übersicht Bronchialkarzinompatienten	14
Tab. 4	Konzentrationen der VOCs und Serumentummarker mit statistischer Auswertung	36
Tab. 5	Vergleich von Serumentummarkern und Butanal bezogen auf Sensitivität, Spezifität und AUC	37

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ANOVA	Analysis of variance (Varianzanalyse)
AUC	Area under the curve (Fläche unter der Kurve)
Balv	alveolare Atemgasprobe im Beutel
Bmix	gemischt-expiratorische Atemgasprobe im Beutel
Ca	Karzinom
Calv	Konzentration, alveolare Atemgasprobe
CEA	Carcinoembryonales Antigen
Cmix	Konzentration, gemischt-expiratorische Atemgasprobe
CRI	Konzentration, Raumluftprobe
CT	Computertomographie
CYFRA 21.1	Cytokeratinfragment 21.1
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMS	Dimethylsulfid
Ex	Expirationsatemgasprobe
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
G	Gauge
HZV	Herzzeitvolumen
K	Kontrolle
MDA	Malondialdehyd
MODS	Multi organ dysfunction syndrome (Multiorganversagen)
n.s.	nicht signifikant
NSCLC	Non small cell lung cancer (nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom)
NO	Stickstoffmonoxid
NSE	Neuronenspezifische Enolase
PCO₂	Kohlenstoffdioxidpartialdruck
PCO₂et	endtidaler Kohlenstoffdioxidpartialdruck
PDMS	Polydimethylsiloxan
ppb	Parts per billion (Teile pro Milliarde)
ppt	Parts per trillion (Teile pro Billion)
PTR-MS	Proton transfer reaction mass spectrometry (Protonen-Transfer-Reaktions Massenspektrometrie)
R	Raucher
RNA	Ribonukleinsäure
ROC	Receiver operating characteristic
s.	signifikant
Salv	alveolare Atemgasprobe in der Spritze
SCLC	Small cell lung cancer (kleinzelliges Bronchialkarzinom)
S1Sek	Atemgasprobe 1 Sekunde nach Beginn der Expiration
SIFT-MS	Selected ion flow tube mass spectrometry

SIRS	Systemic inflammatory response syndrome (systemisches Inflammationssyndrom)
SPME	Solid phase micro extraction (Festphasen-Mikroextraktion)
Tab.	Tabelle
TIC	Total ion current (Totalionenstrom)
VOC	Volatile organic compound (flüchtige organische Substanz)

1. Einleitung

1.1 Einführung

Das Bronchialkarzinom stellt weltweit eine der häufigsten Todesursachen dar [1]. In Deutschland ist es die dritthäufigste Krebserkrankung und weist beim männlichen Geschlecht die höchste Mortalität aller Krebserkrankten auf. Nach wie vor zeigen diese Tumoren eine steigende Inzidenz, wobei in den letzten Jahren zunehmend Frauen betroffen waren. Die Hauptursache der Lungenkrebserkrankungen ist das aktive Rauchen [2]. Beim Mann sind nahezu 90% und bei der Frau 60% der Karzinome durch Tabakkonsum bedingt. Ein erhöhtes Risiko, an einem Bronchialkarzinom zu erkranken, besteht ebenfalls beim Passivrauchen [3] und einer hohen Anzahl an „pack years“ (Zahl der täglich gerauchten Packungen x Raucherjahre). Bei 40 pack years besteht ein 10fach erhöhtes Krebsrisiko. Charakteristisch für das Bronchialkarzinom ist das invasive Wachstum. Die Metastasierung erfolgt frühzeitig lymphogen und hämatogen. Die histologische Einteilung erfolgt in zwei große Gruppen. Zum einen die äußerst aggressiven kleinzelligen Bronchialkarzinome (small cell lung cancer) [4], die ungefähr 25% aller Lungenkrebserkrankungen ausmachen, und zum anderen die nicht-kleinzelligen Tumoren (non small cell lung cancer), welche weiter in Plattenepithel-, Adeno- und großzellige Tumoren unterteilt werden. Zum Zeitpunkt der Diagnose befinden sich die Patienten meist bereits in einem fortgeschrittenen Tumorstadium, da Frühsymptome in der Regel fehlen. Bei ca. 80% der Patienten mit einem SCLC sind bei Diagnosestellung bereits Metastasen vorhanden. Die Prognose der Bronchialkarzinome ist äußerst schlecht. Ungefähr 2/3 der Patienten befinden sich bei Diagnose in einem inoperablen Tumorstadium. 60% der neu Diagnostizierten überleben das darauffolgende Jahr nicht. Die 5-Jahres-Überlebensrate aller histologischen Typen insgesamt beträgt 5%. Diese Statistik hat sich in den letzten 10 Jahren nicht geändert. In weniger fortgeschrittenen Tumorstadien dagegen finden sich, zumindest für das NSCLC, 5-Jahres-Überlebensraten von 60%! Der Früherkennung dieser Krebserkrankung kommt daher große Bedeutung zu. In der Vergangenheit wurde in zahlreichen Studien versucht, ein geeignetes Screeningverfahren zu finden. Weder mit radiologischen Verfahren (Röntgen und CT) [5, 6], noch mit der Bestimmung von Serumtumormarkern oder immunologischen Komponenten [7] konnte eine frühere Diagnosestellung erreicht werden. Weitere Nachteile dieser Verfahren waren die Strahlenexposition bzw. die Entnahme von Blut oder Gewebe. Daher besteht weiterhin Bedarf an wenig- oder nicht-invasiven Screeningverfahren zur frühen Diagnose des Bronchialkarzinoms. Grundsätzlich könnte die nicht-invasive chemische Analyse der Ausatemluft für diesen Zweck eingesetzt werden.

Die Atemgasanalytik ist leicht durchführbar, völlig ungefährlich für den Patienten und mit keinem Infektionsrisiko verbunden. Auch Schmerzen und Gewebeschädigungen durch

Biopsien oder unangenehme bronchoskopische Verfahren werden mit der Atemgasanalyse vermieden. Folgeschäden sind nicht zu befürchten und die Untersuchung ist beliebig oft wiederholbar. Erste Pilotstudien zur Früherkennung verschiedener Krebsarten [8,9,10,11] unterstreichen das klinische Potential dieses Verfahrens.

1.2 Untersuchung der Atemluft für die medizinische Diagnostik?

Die Geschichte der Atemgasanalytik findet ihren Ursprung bereits vor ca. 2500 Jahren zu Zeiten Hippokrates [12]. Der Begründer der wissenschaftlichen Medizin erkannte die Aussagekraft des Geruches kranker Menschen und sah in ihm einen Spiegel von Vorgängen innerhalb des Körpers. Er brachte den Mundgeruch (Halithosis) mit Zahnfleischerkrankungen (Parodontopathien) in Verbindung. Durch genaue Beobachtung der Kranken gelang es den charakteristischen süßlich-fruchtigen Geruch von Ketonkörpern Patienten mit entgleistem Diabetes mellitus, einen fischähnlichen Geruch Lebererkrankungen, einen fauligen Geruch abszedierenden Lungenprozessen oder einen ammoniakähnlichen Geruch schweren Nierenerkrankungen zuzuordnen. Einen weiteren Meilenstein in der Historie der Atemgasanalyse setzten 1780 Lavoisier und de Laplace. Sie entdeckten, dass Sauerstoff im Körper zu Kohlenstoffdioxid und Wärme umgesetzt wird [13]. Um 1800 konnte A. Nebelthau große Mengen Aceton mittels einer alkalischen Jodfalle bei Patienten mit Diabetes mellitus nachweisen. Ein Durchbruch gelang dem zweifachen Nobelpreisträger Linus Pauling im Jahre 1971 [14]. Sein besonderes Interesse galt flüchtigen organischen Substanzen (VOCs), die einen Anteil von weniger als einem Prozent der Expirationsluft ausmachen. Aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften gelangen die VOCs aus dem Blut über die Lunge in die Ausatemluft und sind dort im Spurenbereich (ppb-ppt) nachweisbar. Mit der technischen Weiterentwicklung der Gaschromatographie waren mehr als 300 VOCs im Exhalat detektierbar. Damit ebnete Linus Pauling den Weg für die moderne Atemgasforschung. Eine genaue Identifizierung der Substanzen war allerdings aufgrund der unzureichenden Trennung der Analyten damals noch nicht möglich.

Mit der technischen Entwicklung stieg die Zahl der nachweisbaren Substanzen seit Beginn der 80er Jahre deutlich an. Derzeit können mehr als 3000 VOCs in der Atemluft detektiert werden. Das Spektrum umfasst einfach aufgebaute Alkane (z.B. Ethan, Pentan), Alkohole (z.B. Ethanol), Aldehyde (z.B. Acetaldehyd, Hexanal), ungesättigte Verbindungen (z.B. Isopren), aromatische Verbindungen (z.B. Benzol-, Phenyl-derivate) und schwefelhaltige Verbindungen (z.B. Kohlenstoffdisulfid, Merkaptane). Zum Nachweis der Substanzen kommen neben laborbasierten Verfahren wie zum Beispiel der Kombination von Gaschromatographie und Massenspektrometrie (GC-MS) [15] auch Methoden zum Einsatz, die eine Echtzeitmessung vor Ort ermöglichen. Dazu gehören z.B. die Protonen-Transfer-

Reaktions-Massenspektrometrie (PTR-MS) [16] oder die Selected Ion Flow Tube Massenspektrometrie (SIFT-MS) [17].

Anwendung findet die Atemgasanalyse in der Medizin [18, 19, 20] gegenwärtig bei der Diagnose von *Helicobacter pylori*-Infektionen mittels des Harnstoff-Atemtest, zur Bestimmung der exhalieren Kohlenstoffdioxidkonzentration mit Hilfe der Kapnographie oder zum Nachweis von Ethanol durch den gängigen Alkoholtest und seit kurzem auch zum Nachweis von NO bei Asthmatikern. An anderen diagnostischen Applikationen, wie z.B. der Früherkennung von Krebserkrankungen wird zur Zeit intensiv geforscht. Bereits 1985 veröffentlichten Gordon et. al. [21] eine Studie, in der sie 12 Lungenkrebspatienten mit einer Kontrollgruppe von 17 gesunden Probanden verglichen. In den vergangenen 25 Jahren wurden in zahlreichen Studien verschiedene flüchtige Substanzen in der Atemluft als Krebsmarker diskutiert [22, 23, 24], ohne dass klinisch einsetzbare Marker gefunden werden konnten.

Die Identifizierung von volatilen organischen Substanzen als diagnostisches Werkzeug zur Erkennung und Behandlung des Bronchialkarzinoms wird durch methodische Probleme der Atemgasanalytik erschwert [25]. Eine Standardisierung der Atemgasprobennahme [26] fehlt ebenso wie eine Lösung der Problematik von inspiratorischen Substanzkonzentrationen [27]. Aus der Umgebungsluft aufgenommene Substanzen können als endogen entstandene Marker fehlgedeutet werden. Zusätzlich können eingeatmete Substanzen im Körper gespeichert, umverteilt, metabolisiert und wieder abgeatmet werden.

1.3 Zielstellung

Ziel dieser Arbeit war es, eine Methode zu entwickeln, mit der eine reproduzierbare, stabile und physiologisch nachvollziehbare Atemgasprobennahme möglich wird. Basierend auf dieser Methode sollte in einer Pilotstudie untersucht werden, ob sich die Konzentrationsprofile volatiler organischer Substanzen im Atemgas von Nichtrauchern, Rauchern und Bronchialkarzinompatienten voneinander unterscheiden.

Folgende Fragen sollten mit dieser Arbeit beantwortet werden:

- Welchen Einfluss hat die Methode der Probennahme auf die Konzentration von Atemgasanalyten?
- Haben potentielle Störgrößen, insbesondere inspiratorische Konzentrationen, einen Einfluss auf die Atemgasuntersuchung?
- Ist es möglich Bronchialkarzinompatienten, Raucher und gesunde Probanden anhand von volatilen organischen Substanzen zu unterscheiden?
- Gibt es eine Korrelation zwischen Serumentumormarkern und Bronchialkarzinompatienten und sind diese mit einem Atemgasmarker für das Bronchialkarzinom vergleichbar?

2. Material und Methoden

2.1 Entwicklung der Probennahmemethode

2.1.1 Probanden

Nach Zustimmung der Ethikkommission und Einholen des Einverständnisses nahmen als gesunde Kontrollgruppe 7 weibliche und 3 männliche Probanden, im Alter von 22 bis 51 Jahren an der Studie teil. Zum Zeitpunkt der Probennahme nahm keiner der Teilnehmenden Medikamente ein. Das gesamte Kollektiv entstammte entweder einem medizinischen oder chemisch-wissenschaftlichen Arbeitsbereich. Alle gesunden Probanden waren Nichtraucher. Bei einer der Probandinnen wurden 10 repetitive Messungen durchgeführt.

Die Gruppe aus 8 Bronchialkarzinompatienten bildeten nach Zustimmung der Ethikkommission und Einholen des Einverständnisses Probanden zwischen 45 und 82 Jahren. Alle Patienten befanden sich in bereits fortgeschrittenen Tumorstadien. 5 der Studienteilnehmer litten an einem NCSLC und 3 der Patienten an einem SCLC. Alle Bronchialkarzinompatienten hatten eine positive Raucheranamnese von durchschnittlich 34 pack years.

2.1.2 Probennahmemethoden (im Rahmen der Methodenentwicklung)

2.1.2.1 CO₂-kontrollierte Probennahme

Der Proband wurde aufgefordert, den eigenen Atemzyklus beibehaltend, durch das Mundstück eines speziellen Abnahmesystems (siehe Abb.2), ein- und auszuatmen. Das Atemgasentnahmesystem bestand aus 8 Kunststoff-T-Stücken, welche als Zubehör von Beatmungsschlauch-Sets erhältlich waren. Jedes T-Stück war mit einem Luer-Lock-Anschluss versehen. In das System der T-Stücke wurde eine CO₂-Messküvette eines Kapnometers (Capnogard, Novamatrix, USA) eingebracht und das Ende der Konstruktion mit einem Kunststoff-Mundstück versehen. Für die Untersuchung der CO₂-Konzentration wurde eine gasdichte 20 ml Spritze aus Glas auf den Luer-Lock-Anschluss eines T-Stückes gesetzt. Nach einer Gewöhnungsphase des Probanden an das Abnahmesystem von 3 Minuten füllte man die Spritze in der alveolaren Phase der Expiration mit Atemluft (siehe Abb.3). Die endtidalen CO₂-Konzentrationen wurden notiert. Die erste Probe wurde jeweils verworfen, um die Spritze von Raumluft freizuspülen. Die zweite Probe überführte man direkt nach Abnahme in ein Blutgasanalysegerät (Radiometer 700, Kopenhagen, Dänemark).

Zur Bestimmung der volatilen organischen Substanzen wurde eine 10 ml gasdichte Glasspritze in gleicher Weise auf das T-Stück gesetzt und 11 ml des Atemgases in der Plateauphase der Expiration abgezogen. Die erste Abnahme verwarf man. Die zweite

Atemgasprobe wurde direkt in ein mit Stickstoff gespültes und evakuiertes Gläschen (Gerstel, SPME-Vial) überführt. Dazu setzte man eine Kanüle (Braun, 23G) auf die Spritze und stellte diese auf genau 10ml ein. Mit der Kanüle wurde dann das Septum des Gläschens (Gerstel, Naturkautschuk/Teflon-Bördelkappen, 1,3mm) perforiert. Aufgrund des Vakuums zog sich die Atemgasprobe selbstständig in das SPME-Vial. Außerdem sammelte man Atemgas in einem Tedlar-Beutel (SKC Sample Bag, 1 bzw. 3 Liter Fassungsvermögen), der zuvor mehrmals mit Stickstoff gespült und bei 45°C 24 Stunden ausgeheizt wurde. Dazu konnectierte man den Probenbeutel über ein Verbindungsstück mit dem Luer-Lock-Anschluss eines T-Stückes (siehe Abb.2). Nach Öffnen des Beutel-Ventils wurde in der alveolaren Phase der Beutel befüllt, indem die hinterste T-Stück-Öffnung manuell verschlossen wurde und somit die Luft in dieser Phase der Ausatmung direkt in den Tedlar-Beutel strömte. Als der Beutel zu ungefähr $\frac{3}{4}$ befüllt war, wurde das Ventil verschlossen und der Beutel vom System getrennt. Für die CO₂-Messungen verband man das Ventil des Beutels über einen ca. 3 cm langen Kunststoffschlauch mit einer 20 ml gasdichten Spritze und konnte so die Probe aufziehen. Nach Verwerfen der ersten 20 ml wurde das in der Spritze befindliche Gas direkt in das Blutgasanalysegerät überführt.

Die Probennahme zur Untersuchung volatiler organischer Substanzen erfolgte durch Perforieren des Septums des Beutel-Ventils mit einer 10 ml gasdichten Spritze, Verwerfen der ersten Probe und Überführung des Gases in ein gespültes und evakuiertes Gläschen.

Zusätzlich zu den expiratorischen Proben wurden vor und nach der Atemgasprobennahme Raumluftproben gewonnen. Dazu wurde eine 10 ml gasdichte Glasspritze mehrmals mit Raumluft gespült und schließlich 10 ml Luftprobe in ein mit Stickstoff gespültes und evakuiertes Gläschen überführt. Zur Entnahme des Atemgases befanden sich die Probanden in einem 10 Minuten lang gelüfteten Raum.

