

Atemkondensatsammlung abhängige Verdünnung ein. Die genauen Mechanismen der Aerosolentstehung sind bisher nicht bekannt. Die Menge der freigesetzten Aerosolpartikel liegt bei ca. 0,1 bis 4 Partikel/cm³ und weist einen mittleren Diameter von 0,3 µm auf [206–208]. Verringert sich der Kondenswasseranteil, so kommt es bei gleichbleibendem Aerosolan- teil zu einer höheren Konzentration der eigentlich interessierenden ELF-Bestandteile. Dies macht deutlich, warum die Verwendung eines einheitlichen Sammelsystems für eine gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse entscheidend ist. Dieser Effekt mag zu den in der Literatur beschriebenen teilweise stark divergierenden Ergebnissen für ein und denselben Marker beitragen [209].

1.2.3.2 *Vorrichtungen zur Gewinnung von Atemkondensat*

Während anfänglich zumeist selbstentwickelte Sammelgeräte zum Einsatz kamen, bei denen ein Kunststoffschlauch durch ein Eisbad geführt wurde, stehen jetzt kommerzielle Geräte zur Verfügung: CRYOCOND® (MediUm-SENSOR, Berlin), ECoSreen™ (ViaSys, Höch- berg) sowie RTube™ (Respiratory Research, Charlottesville). Beim CRYOCOND® Gerät, das mittlerweile nicht mehr hergestellt wird, wurde auf eine im Durchmesser 3 cm messende, mit Folie überspannte Metallplatte geatmet, die durch ein piezoelektrisches Element ge- kühlt wurde. Ein Problem dieser Anordnung bestand darin, dass ein Teil des Aerosols von der Membran wieder reflektiert wurde und verloren ging, wodurch die Materialausbeute zu gering ausfiel. Im ECoSreen™ wird die Ausatemluft in einem 10 cm langen, austausch- baren und mit Teflon beschichtetem Sammelrohr durch ein umgebendes Kühlsystem auf –20 °C abgekühlt. Das Sammelrohr verfügt dabei über einen inneren (den Luftstrom zu- führenden) und einen äußeren (den Luftstrom abführenden) Bereich. Die Umkehr des Luftstromes findet im Bodenbereich der Sammeleinheit statt [210]. Das RTube™ hingegen besteht aus einer Plastikröhre, um die ein im Gefrierschrank vorgekühltes Aluminiumrohr gesteckt wird. Über ein Mundstück kann direkt in dieses Rohr ausgeatmet werden. Das ermöglicht die Anwendung überall, auch im häuslichen Milieu. Dabei muss allerdings in Kauf genommen werden, dass eine langsame Erwärmung während des Sammelns statt- findet und so auch keine vollkommen konstante Beziehung zwischen Aerosolniederschlag und Kondensatgewinnung gegeben ist.

1.2.3.3 *Einflussfaktoren auf die Atemkondensatentstehung, Materialmenge und Nachweisverfahren*

Zu den potentiellen Einflussfaktoren auf die Aerosolentstehung zählen Tidalvolumen, Druckunterschiede und Flussgeschwindigkeiten in den kleinen Atemwegen/Alveolen sowie die Geschwindigkeit der Ausatmung. Allerdings liegen zu diesen Aspekten kaum Daten vor. Sicher ist nur, dass das Atemkondensat auch nicht-flüchtige Komponenten aus den unteren Atemwegen enthält [202, 211]. Eine weitere Variable ist die Kondensatmenge. Sie kann — wie bereits dargestellt — durch das Sammelssystem wesentlich beeinflusst werden. Hauptanliegen ist eine möglichst effiziente Gewinnung der Aerosolfraction. Nachdem der Nachweis eines linearen Zusammenhangs zwischen geatmetem Volumen und der gesammelten Atemkondensatmenge erbracht wurde [199], kann durch Erhöhung des Atemvolumens mehr Material gewonnen und dem analytischen Bedarf angepasst werden. Dabei wird auch über einen längeren Sammelzeitraum die Konzentration der

im Atemkondensat enthaltenen Bestandteile nicht beeinflusst [199]. Da sich für einige Marker die Konzentration an der Nachweisgrenze bewegt und eine Messung nur möglich ist, wenn die Proben zuvor konzentriert werden (z. B. für den Nachweis von Interleukinen oder für eine Proteinelektrophorese), kann durch Atmung von mehr Volumen z. B. über die Zeit ausreichend Untersuchungsmaterial gewonnen werden.

Eine immer wieder vermutete Verunreinigung durch Beimengungen aus dem Mund, vor allem durch Speichel, kann natürlich Ergebnisse stark verfälschen. Ein wichtiger Kontrollmarker im Atemkondensat ist daher die Amylaseaktivität [212]. Sie dient dem Ausschluss einer relevanten Verunreinigung durch Speichel und stellt somit einen Faktor zur Qualitätskontrolle dar. Mit den meist verwendeten Nachweismethoden auf enzymkinetischer Basis kann eine relevante Verunreinigung ausgeschlossen werden; allerdings lassen sich mit noch sensibleren Methoden (western blot) geringe Mengen an Amylase auch bei intubierten Patienten im Atemkondensat nachweisen. Die Konzentrationen liegen hier jedoch zehntausendmal niedriger als die im Speichel nachweisbaren [202, 213, 214]. Entzündungszellen in der Lunge bilden ebenfalls Amylase [215]. Die Amylase in der bronchialen Spülflüssigkeit wurde sogar als ein möglicher Marker für Lungenkarzinome vorgeschlagen [216].

1.2.3.4 Reproduzierbarkeit der Methode

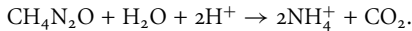
Bezogen auf das ausgeatmete Volumen ist die Menge des Atemkondensates bei gleicher Technik der Gewinnung konstant. Dieser Zusammenhang scheint unabhängig von der Größe des Tidalvolumens zu sein. Das überrascht nicht, denn die ausgeatmete Luft ist nahezu mit Wasserdampf gesättigt, und Wasser bildet mit 99 % den Hauptbestandteil des Atemkondensates [197, 199]. Die aus der Literatur erkennbare Schwankungsbreite einzelner Mediatoren im Atemkondensat ist unterschiedlich: Relativ gute Vergleichbarkeit lässt sich für Adenosin, Aldehyd, Glutathion, 8-Isoprostan, Leukotriene, PGE₂ und den pH-Wert erkennen [212, 214, 217–220]. Beim pH-Wert im Atemkondensat zeigte sich darüber hinaus eine Abhängigkeit von der Sammelzeit bei gesunden Probanden, wenn man 3 min Sammelzeit 20 min gegenüberstellt [221]. Über eine große Variabilität der Konzentrationen wurde hingegen bei den Zytokinen berichtet [204, 212, 222–226]. Der Grund für diese Variabilität ist nicht geklärt, aber zwei Dinge tragen möglicherweise bei:

1. Schwankungen in der Verdünnung der Marker im Atemkondensat, die z. B. durch unterschiedliche Sammelsysteme entstehen und
2. die geringe Konzentration der jeweiligen Substanzen, die teilweise im untersten Messbereich der Assays liegt.