2.1.2.2 Gemischt-expiratorische Probennahme

Die Probennahme erfolgte in einem Tedlar-Beutel (Fassungsvermögen 1l bzw.3l), dessen Ventil mit dem Plastik-Mundstück verbunden war. Der Proband wurde aufgefordert, über das Probennahmesystem zu atmen (siehe Abschnitt 2.1.2.1). Sobald die Atemfrequenz und der CO₂-Partialdruck in einem konstanten Bereich lagen, wurde das System zur Seite gelegt und der Proband gebeten, in gleicher Weise weiter zu atmen, den Beutel mit Mundstück zu nehmen und diesen, einem Luftballon ähnlich, aufzublasen. Um den Probenbeutel ausreichend zu befüllen, benötigten die Probanden 1 bis 4 Expirationen. Während jeder Abnahme wurden die Atemfrequenz und der CO₂-Partialdruck dokumentiert. Nach Befüllen des Beutels wurde diesem mit einer 20 ml gasdichten Spritze Atemgas entzogen, welches

sofort mit dem Blutgasanalysegerät analysiert wurde. Der gemessene CO_2 -Partialdruck der Beutelprobe wurde dokumentiert.

Zur Entnahme des Atemgases befanden sich die Probanden in einem 10 Minuten lang gelüfteten Raum.

2.1.2.3 Zeit-gesteuerte Probennahme

Vorbereitet war, wie unter Abschnitt 2.1.2.2 beschrieben, ein Tedlar-Beutel mit Mundstück. Verfahren wurde wie bei der gemischt-expiratorischen Probennahme. Nach Einstellung eines konstanten CO_2 -Partialdrucks und gleich bleibender Atemfrequenz atmete der Proband eine Sekunde lang aus, bevor er mit dem verbleibenden Teil der Expiration den Beutel befüllte. Die Zeit von 1 Sekunde bestimmte jeder Proband selbst. Die Ermittlung der im Beutel befindlichen CO_2 -Konzentration erfolgte in gleicher Weise wie bei der gemischt-expiratorischen Probennahme.

Zur Entnahme der Atemgasproben befanden sich die Probanden in einem zuvor 10 Minuten lang gelüfteten Raum.

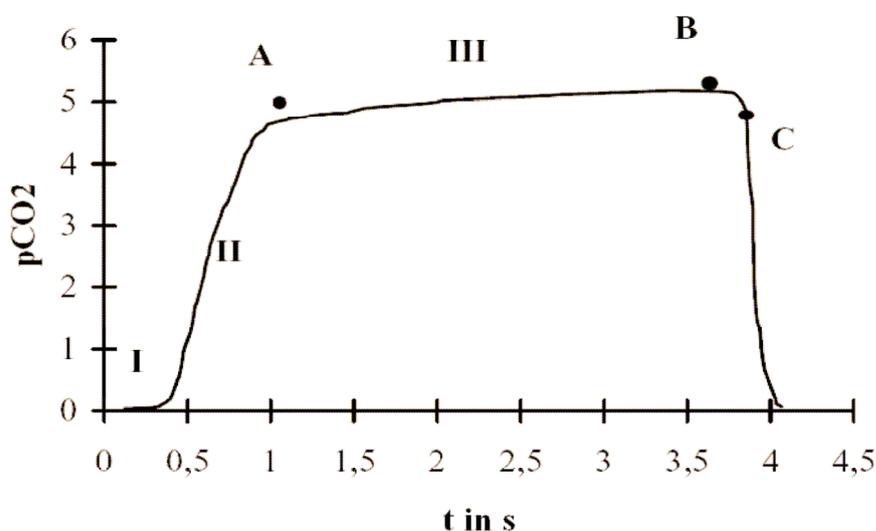


Abb.1 Kapnogramm (I:Inspiration, II: gemischt-expiratorische Phase, III: alveolare Phase/Plateau-Phase, A: Beginn des alveolaren Samplings, B: Ende des alveolaren Samplings, C: Expirationsende, pCO₂: Kohlenstoffdioxidpartialdruck), [25]

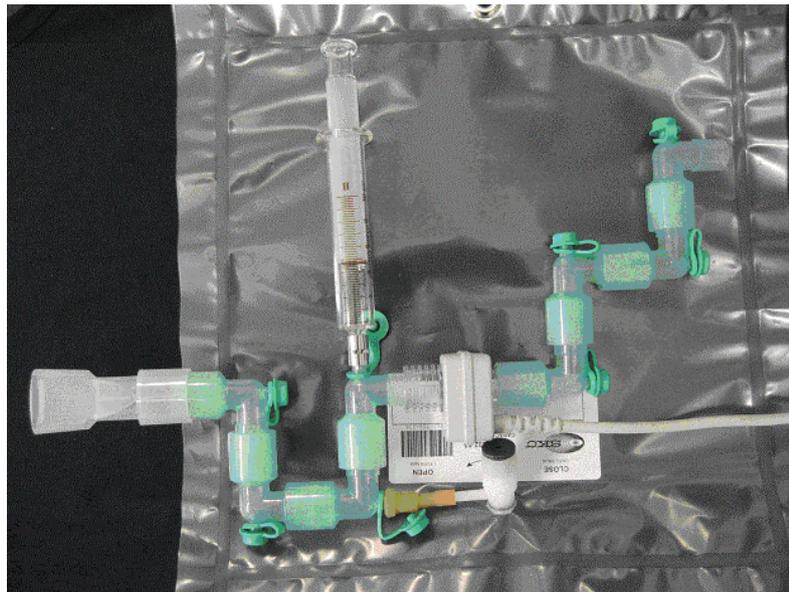


Abb.2 Probennahmesystem [25]

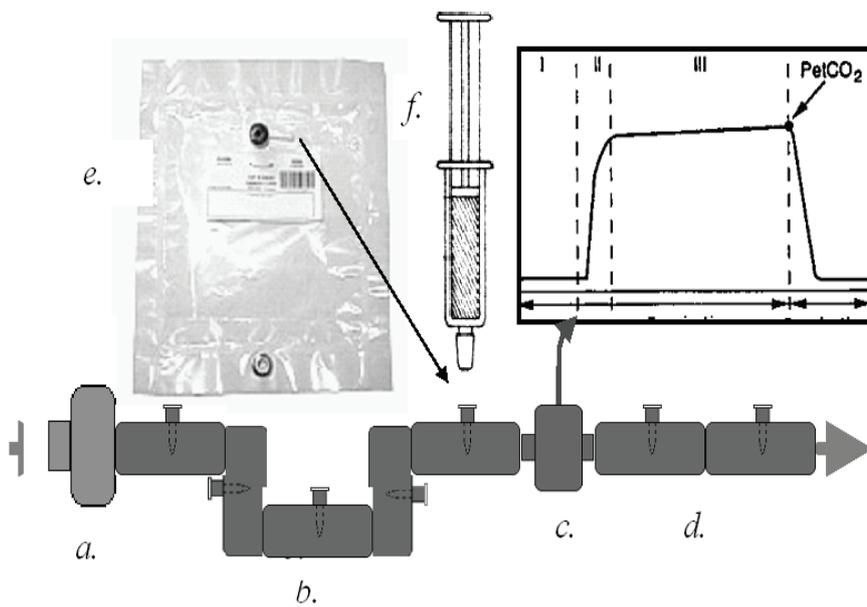


Abb.3 Probennahmesystem-schematische Darstellung [a. Mundstück, b.& d. Kunststoffrohr (artifizieller Totraum), c. CO₂-Hauptstrom-Monitor, e. Tedlar-Kunststoffbeutel, f. gasdichte Glasspritze],[25]

2.1.3 Probenanalyse

2.1.3.1 CO₂-Analyse

Die Analyse der Kohlenstoffdioxidkonzentration in gasdichten Spritzen sowie Tedlar-Beuteln erfolgte mittels eines Blutgasanalysegerätes (Radiometer 700, Kopenhagen, Dänemark).

2.1.3.2 Analyse der volatilen organischen Substanzen

Zur Analyse volatiler organischer Substanzen der Atemgasproben wurden diese mittels Festphasen-Mikroextraktion (Solid Phase Micro Extraction, SPME) präkonzentriert, gaschromatographisch getrennt und mittels Massenspektrometrie identifiziert und quantifiziert.

Für die Festphasen-Mikroextraktion wurde eine SPME-Faser, die mit Polydimethylsiloxan (PDMS) und Carboxen beschichtet war, zur Präkonzentration der Analyten genutzt. Das Verfahren beruht auf einer Gleichgewichtseinstellung der volatilen organischen Substanzen zwischen der Gasphase und der beschichteten Faser (Festphase).

Vor Messung der Atemgasproben wurde die Faser im Injektor des Gaschromatographen 30 Minuten bei 290°C konditioniert. Währenddessen wurde ein Gläschen im Schüttler des GC 3 Minuten bei 42°C erwärmt. Danach durchstach die Faser das Septum des Gläschens und wurde dort 7 Minuten zur Absorption der volatilen organischen Substanzen belassen. Nachdem es zu einer Gleichgewichtseinstellung der Analyten zwischen Atemgasprobe und Festphase der Faser gekommen war, wurde die Faser zurückgezogen und in den Injektor des Gaschromatographen überführt. Bei Temperaturen von 290°C wurden alle absorbierten Substanzen thermisch desorbiert. Mit Hilfe des Trägergases Helium (0,7 bar) wurden die Substanzen auf die Trennsäule (CP-Porabond Q Silica, 25 m x 0,32 mm) des Gaschromatographen überführt (splitless 30 s, dann Split von 1:50; Säulenfluss: 1,7 ml/min). Die Komponenten der Atemprobe wurden auf der Trennsäule entsprechend ihrer physikochemischen Eigenschaften unterschiedlich stark retiniert. Dadurch erreichten verschiedene Substanzen das Ende der Trennsäule und das Interface zum Massenspektrometer unterschiedlich schnell. Im Massenspektrometer (Varian 3800, Saturn 2100) wurden die Verbindungen durch Elektronenstoßionisation (EI, 70 eV) ionisiert und anschließend detektiert. Die Auftrennung der entstandenen Ionen erfolgte anhand ihres Masse-/Ladungsverhältnisses (m/z). Zur Identifizierung der VOCs wurde der Total Ion Current-Modus (TIC) genutzt. Die Quantifizierung erfolgte anhand charakteristischer Massenspektren der einzelnen Substanzen im Vergleich mit Referenzstandards unterschiedlicher Konzentration.

2.1.4 Normierung und statistische Analyse

Die CO₂-Konzentrationen der Atemgasproben wurden auf die endtidalen CO₂-Konzentrationen normiert. Zur statistischen Analyse der volatilen organischen Substanzen bei wiederholten Messungen nutzte man die repeated measurement (RM) Analysis of Variance oder RM ANOVA on ranks. Die Analyse der nicht-wiederholten Messungen erfolgte durch One Way ANOVA oder One Way ANOVA on ranks. Als post hoc-Test wurde der Student-Newman-Keuls oder Dunn's-Test genutzt. Das Signifikanzniveau α lag bei $p < 0,05$.

2.2 Klinische Studie

2.2.1 Probanden

2.2.1.1 Kontrollgruppe

Nach Zustimmung der Ethikkommission und Einholen des Einverständnisses untersuchten wir im Rahmen der Kontrolle 20 Probanden. Diese Gruppe bestand aus 12 weiblichen und 8 männlichen Nichtraucher/innen im Alter von 23 bis 52 Jahren.

2.2.1.2 Rauchergruppe

Nach Zustimmung der Ethikkommission und Einholen des Einverständnisses der Probanden untersuchten wir 20 Raucher. Einschlusskriterium dieser Gruppe war ein Nikotinabusus von mindestens 10 Zigaretten pro Tag. Probanden mit akuten Infektionen und Probanden mit Verdacht auf ein Karzinomleiden berücksichtigten wir nicht. 15 Frauen und 5 Männer im Alter von 24 bis 63 Jahren nahmen teil.

2.2.1.3 Bronchialkarzinompatienten

Es erfolgte die Zustimmung der Ethikkommission und das Einholen des Einverständnisses der Probanden. Die 5 weiblichen und 10 männlichen Probanden dieser Gruppe waren zwischen 51 und 78 Jahre alt. Diagnostisch wurden 7 nicht-kleinzellige und 8 kleinzellige Karzinome nachgewiesen. 14 Probanden der Gruppe besaßen eine positive Raucheranamnese.

Vor Beginn jeder Atemgasentnahme wurden alle Probanden nach Alter, Gewicht, Arbeitsumfeld, Nikotinabusus, bestehenden Erkrankungen und eingenommenen Medikamenten befragt. Außerdem gaben die Patienten an, wann sie zuletzt gegessen und getrunken hatten, ob regelmäßig Tee, Kaffee, Kakao oder Alkohol genossen wurde und ob ein dauerhafter Kaugummi-Konsum bestand. Wir erfassten den Blutdruck und Puls der Probanden direkt vor und nach der Probennahme. Durch Venenpunktion wurde den Probanden ungefähr 3 ml Blut abgenommen, um daraus die Konzentrationen der Serumtumormarker NSE, Cyfra 21.1 und CEA zu bestimmen.

2.2.2 Probennahme der klinischen Studie

Nach Auswertung der Ergebnisse der Methodenentwicklung fiel die Entscheidung für die CO₂-kontrollierte Atemgasentnahme. Die Probennahme wurde wie unter 2.1.2.1 beschrieben durchgeführt. Insgesamt entnahmen wir je Proband bzw. Patient vier Gasproben.

Probe	Erläuterungen
RI 1	Raumluftprobe 1, vor Expirationsprobennahme
Ex 1	alveolare Expirationsprobe 1
Ex 2	alveolare Expirationsprobe 2
RI 2	Raumluftprobe 2, nach Expirationsprobennahme

Tab.1 Probennahmeübersicht

Die Atemproben der gesunden Probanden wie auch der Raucher wurden in einem gut gelüfteten Klinik-fernen Raum entnommen. Alle Probennahmen an Bronchialkarzinompatienten fanden in den Patientenzimmern statt, die vorher mehrere Minuten gelüftet worden waren.

2.2.3 Probenanalyse

2.2.3.1 CO₂-Analyse

Die Analyse der Kohlenstoffdioxidkonzentration in den gasdichten Spritzen sowie Tedlar-Beuteln erfolgte mit Hilfe eines in das Kapnometer (Capnogard, Novamatrix, USA) integrierten Nebenstromverfahrens.

2.2.3.2 Analyse der volatilen organischen Substanzen

Die Analyse der volatilen organischen Substanzen erfolgte wie unter 2.1.3.2 beschrieben.

2.2.4 Normierung und statistische Analyse

Die CO₂-Konzentrationen der Atemgasproben, gemessen mittels Nebenstromverfahren, wurden auf die endtidalen CO₂-Konzentrationen normiert. Die Analyse erfolgte durch One Way ANOVA oder One Way ANOVA on ranks. Als post hoc-Test wurde der Student-Newman-Keuls oder Dunn's-Test genutzt. Das Signifikanzniveau α lag bei $p < 0,05$.

	Bronchialkarzinom	Raucher	Kontrolle
Probanden	15	20	20
Durchschnittsalter (Jahre)	68	32	29
Geschlecht (m/w)	10 / 5	5 / 15	8 / 12
Raucher/ Exraucher	4 / 10	20 / -	-
Nichtraucher	1	-	20
pack year	15-60	6-50	-

Tab.2 Probandenübersicht der klinischen Studie

Proband	Alter	Geschlecht	Pack Years	Histologie	TNM-Stadium
1	76	m	50	NSCLC	Tx Nx M0
2	55	m	19	SCLC	T3 N3 M1
3	51	m	30	NSCLC	T3 N2 M0
4	75	m	23	NSCLC	Tx Nx M0
5	70	w	15	NSCLC	T4 N2 M1
6	68	w	35	SCLC	T4 N3 M0
7	71	m	24	SCLC	T3 N2 M0
8	57	w	-	SCLC	Tx Nx Mx
9	56	m	60	SCLC	T2 N2 M1
10	67	w	40	SCLC	T3 N2 M0
11	75	m	30	SCLC	T4 N3 M0
12	78	m	30	NSCLC	Tx Nx Mx
13	73	m	50	NSCLC	Tx Nx Mx
14	70	w	20	SCLC	T4 N3 M1
15	71	m	30	NSCLC	T4 Nx M1

Tab.3 Übersicht Bronchialkarzinompatienten

3. Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der Methodenentwicklung

3.1.1 Vergleich der CO₂-Konzentration als Marker für aus dem Blut kommende Substanzen

Der Vergleich der verschiedenen Probennahmemethoden erfolgte anhand des Quotienten aus CO₂-Partialdrücken der Atemgasproben und den endtidalen CO₂-Partialdrücken gemessen direkt während der Probennahme. Bei allen Methoden waren die Werte normalverteilt.

Der Vergleich der alveolaren Probennahme über einen Atemzug (Salv) mit der alveolaren Probennahme über mehrere Atemzüge (Balv) ergab keinen signifikanten Unterschied. Unsere Studie zeigte statistisch signifikante Unterschiede zwischen den alveolaren Probennahmen (Salv, Balv) und der gemischt-expiratorischen Probennahme (Bmix). Es ergab sich ebenfalls ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Probennahme eine Sekunde nach Beginn der Expiration (S1Sek) und der gemischt-expiratorischen Probennahme (Bmix).

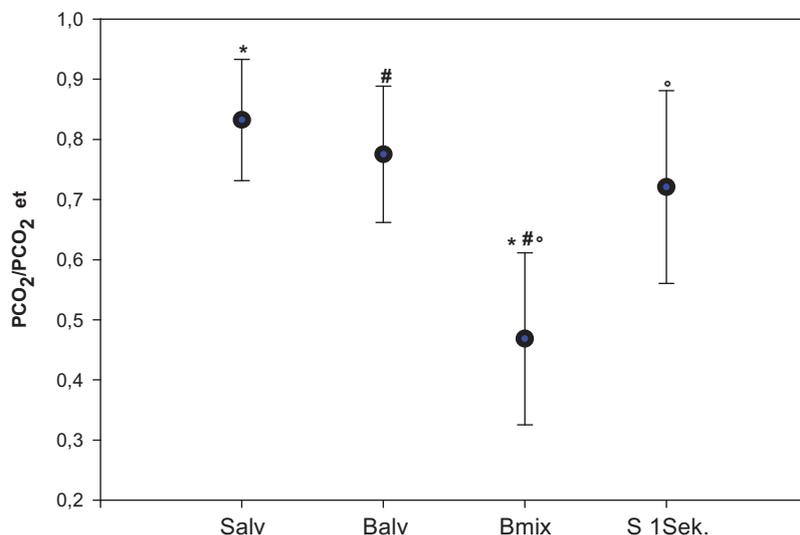


Abb.4 Quotient aus CO₂-Partialdrücken verschiedener Atemgasproben (PCO₂) und endtidalen CO₂-Partialdrücken (PCO_{2et}), gemessen bei 10 gesunden Probanden

In der folgenden Abbildung sind die Ergebnisse des Methodenvergleichs von 10 Wiederholungsmessungen bei einer Probandin dargestellt.

Aufgetragen ist das Verhältnis des CO₂-Partialdruckes in der Atemgasprobe zum endtidalen CO₂-Partialdruck gemessen im Hauptstromverfahren des Kapnometers. Die Quotienten der CO₂-Partialdrücke aller vier Methoden unterscheiden sich statistisch signifikant.

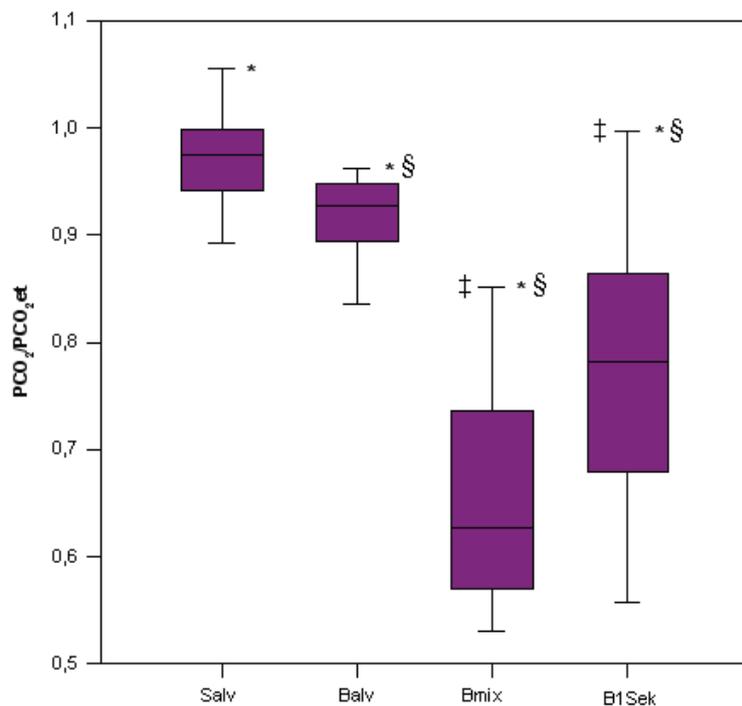


Abb.5 Quotient aus CO₂-Partialdrücken (PCO₂) verschiedener Atemgasproben und endtidalen CO₂-Partialdrücken (PCO_{2et}), 10 repetitive Messungen bei einer Probandin

3.1.2 Vergleich der VOC-Konzentrationen bei verschiedenen Probennahmemethoden

Die Auswirkung verschiedener Methoden der Probennahme ist in der folgenden Abbildung anhand des Verhältnisses von alveolaren (C_{alv}) zu gemischt-expiratorischen (C_{mix}) Konzentrationen (C_{mix}) verschiedener flüchtiger organischer Substanzen dargestellt. Aufgezeigt sind Mittelwerte und Standardfehler. Die Quotienten von CO_2 , Aceton und Isopren zeigten Werte $> 1,5$. Dagegen ergaben sich bei Acetonitril, Butan, Dimethylsulfid, Pentan, Butanal, Benzol und Hexan Werte zwischen 1,5 und 1. Quotienten der Konzentrationen von Isopropanol, 2-Butanon, Toluol und Hexanal zeigten Werte < 1 .

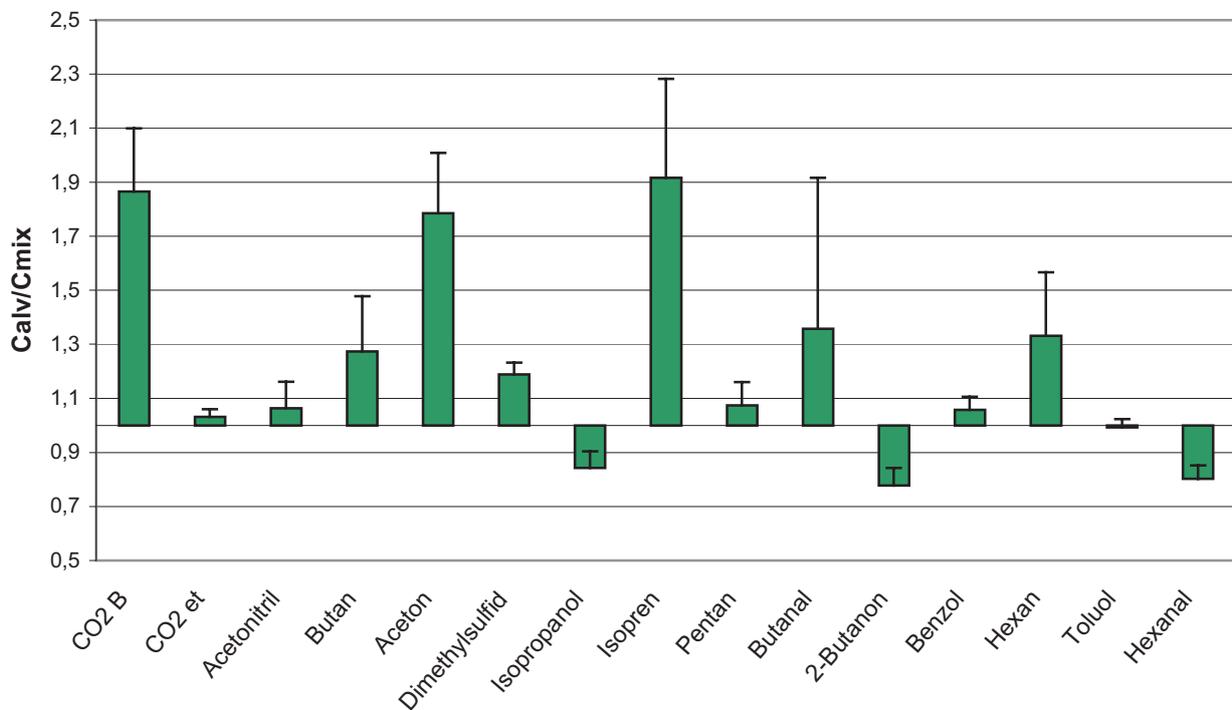


Abb.6 Quotient aus alveolaren (C_{alv}) und gemischt-expiratorischen (C_{mix}) Konzentrationen bei 13 ausgewählten volatilen organischen Substanzen aus einer Gruppe von 10 gesunden Probanden

3.1.3 Vergleich von VOC-Konzentrationen bei Bronchialkarzinompatienten und einer gesunden Kontrollgruppe

Die folgende Abbildung zeigt Mittelwerte und Standardfehler der Quotienten von Konzentrationen alveolar und gemischt-expiratorisch gewonnener Atemgasproben. Dargestellt sind 13 ausgewählte volatile organische Substanzen. 10 gesunde Probanden (Kontrolle) wurden mit einer Gruppe von 8 Bronchialkarzinompatienten verglichen.

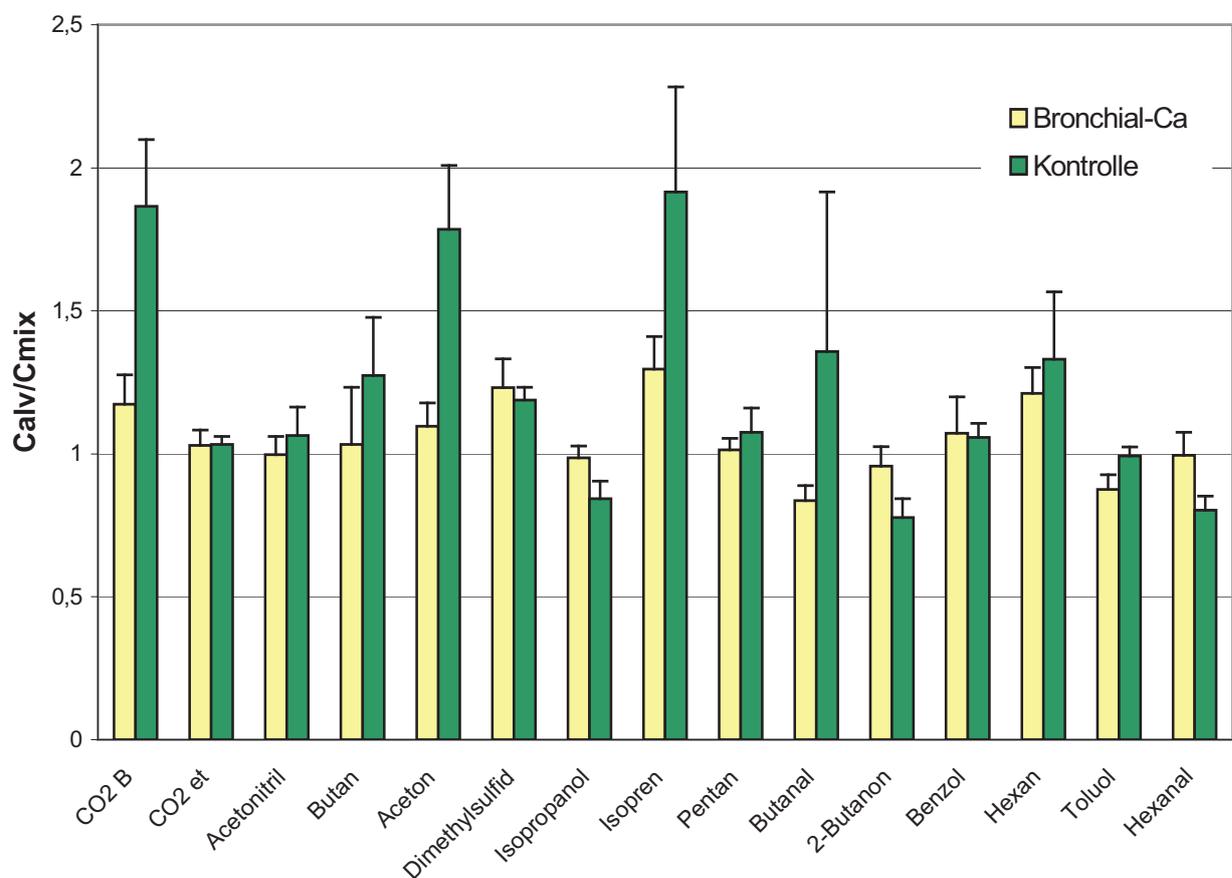


Abb.7 Quotient aus alveolaren (Calv) und gemischt-expiratorischen Konzentrationen (Cmix) von 10 gesunden Probanden und 8 Bronchialkarzinompatienten

3.1.4 Einfluss der Konzentration eingeatmeter Substanzen auf expiratorische Konzentrationen von VOCs

Die folgende Abbildung zeigt die Differenz zwischen den mittleren Konzentrationen alveolarer Atemluft (Calv) und Raumluft (CRI) ($\text{Calv}-\text{CRI}$). Die Konzentrationen wurden normiert auf die jeweiligen alveolaren Konzentrationen ($\text{Calv}-\text{CRI}/\text{Calv}$).

Dargestellt sind 13 ausgewählte flüchtige organische Substanzen. In der Abbildung angegeben sind Mittelwerte.

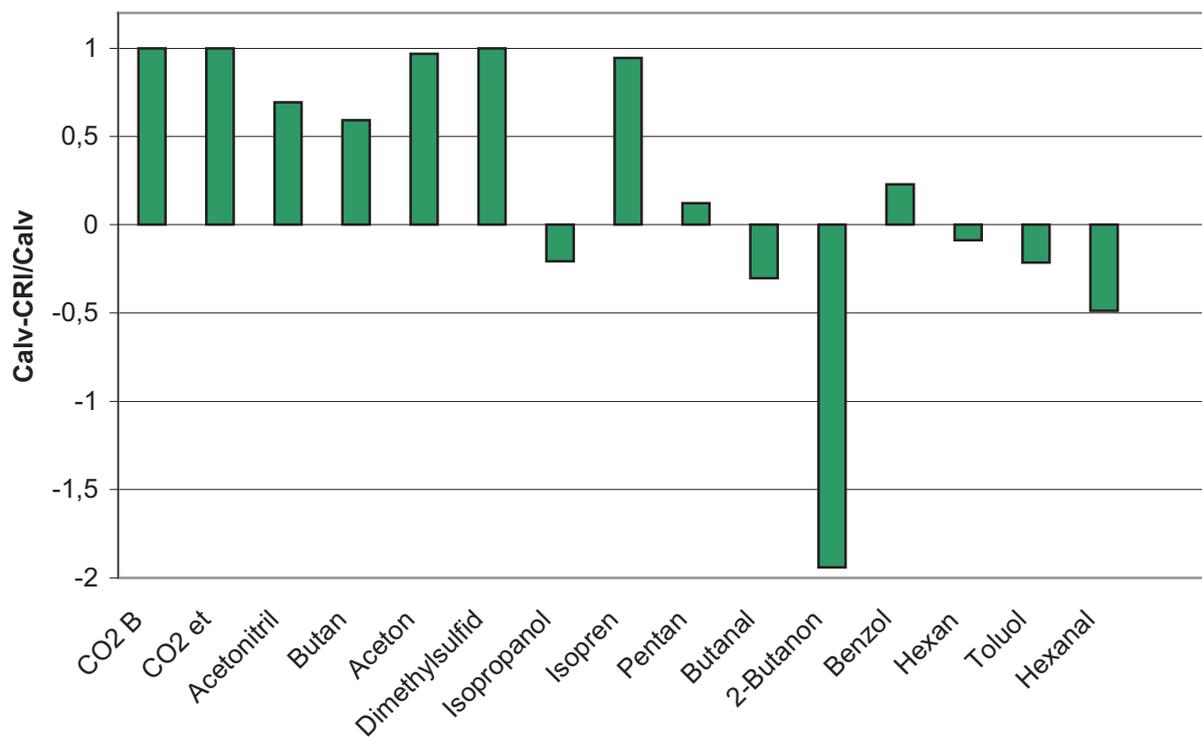


Abb.8 Differenz zwischen alveolaren Konzentrationen (Calv) und Konzentrationen der Raumluft (CRI) normiert auf alveolare Konzentrationen ($\text{Calv}-\text{CRI}/\text{Calv}$)

3.2 Ergebnisse der klinischen Studie

3.2.1 Butan

Die Abbildung 9 zeigt expiratorische Konzentrationen von Butan mit Median, 25%-Perzentile und 75%-Perzentile im Vergleich der verschiedenen Gruppen. Es stellten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen heraus. In Abbildung 10 sind die expiratorischen Konzentrationen um die inspiratorischen Konzentrationen korrigiert (Expiration-Inspiration). Auch in dieser Darstellung ergeben sich keine signifikanten Unterschiede im Gruppenvergleich. Dargestellt sind der Median, 25%- und 75%-Perzentile.

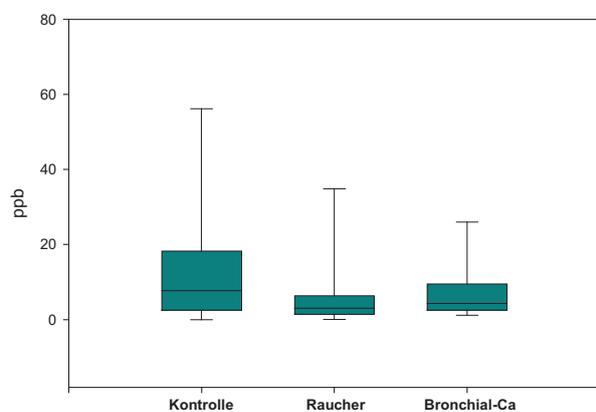


Abb.9 Vergleich expiratorischer Konzentrationen von Butan in ppb

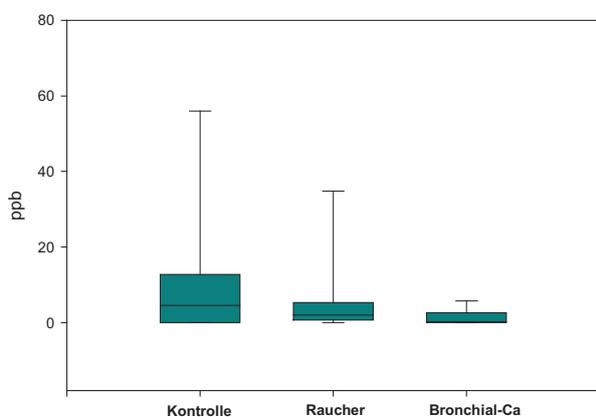


Abb.10 Vergleich der Konzentrationen (Expiration-Inspiration) von Butan in ppb

3.2.2 Pentan

Die Abbildung 11 zeigt die expiratorischen Konzentrationen von Pentan mit Median, 25%-Perzentile und 75%-Perzentile im Vergleich der verschiedenen Gruppen. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. In Abbildung 12 sind die expiratorischen Konzentrationen um die inspiratorischen Konzentrationen korrigiert (Expiration-Inspiration). Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede. Dargestellt sind der Median, 25%- und 75%-Perzentile.