1.2.3.5 Standardisierung der Methode

Im Gegensatz zur BAL besteht bei der Gewinnung des Atemkondensates ein entscheidender Vorteil neben der fehlenden Invasivität in der fehlenden Verdünnung durch eine Spüllösung. Dieser Vorteil wird teilweise wieder aufgehoben infolge einer unbekannten Verdünnung durch kondensiertes Wasser aus den Atemwegen und der Lunge. Bei gleicher oder vergleichbarer Gewinnung dürfte sich allerdings die Variabilität, die durch diesen

Faktor in das System eingeführt wird, in relativ engen Grenzen halten. Dafür gibt es erste Anhaltspunkte. Die Ermittlung des Verdünnungsfaktors ist daher auch als Methode der Standardisierung [202] geeignet. Der Verdünnungsfaktor kann ermittelt werden, indem die Konzentrationen von Natrium und Chlorid im Atemkondensat bestimmt werden und zusätzlich angenommen wird, dass sie in der ELF in plasmagleicher Konzentration vorhanden sind [202, 227]. Alternativ kann der Harnstoff oder die Proteinkonzentration als „interner Standard“ dienen, wie dies auch für die BALF beschrieben wurde [8]; allerdings ist die Messung von Harnstoff in vielen Assays dadurch erschwert, dass Ammoniak „mitgemessen“ wird, weil folgende Reaktion unter Beihilfe der Urease abläuft:



Ammoniak ist deshalb problematisch, weil auch gasförmiger Ammoniak sich aufgrund seiner sehr guten Löslichkeit in Wasser sofort im Kondensatwasser anreichert [228].

Bisher gibt es keinen allgemein akzeptierten Goldstandard, aber die Na^+ - und Cl^- -Ionenkonzentrationsbestimmung ist vermutlich besser als jede Technik, die für die BAL eingesetzt wird. Dabei wird allerdings davon ausgegangen, dass beide Ionen im ELF in gleicher Konzentration wie im Plasma vorhanden sind. Optimal wäre hier ein Marker, der — gleichmäßig in der ELF wie im Plasma konzentriert — in stabiler Form vorliegt und in der Lunge bzw. den Atemwegen weder produziert, sezerniert oder degradiert wird. Obwohl also die Verdünnung durch Kondenswasser einen großen Einfluss auf die Konzentration der im Atemkondensat befindlichen Substanzen hat, ist es unwahrscheinlich, dass die bisher beschriebenen krankheitsspezifischen Unterschiede verschiedener Substanzen allein mit derartigen Abweichungen zu erklären sind.

1.2.3.6 Vergleich Atemkondensat und BAL/Bronchialflüssigkeit

Zum Vergleich der Konzentrationen unterschiedlicher Substanzen in der bronchoalveolären Lavage und dem Atemkondensat existieren kaum Daten. Ein direkter Vergleich von BAL mit dem Atemkondensat ist dabei für jede einzelne Substanz zu fordern. In einer eigenen Arbeit, die die Nitritkonzentration bei beatmeten Patienten mit akutem Lungenschaden untersuchte, wurde ein Vergleich zwischen BAL und Atemkondensat in einer Teilmenge der Patienten durchgeführt, bei der beide diagnostischen Prozeduren in Folge eingesetzt wurden. Dabei konnte allerdings eine recht gute Korrelation ($r = 0,79$, $p < 0,05$, $n = 10$) der Konzentrationen von Nitrit im Atemkondensat und in der BAL festgestellt werden [229]. Ganz anders stellt sich die Situation beim Vergleich von Zytokinen im Atemkondensat und der BAL dar. Hier fanden wir in einer Untersuchung für die Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10; IL-12 und TNF- α keine Korrelationen zwischen den Atemkondensatwerten und den BAL-Werten (Tabelle 7.3). Ein systematischer Vergleich von BAL und Atemkondensat ist notwendig, allerdings muss bei der Interpretation beachtet werden, dass die BAL mit ihrer vermutlich in hohem Maße variablen Verdünnung eines unterschiedlich großen ELF-Anteils als Goldstandard nur bedingt geeignet ist.

1.2.3.7 Marker und Mediatoren im Atemkondensat

Eine Vielzahl von Substanzen wurde bisher im Atemkondensat nachgewiesen. Ein Schwerpunkt lag dabei bei Markern für oxidativen Stress und/oder Entzündung. Diese Substanzen sollen im Folgenden vorgestellt werden (Tabelle 1.4).

Tabelle 1.4: Mediatoren im Atemkondensat

Mediator	Erkrankung	Veränderung	Literatur
H ₂ O ₂	Kontrollen		[296, 312]
	Raucher/Exraucher	Erhöhte Werte	[238, 296, 313]
	Asthma	Erhöhte Werte	[234–237, 314, 315]
	COPD	Erhöhte Werte	[233, 239–242, 249, 250, 316]
	Bronchiektasen	Erhöhte Werte	[243, 244]
	Zystische Fibrose	Erhöhte Werte	[245, 246]
	ARDS	Erhöhte Werte	[197, 247, 248]
	Akutes hypoxämisches Lungenversagen	Erhöhte Werte	[317]
	Reperfusionsschaden	Erhöhte Werte	[318]
	Allergische Rhinitis	Erhöhte Werte	[315]
	Erkältung	Erhöhte Werte	[319]
	Postoperativ nach Lungenresektion	Erhöhte Werte	[320]
	Systemische Sklerose	Erhöhte Werte	[321]
	Hypoxie/Reoxygenierung (experimentelles Modell)	Erhöhte Werte	[322, 323]
NO und verwandte Produkte			
Nitrit/ Nitrat	Kontrollen		[256–258, 260, 262, 263, 324, 325]
	Asthma	Höhere Werte	[255–258, 260, 261]
	leichtes Asthma	Keine Änderung	[262, 326]
	Zystische Fibrose	Höhere Werte	[258, 262, 263]
	Zystische Fibrose	Keine Änderung	[253]
	Bronchiektasen	Höhere Werte	[261]
	COPD	Höhere Werte	[261, 262]
	COPD	Keine Änderung	[260]
	Pneumonie	Höhere Werte	[260]
	Raucher	Höhere Werte	[260]
	Raucher	Keine Änderung	[262, 324, 325]
	Primäre ziliare Dyskinesie	Keine Änderung	[327]
	Akutes Lungenversagen	Höhere Werte bei steigendem Tidalvolumen	[229]
Nitrotyrosin	Kontrollen		[253, 265]
	Asthma	Höhere Werte	[265]

Nitrosothiol	Zystische Fibrose	Höhere Werte	[253]
	Kontrollen		[262, 327]
	Asthma	Höhere Werte	[262]
	Raucher	Höhere Werte	[262]
	COPD	Höhere Werte	[262]
Adenosin	Zystische Fibrose	Höhere Werte	[262]
	Primäre ziliare Dyskinesie	Keine Änderung	[327]
	Kontrollen		[213, 214]
	Asthma	Höhere Werte	[214]
	Allergische Rhinitis	Höhere Werte	[213]
Prostanoide			
PGE ₂ , PGD ₂ ,	Kontrollen		[277, 292]
TXB ₂	Asthma	Keine Änderung	[277, 292]
	Raucher	Keine Änderung	[277, 292]
PGE ₂	COPD	Höhere Werte	[278]
	Raucher mit Asthma	Höhere Werte	[277]
LTB ₄	Kälber nach	Höhere Werte	[279]
	Atemwegsinfektion		
LTB ₄ , LTC ₄ ,	Kontrollen		[224, 265, 275, 280,
LTD ₄ , LTE ₄			284–286]
	Asthma	Höhere Werte	[265, 275, 280,
			284–286]
	COPD-Exazerbation	Höhere Werte	[287]
LTB ₄	Zystische Fibrose	Höhere Werte	[224]
	Bypass-Operation	Keine Änderung	[300]
	Lobektomie	Höhere Werte	[300]
8-Iso-prostan	Kontrollen		[275, 287, 290–293,
			295, 328]
	Asthma	Erhöhte Werte	[275, 286, 292]
	COPD	Erhöhte Werte	[287, 293, 329]
	Raucher	Erhöhte Werte	[293]
	Interstitielle	Erhöhte Werte	[290]
	Lungenerkrankungen		
	Zystische Fibrose	Erhöhte Werte	[291]
	Obstruktive Schlafapnoe	Erhöhte Werte	[295]
	ARDS	Erhöhte Werte	[294]
	Asthma-Exazerbation	Erhöhte Werte	[284, 286, 292, 330]
	COPD-Exazerbation	Erhöhte Werte	[287, 293]
	Sarkoidose	Erhöhte Werte	[328]
	Ozon-Inhalation	Erhöhte Werte	[331]
Andere Indikatoren für oxidativen Stress			
Thiobarbitat-	Kontrollen		[235, 249]
reaktive	COPD	Erhöhte Werte	[249]
Substanzen	Asthma	Erhöhte Werte	[235]
Aldehyde	Kontrollen		[217, 218]