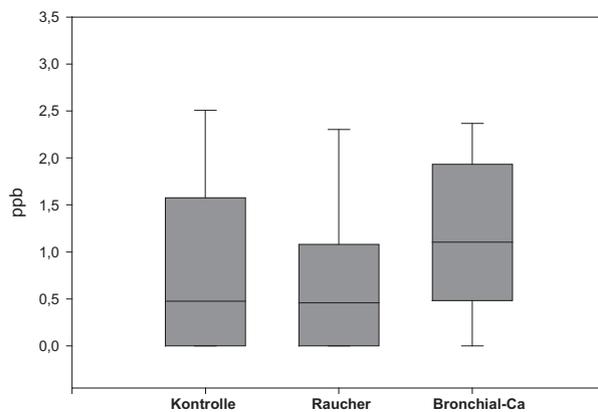


Abb.11 Vergleich expiratorischer Konzentrationen von Pentan in ppb

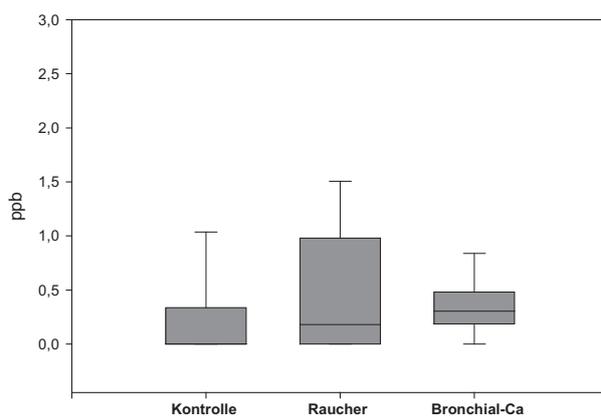


Abb.12 Vergleich der Konzentrationen (Expiration-Inspiration) von Pentan in ppb

3.2.3 Heptan

In der Abbildung 13 sind expiratorische Konzentrationen von Heptan mit Median, 25%-Perzentile und 75%-Perzentile im Vergleich der verschiedenen Gruppen dargestellt. Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Vergleichsgruppen. In Abbildung 14 sind die expiratorischen Konzentrationen um die inspiratorischen Konzentrationen korrigiert (Expiration-Inspiration). Auch in dieser Abbildung zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede. Dargestellt sind der Median, 25%- und 75%-Perzentile.

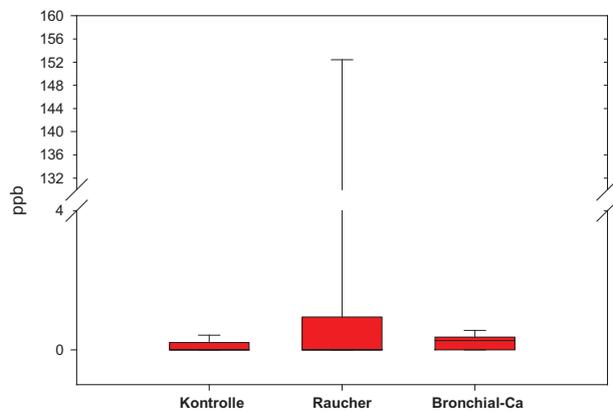


Abb.13 Vergleich expiratorischer Konzentrationen von Heptan in ppb

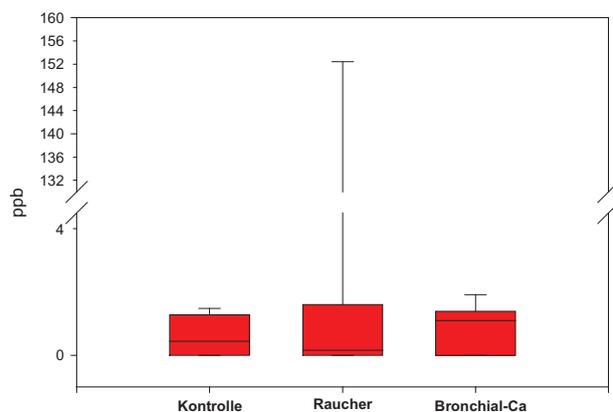


Abb.14 Vergleich der Konzentrationen (Expiration-Inspiration) von Heptan in ppb

3.2.4 Isopren

Abbildung 15 stellt die expiratorischen Konzentrationen von Isopren mit Mittelwert und Standardfehler im Vergleich der verschiedenen Gruppen dar. Die Werte waren normalverteilt. Es liegt ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Rauchern und den Bronchialkarzinompatienten vor. In Abbildung 16 sind die expiratorischen Konzentrationen um die inspiratorischen Konzentrationen korrigiert (Expiration-Inspiration). Hier blieb der statistisch signifikante Unterschied zwischen der Rauchergruppe und der Karzinomgruppe auch nach Korrektur der Expiration um die Inspiration erhalten.

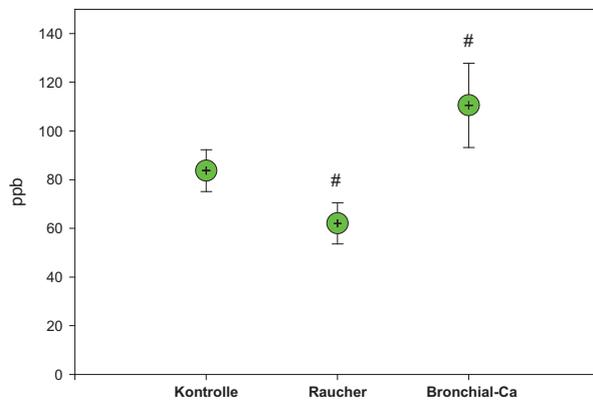


Abb.15 Vergleich expiratorischer Konzentrationen von Isopren

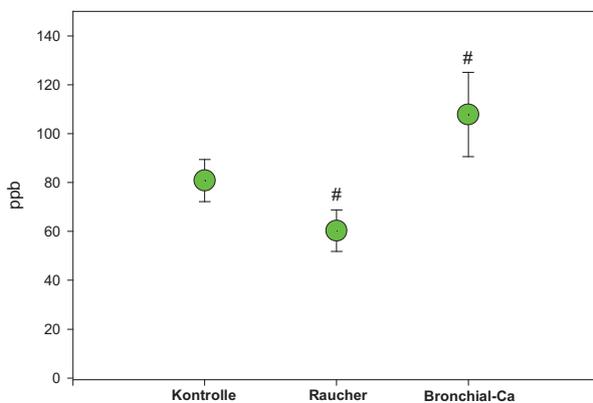


Abb.16 Vergleich der Konzentrationen (Expiration-Inspiration) von Isopren in ppb

3.2.5 Isopropanol

Abbildung 17 zeigt die expiratorischen Konzentrationen von Isopropanol mit Median, 25%-Perzentile und 75%-Perzentile im Vergleich der verschiedenen Gruppen. Für die Karzinomgruppe ergaben sich statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe und zu den Rauchern. In Abbildung 18 sind die expiratorischen Konzentrationen um die inspiratorischen Konzentrationen korrigiert (Expiration-Inspiration). Es zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Dargestellt sind der Median, 25%- und 75%-Perzentile.

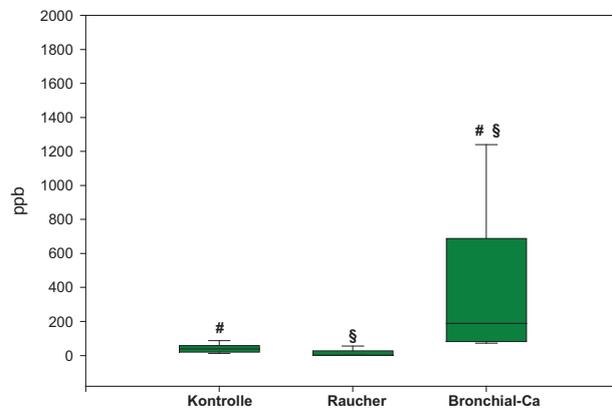


Abb.17 Vergleich expiratorischer Konzentrationen von Isopropanol in ppb

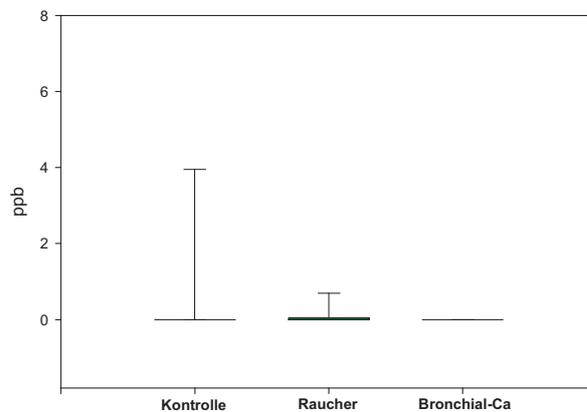


Abb.18 Vergleich der Konzentrationen (Expiration-Inspiration) von Isopropanol in ppb

3.2.6 Benzol

In Abbildung 19 sind die expiratorischen Konzentrationen von Benzol mit Median, 25%-Perzentile und 75%-Perzentile im Vergleich der verschiedenen Gruppen dargestellt. Es zeigten sich statistisch signifikante Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den Rauchern. In Abbildung 20 sind die expiratorischen Konzentrationen um die inspiratorischen Konzentrationen korrigiert (Expiration-Inspiration). Die Rauchergruppe unterschied sich statistisch signifikant von der gesunden Kontrollgruppe und von den Karzinompatienten. Dargestellt sind der Median, 25%- und 75%-Perzentile.

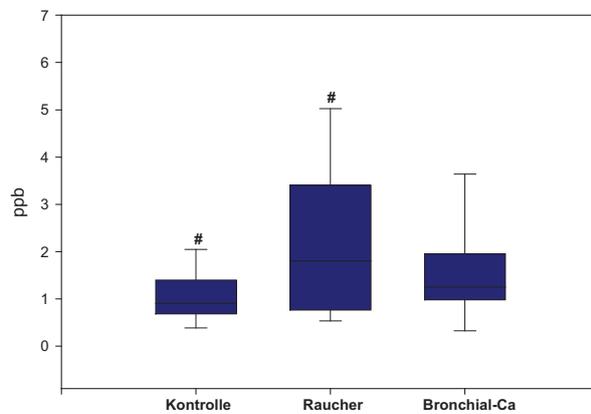


Abb.19 Vergleich expiratorischer Konzentrationen von Benzol in ppb

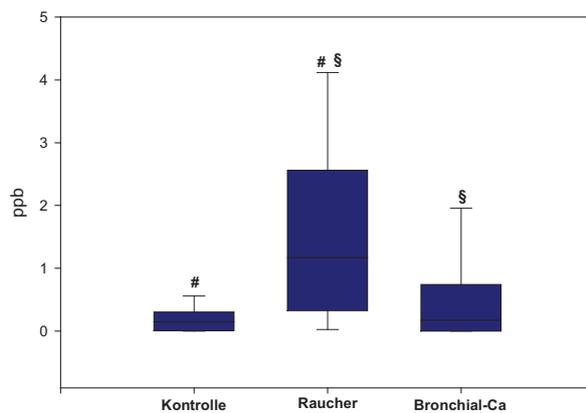


Abb.20 Vergleich der Konzentrationen (Expiration-Inspiration) von Benzol in ppb

3.2.7 Toluol

In Abbildung 21 sind die expiratorischen Konzentrationen von Toluol mit Median, 25%-Perzentile und 75%-Perzentile im Vergleich der verschiedenen Gruppen zu sehen. Es zeigten sich statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Rauchern und den Bronchialkarzinompatienten. In Abbildung 22 sind die expiratorischen Konzentrationen um die inspiratorischen Konzentrationen korrigiert (Expiration-Inspiration). Die Rauchergruppe unterschied sich dabei statistisch signifikant von der gesunden Kontrollgruppe und von den Krebspatienten. Dargestellt sind der Median, 25%- und 75%-Perzentile.

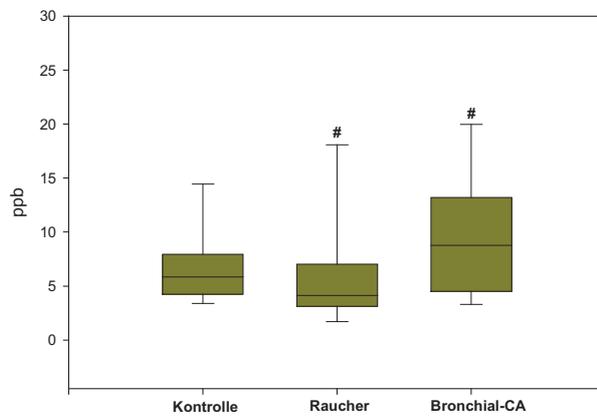


Abb.21 Vergleich expiratorischer Konzentrationen von Toluol in ppb

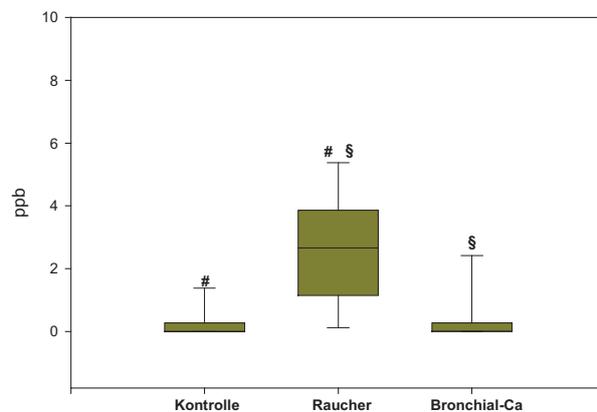


Abb.22 Vergleich der Konzentrationen (Expiration-Inspiration) von Toluol in ppb

3.2.8 Butanal

Abbildung 23 stellt expiratorische Konzentrationen von Butanal mit Median, 25%-Perzentile und 75%-Perzentile im Vergleich der verschiedenen Gruppen dar. Es ergaben sich statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Rauchern und den Vergleichsgruppen. In Abbildung 24 sind die expiratorischen Konzentrationen um die inspiratorischen Konzentrationen korrigiert (Expiration-Inspiration). In dieser Abbildung unterscheidet sich die Bronchialkarzinomgruppe statistisch signifikant von den anderen beiden Gruppen. Dargestellt sind der Median, 25%- und 75%-Perzentile.

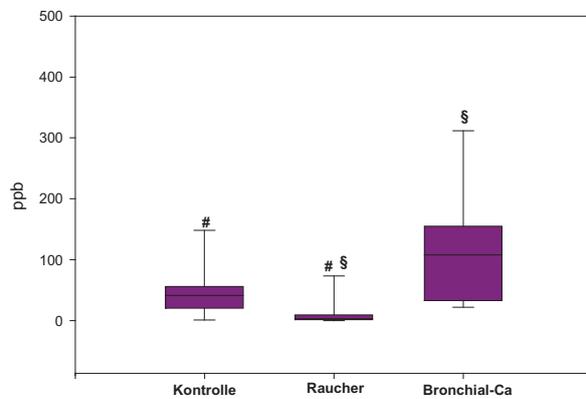


Abb.23 Vergleich expiratorischer Konzentrationen von Butanal in ppb

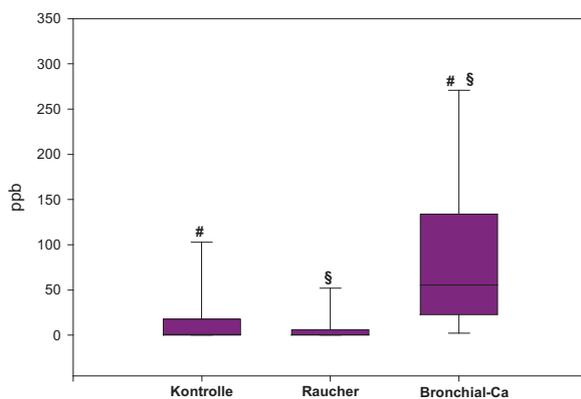


Abb.24 Vergleich der Konzentrationen (Expiration-Inspiration) von Butanal in ppb

3.2.9 Hexanal

In Abbildung 25 sind die expiratorischen Konzentrationen von Hexanal mit Median, 25%-Perzentile und 75%-Perzentile im Vergleich der verschiedenen Gruppen dargestellt. Die Rauchergruppe unterschied sich statistisch signifikant von der gesunden Kontrollgruppe und von den Bronchialkarzinompatienten. In Abbildung 26 sind die expiratorischen Konzentrationen um die inspiratorischen Konzentrationen korrigiert (Expiration-Inspiration). Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Dargestellt sind der Median, 25%- und 75%-Perzentile.

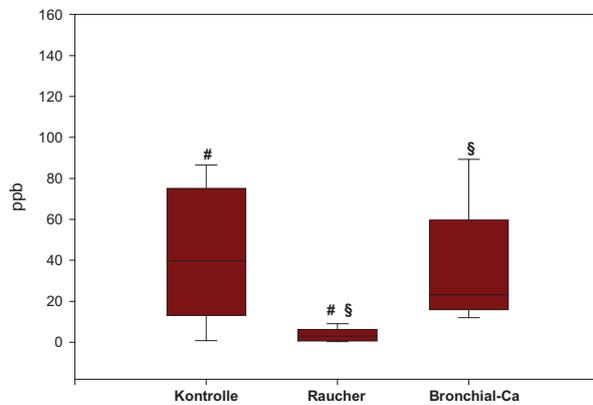


Abb.25 Vergleich expiratorischer Konzentrationen von Hexanal in ppb

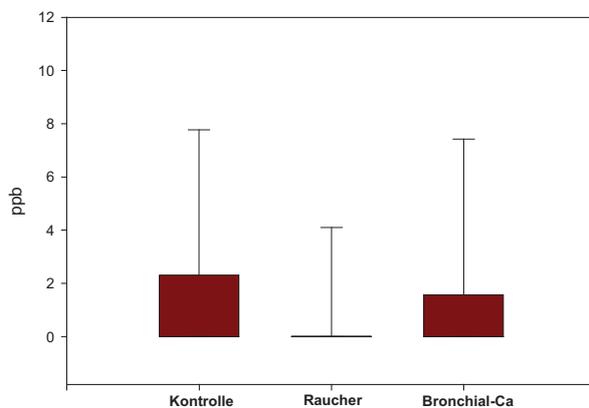


Abb.26 Vergleich der Konzentrationen (Expiration-Inspiration) von Hexanal in ppb

3.2.10 Aceton

Die Abbildung 27 zeigt die expiratorischen Konzentrationen von Aceton mit Median, 25%-Perzentile und 75%-Perzentile im Vergleich der verschiedenen Gruppen. Die Rauchergruppe unterschied sich statistisch signifikant von der gesunden Kontrollgruppe und von den Bronchialkarzinompatienten. In Abbildung 28 sind die expiratorischen Konzentrationen um die inspiratorischen Konzentrationen korrigiert (Expiration-Inspiration). Es zeigten sich statistisch signifikante Unterschiede zwischen Rauchern und Krebspatienten. Dargestellt sind der Median, 25%- und 75%-Perzentile.

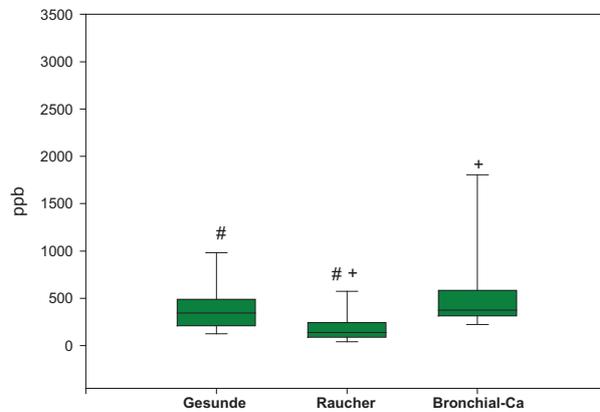


Abb.27 Vergleich expiratorischer Konzentrationen von Aceton in ppb

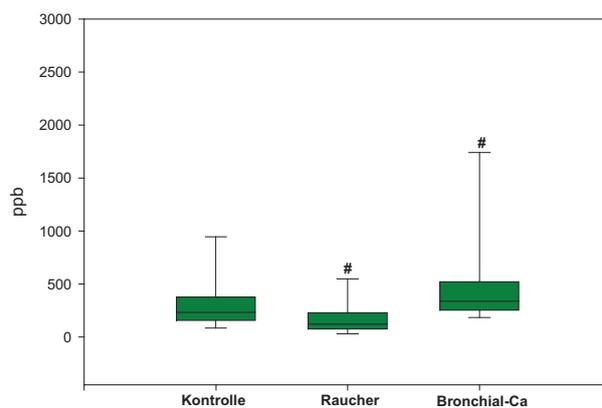


Abb.28 Vergleich der Konzentrationen (Expiration-Inspiration) von Aceton in ppb

3.2.11 2-Butanon

In der Abbildung 29 sind expiratorische Konzentrationen von 2-Butanon mit Median, 25%-Perzentile und 75%-Perzentile im Vergleich der verschiedenen Gruppen dargestellt. Die Rauchergruppe zeigte statistisch signifikante Unterschiede zu der Kontrollgruppe und den Krebspatienten. In Abbildung 30 sind die expiratorischen Konzentrationen um die inspiratorischen Konzentrationen korrigiert (Expiration-Inspiration). Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede im Vergleich der Gruppen. Dargestellt sind der Median, 25%- und 75%-Perzentile.

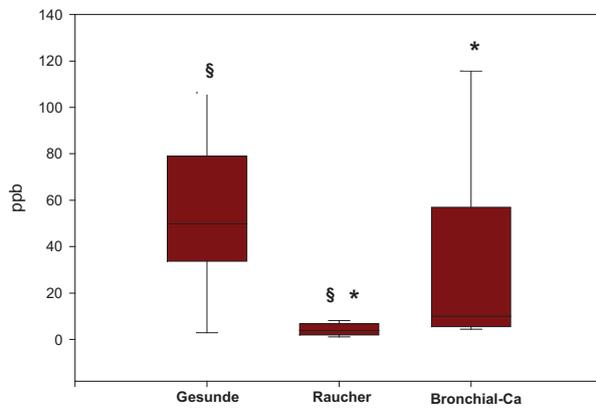


Abb.29 Vergleich expiratorischer Konzentrationen von 2-Butanon in ppb

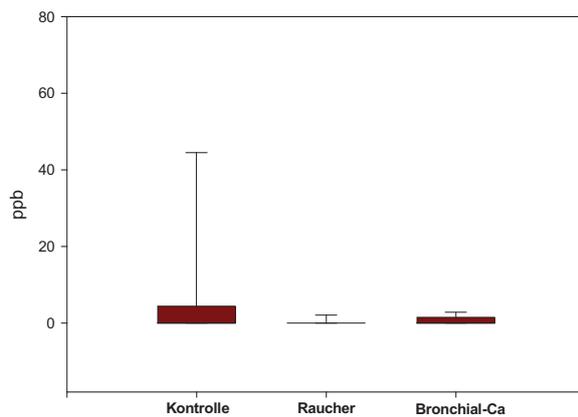


Abb.30 Vergleich der Konzentrationen (Expiration-Inspiration) von 2-Butanon in ppb

3.2.12 Dimethylsulfid

Die Abbildung 31 stellt die expiratorischen Konzentrationen von Dimethylsulfid mit Median, 25%-Perzentile und 75%-Perzentile im Vergleich der verschiedenen Gruppen dar. Raucher und Bronchialkarzinompatienten unterschieden sich statistisch signifikant. In Abbildung 32 sind die expiratorischen Konzentrationen um die inspiratorischen Konzentrationen korrigiert (Expiration-Inspiration). Es ergaben sich ebenfalls statistisch signifikante Unterschiede zwischen der Raucher- und der Karzinomgruppe. Dargestellt sind der Median, 25%- und 75%-Perzentile.

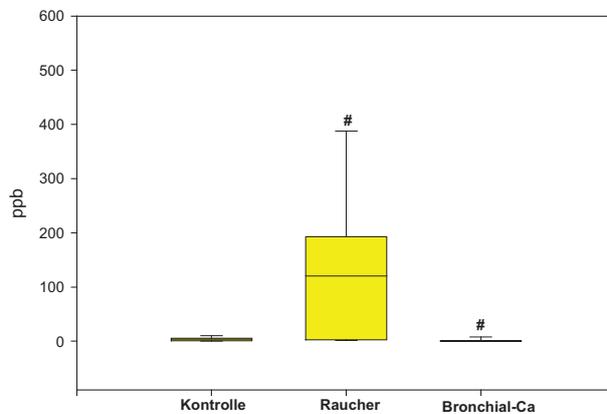


Abb.31 Vergleich expiratorischer Konzentrationen von Dimethylsulfid in ppb

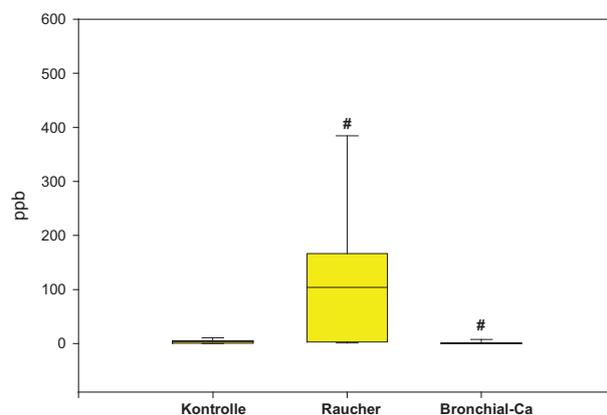


Abb.32 Vergleich der Konzentrationen (Expiration-Inspiration) von Dimethylsulfid in ppb

3.2.13 Acetonitril

Die Abbildung 33 zeigt die expiratorischen Konzentrationen von Acetonitril mit Median, 25%-Perzentile und 75%-Perzentile im Vergleich der verschiedenen Gruppen. Es zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und den Rauchern. In Abbildung 34 sind die expiratorischen Konzentrationen um die inspiratorischen Konzentrationen korrigiert (Expiration-Inspiration). Die Rauchergruppe unterschied sich signifikant von der gesunden Kontrollgruppe und von den Bronchialkarzinompatienten. Dargestellt sind der Median, 25%- und 75%-Perzentile.

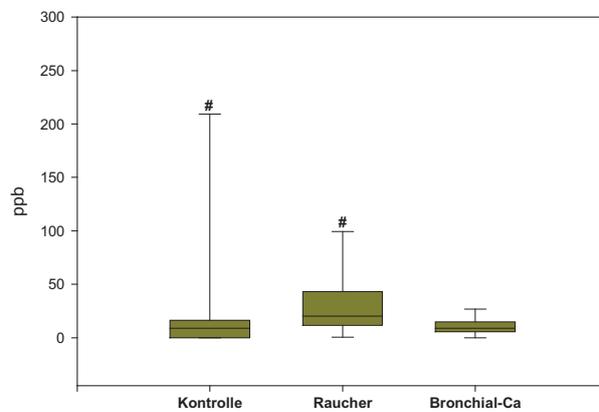


Abb.33 Vergleich expiratorischer Konzentrationen von Acetonitril in ppb

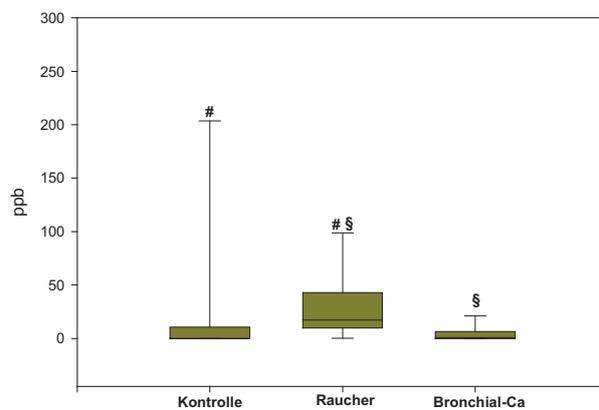


Abb.34 Vergleich der Konzentrationen (Expiration-Inspiration) von Acetonitril in ppb

3.2.14 CEA (Carcino-Embryonales Antigen)

Die Abbildung 35 zeigt den Vergleich von CEA-Konzentrationen im Serum der gesunden Kontrollgruppe, der Raucher und der Patientengruppe mit Bronchialkarzinom.

Die Karzinomgruppe unterschied sich statistisch signifikant von den beiden anderen Gruppen. In der Abbildung dargestellt sind der Median, 25%- und 75%- Perzentile.

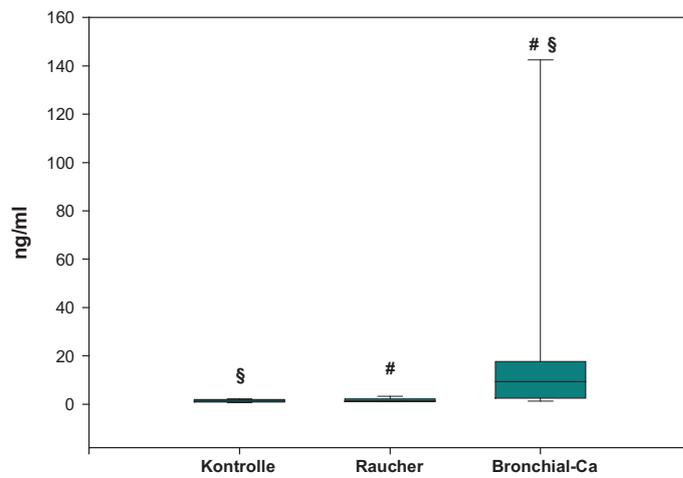


Abb.35 Serumkonzentration von CEA in ng/ml im Vergleich der verschiedenen Untersuchungsgruppen (Kontrolle, Raucher, Bronchialkarzinompatienten)

3.2.15 Cyfra 21.1 (Cytokeratinfragment 21.1)

In Abbildung 36 sind Serumkonzentrationen von Cyfra21.1 dargestellt. Verglichen wurden die gesunde Kontrollgruppe mit den Rauchern und den Bronchialkarzinompatienten.

Die Karzinomgruppe zeigte statistisch signifikante Unterschiede zu den beiden anderen Gruppen. Die Abbildung stellt den Median, 25%- und 75%-Perzentile dar.

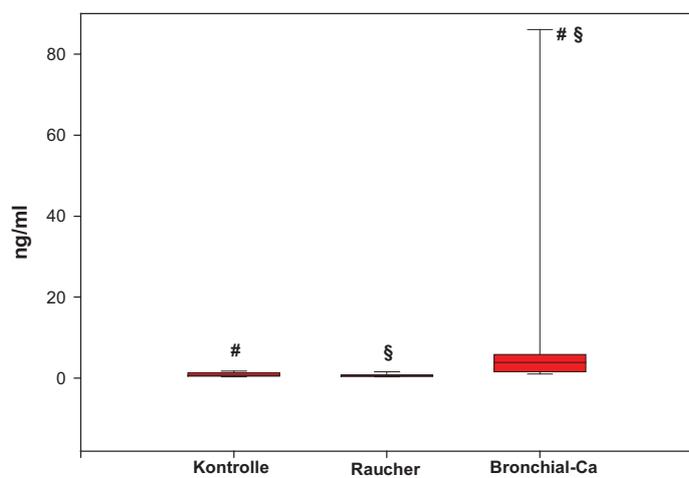


Abb.36 Serumkonzentration von Cyfra 21.1 in ng/ml im Vergleich der verschiedenen Untersuchungsgruppen (Kontrolle, Raucher, Bronchialkarzinompatienten)

3.2.16 NSE (Neuronenspezifische Enolase)

In Abbildung 37 ist der Vergleich von NSE-Konzentrationen im Serum der verschiedenen Gruppen dargestellt. Es zeigten sich statistisch signifikante Unterschiede zwischen der Rauchergruppe und den beiden anderen Gruppen. In der Abbildung dargestellt sind der Median, 25%- und 75%-Perzentile.

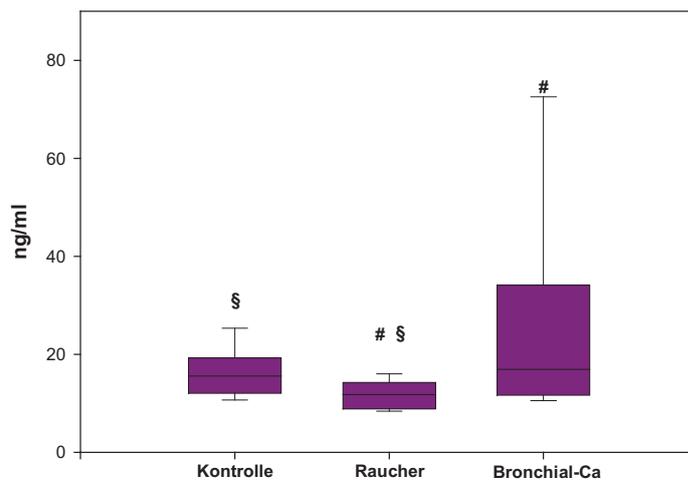


Abb.37 Serumkonzentration von NSE in $\mu\text{g/l}$ im Vergleich der verschiedenen Untersuchungsgruppen (Kontrolle, Raucher, Bronchialkarzinompatienten)

3.2.17 Statistische Zusammenfassung VOCs und Serumtumormarker

Die unten stehende Tabelle zeigt eine Zusammenfassung aller volatilen organischen Substanzen und der Serumtumormarker im statistischen Vergleich der verschiedenen Studiengruppen. Die Konzentrationen sind angegeben als Median (25%-75%-Perzentile) beziehungsweise als Mittelwert (Standardfehler).