	COPD	Erhöhte Werte	[217]
	Asthma-Exazerbation	Erhöhte Werte	[218]
Glutathion	Kontrollen		[218]
	Asthma-Exazerbation	Erniedrigte Werte	[218]
pH	Kontrollen		[212, 261, 306, 332, 333]
	Asthma	Keine Änderung	[333]
	Asthma	Erniedrigte Werte	[261, 299, 334]
	Zystische Fibrose	Erniedrigte Werte	[306, 333, 334]
	COPD	Erniedrigte Werte	[261]
	Bronchiektasen	Erniedrigte Werte	[261]
	Akute Lungenschädigung/ Beatmung	Erniedrigte Werte	[212, 300]
Ammoniak ($\text{NH}_3/\text{NH}_4^-$)	Kontrollen		[212, 305]
	Asthma-Exazerbation	Erniedrigte Werte	[305]
	Akute Lungenschädigung	Erniedrigte Werte	[212]
Protein	Kontrollen		[199, 325, 335]
	Raucher	Erhöhte Werte	[325]
	COPD	Keine Änderung	[199]
Zytokine			
IL-1 β	Raucher	Keine Änderung	[325]
IL-4	Asthma	Erhöhte Werte	[226]
IL-6	NSCLC	Erhöhte Werte	[223]
	Obstruktive Schlafapnoe	Erhöhte Werte	[295]
	Zystische Fibrose	Erhöhte Werte	[224]
	Raucher	Erhöhte Werte	[225]
	COPD	Erhöhte Werte	[222, 329]
	Akutes Lungenversagen	Erhöhte Werte	[212]
IL-8	Akutes Lungenversagen	Erhöhte Werte	[212]
IL-10	Reperfusion nach Ischämie	Erhöhte Werte	[309]
Interferon- γ	Asthma	Erniedrigte Werte	[226]
TNF- α	Raucher	Keine Änderung	[325]
Hepatozyten- Wachstumsfaktor	Pneumonie	Erhöhte Werte	[311]
Vitronectin	Fibrosierende Lungenerkrankungen	Erhöhte Werte	[310]
Endothelin-1	Fibrosierende Lungenerkrankungen	Erhöhte Werte	[310]
Andere Marker/ Moleküle			
DNA	Kontrollen/NSCLC	nachweisbar	[200, 201]
P53-Mutationen	NSCLC	nachweisbar	[201]
Endothelin-1	NSCLC	Erhöhte Werte	[336]
Mycobacterium tuberculosis-DNA	Lungentuberkulose	Nicht nachweis- bar	[337]

Pseudomonas aeruginosa, Stenotropho- monas mal- tophilia, Burkholderia cepacia	Zystische Fibrose	Nicht nachweisbar bar	[338]
--	-------------------	--------------------------	-------