Substanz	Datenprozess	Kontrolle	Raucher	Bronchial-Ca	K vs. R	K vs. Ca	R vs. Ca
Butanal	Ex (ppb)	41,18 (21,32 - 55,73)	3,38 (1,4 - 9,273)	108,19 (34,19 - 153,23)	s.	n.s.	s.
	Ex - Ins (ppb)	0,61 (0,00 - 15,58)	0,51 (0,00 - 5,66)	55,39 (22,74 - 125,45)	n.s.	s.	s.
Hexanal	Ex (ppb)	39,76 (14,77 - 74,53)	3,0 (0,64 - 6,00)	23,26 (16,49 - 57,00)	s.	n.s.	s.
	Ex - Ins (ppb)	0,00 (0,00 - 1,55)	0,00 (0,00 - 0,01)	0,00 80,00 - 1,32)	n.s.	n.s.	n.s.
Butan	Ex (ppb)	7,68 (2,60 - 16,51)	3,05 (1,56 - 6,33)	4,36 (2,78 - 9,18)	n.s.	n.s.	n.s.
	Ex - Ins (ppb)	4,59 (0,06 - 12,37)	2,00 (0,77 - 4,80)	0,24 (0,00 - 2,44)	n.s.	n.s.	n.s.
Pentan	Ex (ppb)	0,475 (0,00 - 1,53)	0,46 (0,00 - 1,08)	1,10 (0,53 - 1,81)	n.s.	n.s.	n.s.
	Ex - Ins (ppb)	0,00 (0,00 - 0,32)	0,18 (0,00 - 0,87)	0,30 (0,20 - 0,48)	n.s.	n.s.	n.s.
Heptan	Ex (ppb)	0,45 (0,00 - 1,27)	0,16 (0,00 - 1,57)	1,09 (0,11 - 1,38)	n.s.	n.s.	n.s.
	Ex - Ins (ppb)	0,00 (0,00 - 0,21)	0,00 (0,00-0,79)	0,27 (0,00 - 0,35)	n.s.	n.s.	n.s.
Isopren	Ex (ppb)	83,69 (8,61)	62,02 (8,47)	110,51 (17,29)	n.s.	n.s.	s.
	Ex - Ins (ppb)	80,80 (8,58)	60,27 (8,44)	107,79 (17,25)	n.s.	n.s.	s.
Aceton	Ex (ppb)	345,21 (212,27 - 478,37)	139,77 (91,18 - 240,38)	375,53 (325,87 - 561,51)	s.	n.s.	s.
	Ex - Ins (ppb)	231,49 (164,83 - 371,02)	121,52 (76,15 - 229,74)	339,00 (261,26 - 506,00)	n.s.	n.s.	s.
2-Butanon	Ex (ppb)	49,73 (34,42 - 74,32)	3,81 (2,03 - 6,66)	9,97 (5,75 - 48,92)	s.	n.s.	s.
	Ex - Ins (ppb)	0,00 (0,00 - 4,12)	0,00 (0,00 - 0,00)	0,00 (0,00 - 1,43)	n.s.	n.s.	n.s.
Isopropanol	Ex (ppb)	38,10 (20,44 - 56,24)	0,96 (0,59 - 24,40)	188,41 (86,00 - 591,50)	n.s.	s.	s.
	Ex - Ins (ppb)	0,00 (0,00 - 0,00)	0 (0 - 0,04)	0,00 (0,00 - 0,00)	n.s.	n.s.	n.s.
DMS	Ex (ppb)	3,51 (0,85 - 5,56)	120, 73 (2,86 - 192,16)	0 (0 - 0)	n.s.	n.s.	s.
	Ex - Ins (ppb)	3,51 (0,846 - 5,3)	104 (2,86 - 160,42)	0 (0 - 0,86)	n.s.	n.s.	s.
Benzol	Ex (ppb)	0,90 (0,73 - 1,38)	1,8 (0,81 - 3,39)	1,25 (1,03 - 1,93)	s.	n.s.	n.s.
	Ex - Ins (ppb)	0,15 (0,01 - 0,30)	1,17 (0,35 - 2,54)	0,18 (0,00 - 0,68)	s.	n.s.	s.
Toluol	Ex (ppb)	5,84 (4,32 - 7,74)	4,15 (3,17 - 7,00)	8,78 (4,64 - 12,97)	n.s.	n.s.	s.
	Ex - Ins (ppb)	0,00 (0,00 - 0,18)	2,66 (1,21 - 3,77)	0,01 (0,00 - 0,28)	s.	n.s.	s.
Acetonitril	Ex (ppb)	8,78 (0,00 - 15,94)	20,07 (12,37 - 37,98)	8,84 (6,00 - 14,22)	s.	n.s.	n.s.
	Ex - Ins (ppb)	0,00 (0,00 - 8,58)	17,11 (10,70 - 37,85)	0,68 (0,02 - 6,15)	s.	n.s.	s.
CEA	Serum (ng/dl)	1,23 (0,92 - 1,83)	1,43 (1,10 - 2,15)	9,33 (2,62 - 15,80)	n.s.	s.	s.
CYFRA 21.1	Serum (ng/dl)	0,76 (0,52 - 1,39)	0,62 (0,42 - 0,83)	3,90 (1,68 - 5,72)	n.s.	s.	s.
NSE	Serum (ng/dl)	15,55 (12,05 - 19,30)	11,80 (8,93 - 14,20)	16,90 (12,03 - 33,38)	s.	n.s.	s.

Tab.4 Konzentrationen der VOCs und Serumtumormarker mit statistischer Auswertung;
Abkürzungen: K: Kontrolle, R: Raucher, Ca: Karzinom, s.: Unterschied zwischen den Gruppen signifikant, n.s.: nicht signifikant

3.2.18 Vergleich von Butanal und nicht-volatilen Markern

Die folgende Abbildung zeigt ROC-Kurven von den Serumentumormarkern CEA, CYFRA 21.1 und NSE im Vergleich zu dem flüchtigen Aldehyd Butanal. In der unten stehenden Tabelle sind die Serumentumormarker und Butanal im Vergleich bezüglich Sensitivität, Spezifität, und Trennschärfe dargestellt.

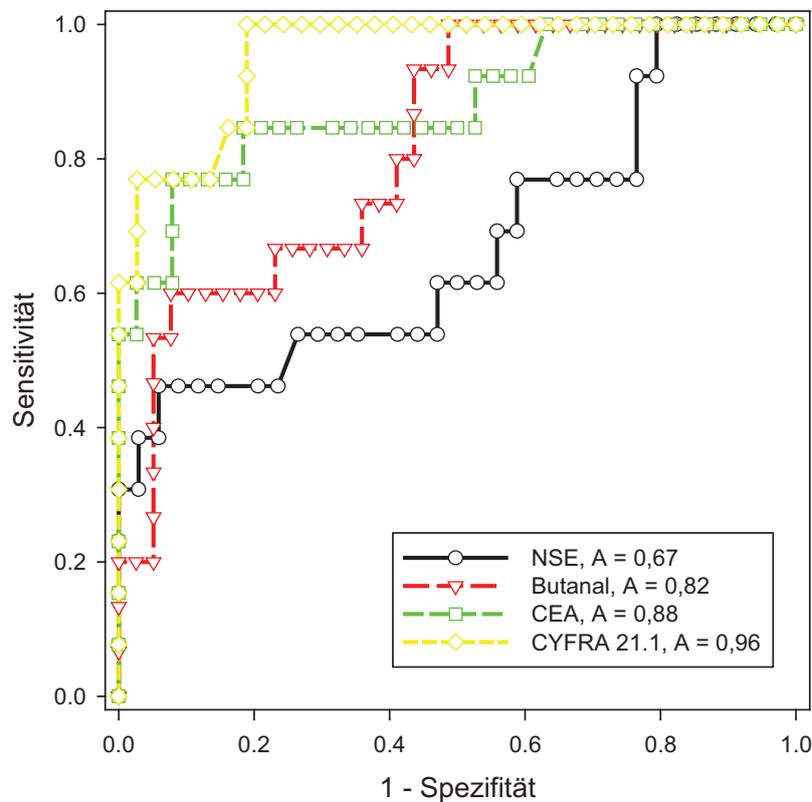


Abb.38 ROC-Kurven von NSE, Butanal, CEA und CYFRA 21.1

Marker	Sensitivität	Spezifität	AUC	Cut-off
NSE	69	41	0,67	> 12,5 ng/dl
Butanal	60	92	0,82	> 73,65ppb
CEA	62	97	0,88	> 5 ng/dl
CYFRA 21.1	54	100	0,96	> 3,3 ng/dl

Tab.5 Vergleich von Serumentumormarkern und Butanal bezogen auf Sensitivität, Spezifität und AUC

4. Diskussion

Bei den an 55 Probanden durchgeführten Untersuchungen konnten Unterschiede in den Konzentrationsprofilen volatiler organischer Substanzen im Atemgas von Nichtrauchern, Rauchern und Bronchialkarzinompatienten nachgewiesen werden. Bei der Interpretation der Ergebnisse müssen mögliche Störgrößen, wie der Einfluss der Probennahmetechnik oder Effekte eingeatmeter Substanzen berücksichtigt werden. Insbesondere die Probennahmetechnik hat einen signifikanten Einfluss auf die Ergebnisse der Untersuchungen. Bei der Untersuchung von Serumentumormarkern im Vergleich zu einer volatilen organischen Substanz zeigten beide Markergruppen hohe Variationen der Konzentrationen und ähnliche Sensitivitäten bzw. Spezifitäten.

Bereits im Rahmen der Pilotstudie wurde deutlich, dass die Methode der Atemgasprobennahme die Konzentration von Atemgasanalyten stark beeinflusst. Wir konnten nachweisen, dass zur Messung aus dem Blut stammender Substanzen die alveolare, CO₂-kontrollierte Probennahme den anderen Probennahmetechniken überlegen ist. Sie zeigte die geringsten Abweichungen vom endtidalen CO₂-Partialdruck (5-20%) und beeinflusste somit die Konzentrationen der Analyten am geringsten von allen untersuchten Probennahmethode. Die Differenzen der gemessenen CO₂-Konzentration in den alveolaren Proben zum endtidalen Wert erklären sich dadurch, dass bei der alveolaren Probennahme während der gesamten expiratorischen Plateauphase Atemgas gesammelt wurde, wogegen der endtidale Wert das Maximum der CO₂-Konzentrationen im Atemzyklus repräsentiert [28, 29]. Die Unterschiede der gemischt-expiratorischen Probennahme zu allen anderen Methoden erklären sich durch die Dilution des Alveolargases mit CO₂-ärmerer Luft aus dem physiologischen Totraum. Das bedeutet, dass dabei neben dem Alveolargas auch Atemluft aus Mund, Rachen, Trachea und Bronchien gesammelt wurde. Die Differenz zum endtidalen CO₂-Partialdruck betrug bei dieser Art der Probennahme zwischen 40 und 50%. Die Analyse flüchtiger organischer Substanzen bekräftigte diese Ergebnisse durch vergleichbare Differenzen volatiler organischer Verbindungen. Die Zeit-kontrollierte Probennahme zeigte hohe Streuungen der CO₂- und Analytenkonzentrationen. Diese entstanden dadurch, dass die Probennahme nicht ausschließlich in die alveolare Phase fiel, sondern auch Totraumluft gesammelt wurde. Für klinische Studien ist diese Methode somit nicht geeignet.

Da volatile organische Substanzen nur in sehr niedrigen Konzentrationen abgeatmet werden (nmol/L-pmol/L; ppb-ppt), ist es von großer Bedeutung, Verunreinigungen der Atemproben zu vermeiden. Dazu ist es wichtig, die Probennahme in einer Phase der Ausatmung vorzunehmen, in der reine Alveolarluft abgeatmet wird (alveolare Phase). In diesem Zeitraum wird nur Atemgas abgegeben, welches in den Alveolen direkt am Gasaustausch mit dem Blut beteiligt war. Kontaminationen der Atemproben durch Luft aus dem Mund- und

Rachenraum, der Trachea oder den Bronchien werden durch die CO₂-kontrollierte Probennahme minimiert. Somit bestätigten unsere Ergebnisse eindeutig, dass für klinische Studien, in denen aus dem Blut stammende Substanzen gemessen werden sollen, eine alveolare, CO₂-kontrollierte Probennahme unabdingbar ist. Schubert et al. zeigten 2005 [30], dass nur alveolare Atemgaskonzentrationen mit Substanzkonzentrationen im Blut korrelieren. Zur Diagnostik von Prozessen in den Atemwegen oder zur Abklärung der Herkunft volatiler Verbindungen kann die gemischt-exspiratorische Probennahme ergänzend einbezogen werden.

Unsere Untersuchungen zeigten außerdem, dass die Probennahmemethoden einen unterschiedlichen Effekt auf die Konzentrationen volatiler organischer Substanzen bei der gesunden Kontrollgruppe und den Bronchialkarzinompatienten haben. Diese Unterschiede sind für Substanzen aus dem Blut besonders ausgeprägt. Andere VOCs wie Dimethylsulfid oder Benzol unterschieden sich zwischen den beiden Gruppen kaum. Das Bronchialkarzinom beeinflusst die Lungenphysiologie in unterschiedlichster Weise und hat somit Auswirkungen auf die Abatmung von volatilen organischen Substanzen. Durch Tumorgewebe ergeben sich Inhomogenitäten der Atemwegswiderstände und vermehrte regionale Unterschiede der alveolaren Ventilation. Diese Effekte könnten die unterschiedlichen Konzentrationen bei Gesunden und Bronchialkarzinompatienten erklären und unterstrichen erneut die Notwendigkeit einer kontrollierten Probennahme.

Ein weiterer Fokus dieser Arbeit lag auf der Betrachtung inspiratorischer VOC-Konzentrationen als mögliche Störgrößen der Atemgasuntersuchung. Bei Betrachtung der Auswirkungen inspiratorischer Konzentrationen (Alveolarluft minus Raumluft normiert auf Alveolarluft) zeigte sich, dass aus dem Blut stammende und exogene Substanzen auf diese Weise getrennt werden können. 2-Butanon und Ethanol konnten eindeutig als exogene, Isopren und Aceton eindeutig als endogene Substanzen identifiziert werden. Einen vergleichbaren Ansatz nutzte Phillips zur Berücksichtigung inspiratorischer Konzentrationen als „alveolaren Gradienten“, der sich aus der Differenz von Alveolarluft und Raumluft ergibt [9, 31, 32]. Nach Phillips ergibt sich ein positiver Gradient dadurch, dass ausgeatmete volatile organische Substanzen in höheren Konzentrationen als in der Raumluft vorkommen. Negative Gradienten entstehen durch hohe VOC-Raumluftkonzentrationen, die vom menschlichen Organismus aufgenommen, metabolisiert und wieder ausgeschieden werden. Der alveolare Gradient löst die Raumluftproblematik aber nicht, da negative Gradienten schwer interpretierbar sind und künstlich Signifikanzen beeinflussen können [30]. Demnach sollten Raumluftkonzentrationen, die höher als 25% der Alveolarkonzentrationen sind, mit äußerster Vorsicht interpretiert werden [33]. Schubert et al. formulierten 2005, dass inspiratorische Konzentrationen unter 5% zu vernachlässigen sind [30]. Ein Ansatz zur Lösung des Problems zeigten Risby et al. 1999 [34], indem sie Probanden speziell

gesäuberte Luft einatmen ließen und beobachteten, dass die Lunge nach ungefähr vier Minuten keine signifikanten Konzentrationen an exogenen Substanzen aufwies. 2008 räumte Risby [33] ein, dass die Auswaschung des gesamten Körpers, je nach Substanz, wahrscheinlich Tage oder Wochen dauern könnte. Resümee all dieser Betrachtungen ist, dass die Messung der Umgebungsluft nicht vernachlässigt werden darf und wichtig für die Interpretation der Atemgasanalyse ist.

In der auf die Methodenevaluation folgenden klinischen Studie zeigten sich Unterschiede der VOC-Konzentrationen bei Gesunden, Rauchern und Bronchialkarzinompatienten. Butanal-Konzentrationen unterschieden sich zwischen der Bronchialkarzinomgruppe und den Kontrollgruppen (Rauchern und gesunden Probanden). In der Aldehydstudie von Fuchs et al. [35] konnten dagegen keine statistisch signifikanten Unterschiede von Butanal zwischen Bronchialkarzinompatienten und den Referenzgruppen nachgewiesen werden. Als weiteres volatiles Aldehyd wurde in unserer Studie das Hexanal untersucht. Unter Berücksichtigung der Raumluftkonzentrationen zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede der Karzinompatienten im Vergleich zu den Rauchern und der gesunden Referenzgruppe. Andere Studien dagegen konnten erhöhte Hexanalkonzentrationen im Blut von Patienten mit Bronchialkarzinom [36] und in deren Atemgas [35] detektieren. Der Entstehungsweg des Hexanals beruht endogen auf der Oxidation von Omega-6-Fettsäuren [37] und wurde von Corradi et al. 2004 [38] als Marker für oxidativen Stress identifiziert. Fuchs et al. stellten 2009 [35] einen Unterschied der Hexanalkonzentrationen zwischen Patienten mit einem SCLC im Vergleich zu Patienten mit einem NSCLC fest. Als Erklärung dafür wurde die höhere Proliferationsrate des SCLC und dessen aktivere Metabolisierung erwähnt [39]. C3- bis C10-Aldehyde wurden als Ausfallprodukte der Oxidation ungesättigter Fettsäuren beschrieben [37, 40, 41]. Diverse Publikationen brachten die Tumorgenese mit oxidativem Stress und der resultierenden Lipidperoxidation in Verbindung [42, 43]. Es wird angenommen, dass spezielle Aldehyde bei der Oxidation bestimmter Fettsäuren der Tumorzellmembranen entstehen. So wurde das Pentanal beispielsweise für das Mammakarzinom [44] und die myeloische Leukämie [45] beschrieben. Somit scheint die Substanzklasse der Aldehyde ein beachtliches Potential als mögliche Krebsmarker zu bieten.

In unserer Studie wurden die Alkane Butan, Pentan und Heptan untersucht. Bei allen drei Substanzen zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen. Im Kontrast dazu wurden in der Vergangenheit diverse Studien veröffentlicht, in denen Alkane als potentielle Atemmarker für das Bronchialkarzinom identifiziert wurden [8, 21, 46]. Das Butan fand als Krebsmarker bereits gesonderte Aufmerksamkeit. Phillips et al. [47] veröffentlichten 2003 eine Studie, in der ein Markersset gesunde Probanden von Patienten mit Bronchialkarzinom unterscheiden sollte. Dafür nutzten sie neun Alkane beziehungsweise methylierte Alkane. Darunter befanden sich auch

Butan, Pentan und Heptan. Es konnte eine Spezifität von 82,9% und eine Sensitivität von 89,6% nachgewiesen werden. Butan wurde dabei als bester Einzelmarker beschrieben. Alkane in der Ausatemluft sind typische Marker für oxidativen Stress. Verursacht wird dieser durch Sauerstoffradikale wie Superoxidanionen oder Hydroxylradikale. Sie sind in der Lage sämtliche zelluläre Strukturen, inklusive DNA und RNA, zu zerstören [48]. Dies ist ein bekannter Prozess bei der Entstehung von SIRS und Sepsis [49]. Auch für Ischämie-Reperfusionenverhältnisse [50, 51] und für das MODS [52] sind derartige biochemische Reaktionen vorbeschrieben. Es kommt zur Lipidperoxidation, wobei Sauerstoffradikale Lipidstrukturen, zum Beispiel Omega-3- und Omega-6-Fettsäuren, in Biomembranen schädigen. Dabei entstehen neben dem Malondialdehyd (MDA) auch Ethan und Pentan [53, 54]. Eine Korrelation von Malondialdehyd mit Ethan und Pentan wurde vielfach nachgewiesen [55, 56]. Die Betrachtung der Alkane in der Krebsforschung beruht auf der kanzerogenen Wirkung der Sauerstoffradikale durch Zerstörung der DNA [57, 58] und der Erhöhung des oxidativen Stresses bei speziellen Karzinomen [59]. Eine Auswirkung des Bronchialkarzinoms auf die Abatmung von Butan, Pentan und Heptan konnte in unserer Studie jedoch nicht nachgewiesen werden. Bei Pentan war lediglich ein Trend zu einer erhöhten Konzentration bei den Bronchialkarzinompatienten zu erkennen. Derzeit existiert kein nachgewiesener biochemischer Weg für die Bildung von verzweigt-kettigen Alkanen im menschlichen Organismus. Sie entstehen bei der Verbrennung von Benzin und sind in Kunststoffen enthalten.

Als weitere Substanzen wurden Isopren und Aceton untersucht. Auffällig war ein Unterschied der Isoprenkonzentrationen zwischen den Rauchern und den Bronchialkarzinompatienten. Isopren (2-Methylbuta-1,3-dien) ist ein ungesättigter Kohlenwasserstoff, der maßgeblich an der Cholesterinbiosynthese beteiligt ist. Der statistisch signifikante Unterschied zwischen Rauchern und den Patienten in unserer Studie lässt sich möglicherweise durch den Alterseffekt erklären. Lechner et al. [60] detektierten 2006 signifikant geringere Isoprenkonzentrationen bei einer jungen Probandengruppe (19-29 Jahre) im Vergleich zu älteren Probanden. Das Durchschnittsalter der Rauchergruppe dieser Studie lag bei 32 Jahren, das der Karzinomgruppe bei 68 Jahren. Die Arbeitsgruppe um Lechner berichtete außerdem, dass sich männliche Probanden von den weiblichen durch signifikant höhere Isoprenkonzentrationen unterschieden. Dies ist ein weiterer Erklärungsansatz, denn in der Bronchialkarzinomgruppe befanden sich deutlich mehr Männer als Frauen (10 Männer, 5 Frauen). Die Rauchergruppe zeigte ein umgekehrtes Verhältnis (15 Frauen, 5 Männer). Einen zusätzlichen Aspekt veröffentlichten Karl et al. 2001 [61]. Sie beschrieben, dass nach wenigen Sekunden körperlich anstrengender Arbeit die Isoprenkonzentrationen im Atemgas ansteigen. Sie schlussfolgerten, dass eine Erhöhung des Herzzeitvolumens (HZV) mit einer sofortigen erhöhten Isoprenabatmung einhergeht. Dieser Effekt wurde von Pabst et al. 2007

[62] bestätigt. In unserer Studie ist ein Einfluss des HZV auf die Konzentrationen des Isoprens jedoch unwahrscheinlich, da bei jedem Probanden Blutdruck und Puls vor und nach der Probennahme überprüft wurden. Bei der Betrachtung der Isoprenkonzentrationen sollten Einflussfaktoren wie Alter, Geschlecht und Herzzeitvolumen berücksichtigt werden. Ein Marker für das Bronchialkarzinom stellt das Isopren nicht dar.

Die Acetonkonzentrationen zeigten Unterschiede zwischen Rauchern und den anderen Probandengruppen. Für die Rauchergruppe ergaben sich signifikant niedrigere Konzentrationen im Vergleich zu den Patienten mit Bronchialkarzinom. Diese Beobachtung lässt sich mit physiologischen Prozessen erklären. Aceton (Propanon) entsteht durch die Decarboxylierung des Ketonkörpers Acetoacetat [63]. Ketonkörper sind Substanzen, die in katabolen Stoffwechselsituationen gebildet werden. Wenn dem Organismus nicht ausreichend Glucose zur Verfügung steht, beginnt er seinen Energiebedarf über den Abbau von Lipiden zu decken. Als Produkt des Abbaus von Fettsäuren (β -Oxidation) entsteht das Acetyl-CoA, woraus in der Leber Ketonkörper gebildet werden. Das von Rauchern konsumierte Nikotin stimuliert die Lipolyse und somit die Bildung von Aceton [64]. Desweiteren behindert Nikotin durch die Aktivierung bestimmter Protein-Kinasen den Fettsäureaufbau [65]. Die Rauchergruppe zeigte geringere Acetonkonzentrationen im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen. Da alle Raucher ab einer Stunde vor Beginn der Atemgasprobennahme kein Nikotin mehr konsumieren durften, ist ein Rebound-Phänomen denkbar. Das heißt, dass es bei den Rauchern zu einem gesteigerten Fettaufbau kam und die Produktion des Acetons so reduziert wurde.

Im Gegensatz zu Isopren und Aceton ist das Isopropanol (2-Propanol) als exogene Substanz [66] bekannt. Anwendung findet es als Lösungs- und Desinfektionsmittel. Interessant ist, dass diese Substanz auch als Biomarker für das Bronchialkarzinom beschrieben wurde [24]. Im Vergleich der expiratorischen Konzentrationen unterscheidet sich die Bronchialkarzinomgruppe in unserer Studie signifikant von den Rauchern und der gesunden Referenzgruppe. Zieht man die Raumluftkonzentrationen in die Betrachtung ein, sind keinerlei Unterschiede zwischen den Gruppen feststellbar. Ähnliche Effekte zeigten sich bei 2-Butanon. Die Substanz wird als Lösungsmittel- und Kraftstoffzusatz eingesetzt. In Studien der vergangenen Jahre wurde 2-Butanon mehrfach beschrieben. Sponring et al. [67] konnten 2009 in Versuchen mit Bronchialkarzinomzellreihen keine eindeutigen Aussagen zum Nutzen dieser Substanz als Krebsmarker treffen. Song et al. wiesen 2010 [68] signifikant erhöhte Konzentration von 3-Hydroxy-2-Butanon bei Lungenkrebspatienten nach. Mit einem Set aus vier volatilen organischen Substanzen (2-Butanon, Benzaldehyd, 1-Propanol, 2,3-Butadion) zeigten sich in einer Studie von Bajtarevic et al. 2009 [66] Spezifitäten von 100% mit einer Sensitivität von 52%. Nach den Erkenntnissen aus unserer Studie stellt das 2-Butanon jedoch keinen Marker für das Bronchialkarzinom dar, da nach Berücksichtigung der

Raumluftkonzentrationen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen bestehen bleiben. Erhöhte Konzentrationen von 2-Butanon scheinen daher eher auf eine exogene Verunreinigung der Raumluft durch Lösungsmittel hinzuweisen.

Bei der Substanz Dimethylsulfid zeigten sich Konzentrationsunterschiede zwischen der Rauchergruppe, der gesunden Referenzgruppe und den Karzinompatienten. Dimethylsulfid ist eine Substanz, die bei der bakteriellen Metabolisierung von Methanthiol entsteht. Anaerobe Bakterien befinden sich in Zahnzwischenräumen, Zahntaschen und Zungenpapillen. Durch die Produktion dieser flüchtigen Schwefelwasserstoffe entsteht der unangenehme Mundgeruch [69, 70]. Van de Velde et al. [71] brachten 2009 die abgeatmeten Dimethylsulfidkonzentrationen mit dem dentalen Status der Probanden in Zusammenhang. Ebenso stellten Tonetti et al. [72] 1998 fest, dass Rauchen das Risiko für Parodontitiden erhöht. Einen interessanten Aspekt beschrieben Millar et al. 2007 [73]. Sie wiesen nach, dass Raucher im Durchschnitt seltener einen Zahnarzt aufsuchen als Nicht-Raucher. Somit scheinen die hohen Dimethylsulfidkonzentrationen mit dem Zahnstatus der Raucher zusammenzuhängen. Die Konzentrationen der Bronchialkarzinompatienten entsprachen in unserer Studie denen der gesunden Kontrollgruppe. Dies ist möglicherweise damit zu erklären, dass sich die Patienten einer Radiotherapie unterziehen mussten. Dafür ist es erforderlich, den Zahnstatus gründlichst zu sanieren. Somit stellt das Dimethylsulfid keinen Marker für das Bronchialkarzinom dar. Es ist eher ein Indikator für den Zahnstatus der Probanden.

Acetonitril, Benzol und Toluol wurden bereits als typische Markersubstanzen für den Zigarettenkonsum beschrieben [74, 75, 76, 77]. Diese Ergebnisse konnten wir bestätigen. Der eindeutige Unterschied der Konzentrationen dieser Substanzen zwischen Rauchern und Bronchialkarzinompatienten erklärt sich dadurch, dass 11 der 15 Karzinompatienten das Rauchen mit der Diagnose aufgaben.

Im Rahmen der klinischen Studie wurden die nicht-volatilen Serumentumormarker CEA, NSE und CYFRA 21.1 aller drei Referenzgruppen mitbestimmt. Sie sind zahlreich untersuchte Marker für das Vorhandensein von Tumormasse bei Lungenkrebspatienten [78, 79, 80] und werden zur Therapieverlaufs- und Rezidivkontrolle schon seit vielen Jahren eingesetzt. Als Screeningparameter eignen sie sich nicht, da sie erst in fortgeschrittenen Tumorstadien in ihrer Konzentration steigen und die interindividuellen Schwellenwerte große Unterschiede aufweisen. Die Auswertung der nicht-volatilen Serumentumormarker zeigte eine hohe Streuung der Konzentrationen. Vergleicht man die Serumentumormarker mit einem potentiellen volatilen Tumormarker, Butanal, findet man in der ROC-Analyse ähnliche Werte in Bezug auf Sensitivität, Spezifität und Trennschärfe.

Einschränkend muss erwähnt werden, dass die relativ geringe Probandenzahl unserer Studie statistisch signifikante Unterschiede beeinflusst haben könnte. Um die Tauglichkeit

von volatilen Atemgasmarkern zur Diagnostik von Bronchialkarzinompatienten weiter zu untersuchen, wären daher Studien mit größeren Patientenzahlen wünschenswert. Die verwendete Analysemethodik mittels SPME und GC-MS erlaubt zudem nur einen Nachweis der volatilen Substanzen bis in den unteren ppb-Bereich. Die Untersuchung besonders interessanter Substanzgruppen wie z.B. der Aldehyde mit verbesserten Analyseverfahren, die den quantitativen Nachweis dieser Verbindungen bis in den ppt-Bereich ermöglichen, könnte weitere wichtige Erkenntnisse über potentielle Marker liefern.

Für ein klinisch einsetzbares Screeningverfahren wäre ein transportables Analysegerät erforderlich, welches ohne Expertenwissen direkt am Patienten einsetzbar ist. Die in der Studie verwendete Art der Probennahme in Kombination mit einem laborbasierten Messverfahren (GC-MS) ist dafür nur wenig geeignet. Andererseits sind sowohl kontrollierte Probennahmeverfahren als auch hochempfindliche selektive laborbasierte Analysemethoden eine wichtige Voraussetzung für die Identifizierung neuer Biomarker. Erste vielversprechende Entwicklungen in diesem Bereich sind erkennbar. Miekisch et al. zeigten, dass die CO₂-kontrollierte Atemgasnahme auch automatisiert erfolgen kann [81]. Das dabei verwendete System erlaubt sowohl eine Kopplung mit einfachen, bettseitig einsetzbaren Techniken wie Sensoren für den Einsatz am Patienten als auch eine direkte Verbindung mit hochkomplexen (laborbasierten) Analyseverfahren wie z.B. der direkten Massenspektrometrie oder zu speziellen Präkonzentrationsverfahren für die GC-MS-Analyse.

Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse bieten eine gute Basis für weiterführende Studien. Erst eine Kombination aus kontrollierter alveolarer Probennahme und spezifischen hochempfindlichen Messverfahren für die Identifizierung potentieller Biomarker einerseits und patientennah einsetzbaren Verfahren andererseits würde einen breiteren Einsatz der Atemgasanalytik im klinischen Bereich ermöglichen.

5. Zusammenfassung

Trotz zahlreicher Studien zur Erkennung von Bronchialkarzinomen mittels Atemgasanalytik in den vergangenen Jahren ist bislang noch kein entscheidender Durchbruch gelungen. Eine Ursache dafür ist eine fehlende Standardisierung der Probennahmemethode. Unsere Studie zeigte, dass die Probennahme großen Einfluss auf die Konzentrationen der Atemgasanalyten besitzt. Nur die CO₂-kontrollierte Abnahme von Atemgas liefert reproduzierbar alveolare Proben, die die Blutkonzentration volatiler Krankheitsmarker widerspiegelt. VOC-Konzentrationen in der Inspirationsluft beeinflussen ebenfalls die Atemgasanalytik und müssen in die Interpretation miteinbezogen werden. Bereits beschriebene Krebsmarker wie das Isopropanol und das 2-Butanon stellten sich in dieser Studie als rein exogene Substanzen heraus. Acetonitril, Benzol und Toluol wurden als Raucher-spezifische Substanzen bestätigt. Die Aldehyde stellten sich als vielversprechende Markersubstanzklasse heraus. In dieser Studie zeigten sich statistisch signifikante Unterschiede des Butanals zwischen den Patienten mit Bronchialkarzinom und den Referenzgruppen. Der Vergleich von Butanal mit den nicht-volatilen Serumentumormarkern CEA, CYFRA 21.1 und NSE zeigte ähnliche Sensitivitäten und Spezifitäten.

Unsere Arbeit bestätigte, dass sich in der Atemgasanalyse als Screeningverfahren für das Bronchialkarzinom ein großes Potential verbirgt. Zukünftig müssen weitere Studien mit hohen Probandenzahlen folgen, um detailliertere Erkenntnisse zu gewinnen. Zudem ist eine technische Weiterentwicklung der Analyseverfahren nötig, sodass patientennah leicht durchführbare Messungen möglich sind. Wenn dies gelingt, scheint ein Atemgasmarker bzw. ein Markerset als Screeningverfahren zur Diagnostik von Bronchialkarzinomen realisierbar.

6. Thesen

1. Die Methode der Atemgasprobenentnahme beeinflusst die Konzentration von Atemgasanalyten.
2. Die CO₂-kontrollierte Probennahmetechnik liefert reproduzierbar alveolare Atemgasproben.
3. Bei der gemischt-expiratorischen Probennahme erfolgt eine Dilution des Alveolargases mit Luft aus dem physiologischen Totraum.
4. VOC-Konzentrationen in der Inspirationsluft beeinflussen die Atemgasanalytik und müssen bei Interpretationen beachtet werden.
5. Der in der Literatur beschriebene „Krebsmarker“ Isopropanol stellt eine Kontamination der Atemgasprobe mit Raumluft dar.
6. Erhöhte Konzentrationen von Acetonitril, Benzol und Toluol sind charakteristisch für Raucher.
7. Die Atemgaskonzentration von Dimethylsulfid ist abhängig vom Zahnstatus der Probanden.
8. Isopren und Aceton stellen aus dem Blut kommende volatile organische Substanzen dar.
9. Die Substanzgruppe der Aldehyde birgt ein großes diagnostisches Potential für das Bronchialkarzinom.
10. Butanal zeigt ähnliche Werte in Bezug auf Sensitivität, Spezifität und Trennschärfe im Vergleich zu den Serumentumormarkern NSE, CYFRA 21.1 und CEA.