H₂O₂ Die Freisetzung von H₂O₂ erfolgt durch Umwandlung von O₂⁻ in H₂O₂ mittels der Superoxiddismutase [125, 230]. Sowohl neutrophile als auch eosinophile Granulozyten, Makrophagen und Epithelzellen sind in der Lage, H₂O₂ freizusetzen [230]. H₂O₂ ist aufgrund seiner großen Reaktionsfreudigkeit in Wasser sehr instabil (da es zu einem Zerfall kommt); daher muss die Messung umgehend nach seiner Gewinnung erfolgen. Alternativ kann das Atemkondensat sofort eingefroren werden. Die Genauigkeit der Messung ist nicht sehr hoch. Sie beträgt 60–80 % [231–233]. Es wurde sowohl von einer Altersabhängigkeit als auch von einem zirkadianen Rhythmus für das exhalierete H₂O₂ berichtet. Erhöhte Werte im Vergleich zu gesunden Probanden wurden gefunden beim Asthma bronchiale [234–237], bei gesunden Rauchern [238], bei der COPD [233, 235, 239–242], bei Bronchiektasen [243, 244], bei zystischer Fibrose [245, 246] und beim ARDS [247, 248]. Die erhöhten H₂O₂-Werte, die bei mittelschwerem Asthma zu finden sind, korrelieren mit den eosinophilen Granulozyten im induzierten Sputum [237]. H₂O₂ ist möglicherweise für eine Verlaufs- und Therapiekontrolle bei Asthma geeignet, denn erhöhte Konzentrationen sind unter einer Therapie mit inhalativen Kortikosteroiden rückläufig [234, 236]. Sowohl bei gesunden Rauchern als auch bei COPD-Patienten wurden erhöhte H₂O₂-Werte gefunden, wobei zwischen den beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede bestanden [239, 240, 249]. Bei der Exazerbation einer COPD fanden sich ebenfalls höhere Werte als bei stabiler Erkrankung [239], sodass erhöhte H₂O₂-Werte eine Krankheitsaktivität widerspiegeln. Inhalative Steroide zeigten im Gegensatz zum Asthma bei der COPD keinen Effekt auf die H₂O₂-Werte [239, 250], eine Langzeitanwendung von N-Acetylcystein als potenzielles Antioxidanz dagegen schon [241]. Keinen Effekt auf die Höhe des H₂O₂ im Exhalat hatte eine Antibiotikatherapie bei Patienten mit zystischer Fibrose [246]. Andererseits zeigte eine Therapie mit Kortikosteroiden beim ARDS einen — wenn auch geringen — Abfall der erhöhten H₂O₂-Werte [247].

In neueren Arbeiten steht die Entwicklung und Validierung von Messmethoden mit einer besseren Reproduzierbarkeit und einer schnelleren Verfügbarkeit im Vordergrund [242, 251, 252].

NO und abgeleitete Verbindungen Nitrit, das entsteht, wenn NO in wässriger Umgebung freigesetzt wird, kann spektrophotometrisch (Griess-Reaktion), fluometrisch (2,3-Diaminonaphtalene-Reaktion) oder mittels Chemolumineszenz nachgewiesen werden [253–262].

Erhöhte Konzentrationen von Nitrit/Nitrat bzw. NO₂⁻ und NO₃⁻ im Vergleich zu gesunden Probanden wurden bei Asthma, zystischer Fibrose, Bronchiektasen und Rauchern gefunden [254–258, 260, 261, 263]. In der Situation der akuten Exazerbation eines Asthma bronchiale lagen ebenfalls höhere Werte im Vergleich zur stabilen Situation vor, sodass

Nitrit als ein Marker für akutes Asthma vorgeschlagen wurde [255]. Unter Therapie mit inhalativen Steroiden zeigte sich ein Abfall der Nitrit-Werte bei Asthmatikern [257]. Bei zystischer Fibrose fanden sich im Gegensatz zu erniedrigten NO-Werten ebenfalls erhöhte Nitrit-Konzentrationen [263]. Vergleichbar dazu wurden ebenfalls bei gesunden Rauchern Unterschiede zwischen NO- und Nitrit-Konzentrationen gefunden [260]. Dieses gegensätzliche Verhalten zwischen NO und Nitrit ist noch nicht vollständig geklärt, weshalb weitere Untersuchungen zum Verständnis der biochemischen Vorgänge in den Atemwegen notwendig sind. So korrelierten die Nitritkonzentration und das Tidalvolumen, jedoch nicht die Nitrit-Konzentration mit Markern der lokalen Entzündung im Atemkondensat bei beatmeten Patienten mit ARDS. Die erhöhte Nitrit-Konzentration wurde in diesem Fall als Ausdruck einer vermehrten mechanischen Belastung angesehen [229].