7. Literaturverzeichnis

- [1] Boyle P, Ferlay J. Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. *Ann Oncol* 2005; 16:481-488.
- [2] Foy M, Spitz MR, Kimmel M, Gorlova OY. A smoking-based carcinogenesis model for lung cancer risk prediction. *Int J Cancer*.2010
- [3] Oberg M, Jaakkola MS, Woodward A, Peruga A, Pruss-Ustun A. Worldwide burden of disease from exposure to second-hand smoke: a retrospective analysis of data from 192 countries. 2011. *Lancet*; 377:139-146.
- [4] Pisick E, Jagadeesh S, Salgia R. Small cell lung cancer: from molecular biology to novel therapeutics. *J Exp Ther Oncol* 2003; 3:305-318.
- [5] Epler GR. Screening for lung cancer. Is it worthwhile? *Postgrad Med* 1990; 87:181-186.
- [6] Ellis JR, Gleeson FV. New concepts in lung cancer screening. *Curr Opin Pulm Med* 2002; 8:270-274.
- [7] Ma PC, Blaszkowsky L, Bharti A, et al. Circulating tumor cells and serum tumor biomarkers in small cell lung cancer. *Anticancer research* 2003; 23:49-62.
- [8] Phillips M, Gleeson K, Hughes JM, et al. Volatile organic compounds in breath as markers of lung cancer: a cross-sectional study. *Lancet* 1999; 353:1930-1933.
- [9] Phillips M, Altorki N, Austin JH, et al. Prediction of lung cancer using volatile biomarkers in breath. *Cancer Biomark* 2007; 3:95-109.
- [10] Fuchs P LC, Schubert JK, Miekisch W. Breath gas aldehydes as biomarkers of lung cancer. *Int J Cancer* 2010; 126(11):2663-2670.
- [11] Di Natale C, Macagnano A, Martinelli E, et al. Lung cancer identification by the analysis of breath by means of an array of non-selective gas sensors. *Biosens Bioelectron* 2003; 18:1209-1218.
- [12] Hunter GW, Dweik RA. Applied breath analysis: an overview of the challenges and opportunities in developing and testing sensor technology for human health monitoring in aerospace and clinical applications. *J Breath Res* 2008; 2:037020.
- [13] Stokes MA. Antoine Lavoisier and the study of respiration: 200 years old. *Aust N Z J Surg* 1991; 61:229-232.
- [14] Pauling L, Robinson AB, Teranishi R, Cary P. Quantitative analysis of urine vapor and breath by gas-liquid partition chromatography. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971; 68:2374-2376.
- [15] Kischkel S, Miekisch W, Sawacki A, et al. Breath biomarkers for lung cancer detection and assessment of smoking related effects--confounding variables, influence of normalization and statistical algorithms. *Clin Chim Acta*; 2010; 411:1637-1644.

-
- [16] Rieder J, Lirk P, Ebenbichler C, et al. Analysis of volatile organic compounds: possible applications in metabolic disorders and cancer screening. *Wien Klin Wochenschr* 2001; 113:181-185.
- [17] Spanel P, Smith D. Progress in SIFT-MS: Breath analysis and other applications. *Mass Spectrom Rev.* 2011;30(2):236-67.
- [18] Manolis A. The diagnostic potential of breath analysis. *Clinical chemistry* 1983; 29:5-15.
- [19] Buszewski B, Keszy M, Ligor T, Amann A. Human exhaled air analytics: biomarkers of diseases. *Biomed Chromatogr* 2007; 21:553-566.
- [20] Miekisch W, Schubert, JK. From highly sophisticated analytical techniques to life-saving diagnostics: Technical developments in breath analysis *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2006 25:665-673
- [21] Gordon SM, Szidon JP, Krotoszynski BK, Gibbons RD, O'Neill HJ. Volatile organic compounds in exhaled air from patients with lung cancer. *Clinical chemistry* 1985; 31:1278-1282.
- [22] Poli D, Goldoni M, Caglieri A, et al. Breath analysis in non small cell lung cancer patients after surgical tumour resection. *Acta Biomed* 2008; 79 Suppl 1:64-72.
- [23] Phillips M, Altorki N, Austin JH, et al. Detection of lung cancer using weighted digital analysis of breath biomarkers. *Clin Chim Acta* 2008; 393:76-84.
- [24] Wehinger A, Schmid, A, Mechtcheriakov, S, Ledochowski, M, Grabmeyer, C, Guenther A, Gastl, and Amann, A, Lung cancer detection by proton transfer reaction mass-spectrometric analysis of human breath gas. *International Journal of Mass Spectrometry* 2007; 265:49-59.
- [25] Miekisch W, Kischkel S, Sawacki A, Liebau T, Mieth M, Schubert JK. Impact of sampling procedures on the results of breath analysis. *J Breath Res* 2008; 2(2):026007.
- [26] Solga THRSF. Current status of clinical breath analysis *Applied Physics B: Lasers and Optics* 2006; 85:421-426.
- [27] Miekisch W, Schubert JK, Noeldge-Schomburg GF. Diagnostic potential of breath analysis--focus on volatile organic compounds. *Clin Chim Acta* 2004; 347:25-39.
- [28] Birken T, Schubert J, Miekisch W, Noldge-Schomburg G. A novel visually CO₂ controlled alveolar breath sampling technique. *Technol Health Care* 2006; 14:499-506.
- [29] Fletcher R, Jonson B. Dead-space and the single breath test for carbon dioxide during anaesthesia and artificial ventilation. Effects of tidal volume and frequency of respiration. *Anaesthesia* 1984:109-119.

-
- [30] Schubert JK MW, Birken T, Geiger K, Nöldge-Schomburg GF. Impact of inspired substance concentrations on the results of breath analysis in mechanically ventilated patients. *Biomarkers* 2005 Mar-Jun;10(2-3):138-52 2005.
- [31] Phillips M, Greenberg J, Sabas M. Alveolar gradient of pentane in normal human breath. *Free radical research* 1994; 20:333-337.
- [32] Phillips M. Method for the collection and assay of volatile organic compounds in breath. *Anal Biochem* 1997; 247:272-278.
- [33] Risby TH. Critical issues for breath analysis. *J Breath Res* 2 (2008) 030302 (3pp) 2008.
- [34] Risby TH, Sehnert SS. Clinical application of breath biomarkers of oxidative stress status. *Free Radic Biol Med* 1999; 27:1182-1192.
- [35] Fuchs P Löseken C, Schubert JK, Miekisch W. Breath gas aldehydes as biomarkers of lung cancer. *Int J Cancer* 2010; 126(11):2663-2670.
- [36] Deng C, Zhang X, Li N. Investigation of volatile biomarkers in lung cancer blood using solid-phase microextraction and capillary gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of chromatography* 2004; 808:269-277.
- [37] Shahidi F. Headspace volatile aldehydes as indicators of lipid oxidation in foods. *Adv Exp Med Biol* 2001; 488 113-123.
- [38] Corradi M PP, Manini P, Andreoli R, Goldoni M, Poppa M, Moscato G, Balbi B, Mutti A. Comparison between exhaled and sputum oxidative stress biomarkers in chronic airway inflammation. *Eur Respir J* 2004; 24:1011-1017.
- [39] Soomro IN HJ, Whimster WF. Predicting prognosis in lung cancer: use of proliferation marker, Ki67 monoclonal antibody. *J Pak Med Assoc* 1998; 48:66-69.
- [40] Orhan H vHB, Krab B, Moeken J, Vermeulen NP, Hollander P, Meerman JH. Evaluation of a multi-parameter biomarker set for oxidative damage in man: increased urinary excretion of lipid, protein and DNA oxidation products after one hour of exercise. *Free Radic Res* 2004:1269-1279.
- [41] Reinheckel T, Noack H, Lorenz S, Wiswedel I, Augustin W. Comparison of protein oxidation and aldehyde formation during oxidative stress in isolated mitochondria. *Free radical research* 1998; 29:297-305.
- [42] Szatrowski TP, Nathan CF. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res* 1991; 51:794-798.
- [43] Toyokuni S. Molecular mechanisms of oxidative stress-induced carcinogenesis: from epidemiology to oxygenomics. *IUBMB Life* 2008; 60:441-447.
- [44] Eggink M, Wijtman M, Ekkebus R, et al. Development of a selective ESI-MS derivatization reagent: synthesis and optimization for the analysis of aldehydes in biological mixtures. *Anal Chem* 2008; 80:9042-9051.

-
- [45] Yazdanpanah M LX, Lau R, Greenberg M, Fisher LJ, Lehotay DC. Cytotoxic aldehydes as possible markers for childhood cancer. *Free Radic Biol Med* 1997; 23:870-878.
- [46] Preti G, Labows JN, Kostelc JG, Aldinger S, Daniele R. Analysis of lung air from patients with bronchogenic carcinoma and controls using gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr* 1988; 432:1-11.
- [47] Phillips M, Cataneo RN, Cummin AR, et al. Detection of lung cancer with volatile markers in the breath. *Chest* 2003; 123:2115-2123.
- [48] Kneepkens CM, Lepage G, Roy CC. The potential of the hydrocarbon breath test as a measure of lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med* 1994; 17:127-160.
- [49] Aghdassi E AJ. Breath alkanes as a marker of oxidative stress in different clinical conditions. *Free Radic Biol Med* 2000:880-886.
- [50] Reilly PM, Schiller HJ, Bulkley GB. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *Am J Surg* 1991; 161:488-503.
- [51] Sun K, Kiss E, Bedke J, et al. Role of xanthine oxidoreductase in experimental acute renal-allograft rejection. *Transplantation* 2004; 77:1683-1692.
- [52] Izumi M, McDonald MC, Sharpe MA, Chatterjee PK, Thiernemann C. Superoxide dismutase mimetics with catalase activity reduce the organ injury in hemorrhagic shock. *Shock* 2002; 18:230-235.
- [53] Evans CD, List GR, Dolev A, McConnell DG, Hoffmann RL. Pentane from thermal decomposition of lipoxidase-derived products. *Lipids* 1967; 2:432-434.
- [54] Dumelin EE, Tappel AL. Hydrocarbon gases produced during in vitro peroxidation of polyunsaturated fatty acids and decomposition of preformed hydroperoxides. *Lipids* 1977; 12:894-900.
- [55] Aghdassi E, Wendland BE, Steinhart AH, Wolman SL, Jeejeebhoy K, Allard JP. Antioxidant vitamin supplementation in Crohn's disease decreases oxidative stress. a randomized controlled trial. *Am J Gastroenterol* 2003; 98:348-353.
- [56] Kohlmüller D KW. Is n-pentane really an index of lipid peroxidation in humans and animals? A methodological reevaluation. *Anal Biochem* 1993:268-276.
- [57] Loft S, Poulsen HE. Cancer risk and oxidative DNA damage in man. *J Mol Med* 1996; 74:297-312.
- [58] Ray G, Batra S, Shukla NK, et al. Lipid peroxidation, free radical production and antioxidant status in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2000; 59:163-170.
- [59] Hietanen E, Bartsch H, Bereziat JC, et al. Diet and oxidative stress in breast, colon and prostate cancer patients: a case-control study. *Eur J Clin Nutr* 1994; 48:575-586.

-
- [60] Lechner M, Moser B, Niederseer D, et al. Gender and age specific differences in exhaled isoprene levels. *Respir Physiol Neurobiol* 2006; 154:478-483.
- [61] Karl T, Prazeller P, Mayr D, et al. Human breath isoprene and its relation to blood cholesterol levels: new measurements and modeling. *J Appl Physiol* 2001; 91:762-770.
- [62] Pabst F, Miekisch W, Fuchs P, Kischkel S, Schubert JK. Monitoring of oxidative and metabolic stress during cardiac surgery by means of breath biomarkers: an observational study. *J Cardiothorac Surg* 2007; 2:37.
- [63] Nelson N, Lagesson V, Nosratabadi AR, Ludvigsson J, Tagesson C. Exhaled isoprene and acetone in newborn infants and in children with diabetes mellitus. *Pediatr Res* 1998; 44:363-367.
- [64] Andersson K, Arner P. Systemic nicotine stimulates human adipose tissue lipolysis through local cholinergic and catecholaminergic receptors. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001; 25:1225-1232.
- [65] An Z, Wang H, Song P, Zhang M, Geng X, Zou MH. Nicotine-induced activation of AMP-activated protein kinase inhibits fatty acid synthase in 3T3L1 adipocytes: a role for oxidant stress. *J Biol Chem* 2007; 282:26793-26801.
- [66] Bajtarevic A, Ager C, Pienz M, et al. Noninvasive detection of lung cancer by analysis of exhaled breath. *BMC cancer* 2009; 9:348.
- [67] Sponring A, Filipiak W, Mikoviny T, et al. Release of volatile organic compounds from the lung cancer cell line NCI-H2087 in vitro. *Anticancer research* 2009; 29:419-426.
- [68] Song G, Qin T, Liu H, et al. Quantitative breath analysis of volatile organic compounds of lung cancer patients. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*; 67:227-231.
- [69] Suarez FL, Furne JK, Springfield J, Levitt MD. Morning breath odor: influence of treatments on sulfur gases. *J Dent Res* 2000; 79:1773-1777.
- [70] Tangerman A, Winkel EG. Intra- and extra-oral halitosis: finding of a new form of extra-oral blood-borne halitosis caused by dimethyl sulphide. *Journal of Clinical Periodontology* Volume 34 Issue 9, Pages 748 – 755
- [71] Van den Velde S, van Steenberghe D, Van Hee P, Quirynen M. Detection of odorous compounds in breath. *J Dent Res* 2009; 88:285-289.
- [72] Tonetti MS. Cigarette smoking and periodontal diseases: etiology and management of disease. *Ann Periodontol* 1998; 3:88-101.
- [73] Millar WJ, Locker D. Smoking and oral health status. *J Can Dent Assoc* 2007; 73:155.
- [74] Ligor M, Ligor T, Bajtarevic A, et al. Determination of volatile organic compounds in exhaled breath of patients with lung cancer using solid phase microextraction and gas chromatography mass spectrometry. *Clin Chem Lab Med* 2009; 47:550-560.

-
- [75] Buszewski B, Ulanowska A, Ligor T, Denderz N, Amann A. Analysis of exhaled breath from smokers, passive smokers and non-smokers by solid-phase microextraction gas chromatography/mass spectrometry. *Biomed Chromatogr* 2009; 23:551-556.
- [76] Alonso M, Castellanos M, Sanchez JM. Evaluation of potential breath biomarkers for active smoking: assessment of smoking habits. *Anal Bioanal Chem*; 396:2987-2995.
- [77] Perbellini L, Princivalle A, Cerpelloni M, Pasini F, Brugnone F. Comparison of breath, blood and urine concentrations in the biomonitoring of environmental exposure to 1,3-butadiene, 2,5-dimethylfuran, and benzene. *Int Arch Occup Environ Health* 2003; 76:461-466.
- [78] Komagata H, Yoneda S. [Lung cancer]. *Gan To Kagaku Ryoho* 2004; 31:1609-1613.
- [79] Wu GP, Ba J, Zhao YJ, Wang EH. Diagnostic value of CEA, CYFRA 21-1, NSE and CA 125 assay in serum and pleural effusion of patients with lung cancer. *Acta Cytol* 2007; 51:679-680.
- [80] Molina R, Auge JM, Bosch X, et al. Usefulness of serum tumor markers, including progastrin-releasing peptide, in patients with lung cancer: correlation with histology. *Tumour Biol* 2009; 30:121-129.
- [81] Miekisch WH, A. Kischkel, S. Beckmann, U. Mieth, M. Schubert, J.K. Construction and Evaluation of a Versatile Controlled Breath Collection Device. *Sensors Journal, IEEE* 2010; 10:211-215.

8. Anhang

8.1 Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, die vorliegende Arbeit „Atemgasanalytik zur Erkennung von Bronchialkarzinomen“ selbstständig angefertigt und ohne fremde Hilfe verfasst sowie keine außer den von mir angegebenen Hilfsmitteln und Quellen dazu verwendet zu haben. Die benutzten Werke, inhaltlich und wörtlich entnommene Stellen sind als solche kenntlich gemacht.

Hamburg, den 14. Mai 2011

Annika Sawacki

8.2 Danksagung

Besonderer Dank gilt meinen „Doktorvätern“ Jochen Schubert und Wolfram Miekisch.

Ich hatte stets eine spannende und lehrreiche Zeit bei euch!

Weiterhin möchte ich mich bei Sabine Kischkel, Patricia Fuchs und der gesamten „Arbeitsgruppe Atemgas“ für die gute Zusammenarbeit bedanken. Ihr ward mir eine große Hilfe! Die Zeit in der Arbeitsgruppe wird mir immer in guter Erinnerung bleiben.

Ein großer Dank gilt ebenso der Abteilung für Pneumologie der Klinik für Innere Medizin der Universität Rostock, die mir ein angenehmes Arbeiten auf ihren Stationen ermöglichte.

Zum Schluss möchte ich meiner Familie und Freunden recht herzlich für die große Unterstützung während der gesamten Zeit der Erstellung meiner Dissertation danken!

8.3 Publikationen und Tagungsbeiträge

Publikationen

- Miekisch W, Kischkel S, Sawacki A, Liebau T, Mieth M, Schubert JK. Impact of sampling procedures on the results of breath analysis.
J Breath Res 2008; 2(2):026007.
- Kischkel S, Miekisch W, Sawacki A, Straker E M, Trefz P, Amann A, Schubert J K. Breath biomarkers for lung cancer detection and assessment of smoking related effects-confounding variables, influence of normalization and statistical algorithms.
Clin Chim Acta 2010; 411:1637-1644.

Tagungsbeiträge

- Evaluation of breath sampling procedures in lung cancer patients;
Kischkel S, Sawacki A, Liebau T, Miekisch W, Schubert J
Vortrag; ERS, Berlin, 2008
- Impact of sampling and storage onto results of breath analysis;
Kischel S, Sawacki A, Miekisch W.,
Poster; Breath Analysis in Physiology and Medicine, Prag, 2007