Eine Reaktion von NO mit Superoxid-Anionen in den Atemwegen führt zur Bildung von Peroxynitrit, das nach Reaktion mit Tyrosin zu Nitrotyrosin wird [264]. Eine Messung von Nitrotyrosin im Atemkondensat ist mittels eines Enzymimmunoassays im ng-Bereich möglich [253, 265]. Zur Validierung kann die Massenspektrometrie Nitrotyrosin im pM-Bereich messen [266]. Erhöhte Nitrotyrosin-Konzentrationen wurden bei mildem Asthma [265] sowie zystischer Fibrose festgestellt, wobei die Höhe des Nitrotyrosins bei zystischer Fibrose mit der Erkrankungsschwere korrelierte [253].

Nitrosothiole entstehen aus der Reaktion von NO mit Thiolen [267] wie z. B. Glutathion. Sie können mit Hilfe eines kommerziell verfügbaren colorimetrischen Testkits gemessen werden [262]. Im Vergleich zu gesunden Probanden waren Nitrosothiole bei entzündlichen Atemwegserkrankungen wie Asthma bronchiale und zystischer Fibrose ebenfalls erhöht zu finden [262].

Adenosin Adenosin entsteht beim Abbau von ATP [268]. Es kann mittels HPLC nachgewiesen werden, wobei die für das Serum verwendete Methode für das Atemkondensat genutzt werden kann [214, 269]. Es wird aber auch im Rahmen entzündlicher Veränderungen in den Atemwegen bei Asthma produziert [270]. Erhöhte Serumkonzentrationen wurden bei allergischer und bei anstrengungsinduzierter Bronchialobstruktion gefunden [271, 272]. Auch im Atemkondensat waren bei stabilem Asthma erhöhte Adenosinwerte nachweisbar, die bei Zunahme der Erkrankungsschwere ebenfalls stiegen [213, 214]. Darüber hinaus korrelierte Adenosin mit exhaliertem NO bei Asthmapatienten [214].

Prostanoide Arachidonsäure, die aus den Zellwänden durch die Phospholipase A₂ freigesetzt wurde, wird durch die Cyclo-Oxygenase zu Prostaglandin-Endoperoxid umgewandelt. Diese Endoperoxide werden zu Prostaglandinen, Prostazyklinen und Thromboxan-A₂ [273]. Das Thromboxan-A₂ wird im weiteren Verlauf zu dem biologisch inaktiven Metabolit Thromboxan-B₂ (TXB₂), das jedoch durch seine Stabilität besser gemessen werden kann, umgewandelt [274]. PGE₂ und TXB₂ können mittels Enzymimmunoassay oder Radioimmunoassay nachgewiesen werden [213, 220, 275–277]. PGE₂ und TXB₂ sind im Atemkondensat nachweisbar [213, 220, 275, 278–281]. Es bestehen jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen gesunden Probanden und Asthmapatienten für PGE₂, PGD₂ und TxB₂. Lediglich bei COPD-Patienten wurden erhöhte PGE₂-Werte im Atemkondensat gefunden [276, 278].

Die Cysteinyl-Leukotriene (Cys-Lts: LTC₄, LTD₄, LTE₄) werden sowohl von Entzündungszellen als auch von Strukturzellen der Atemwege freigesetzt. Sie spielen bei den sich in den Atemwegen abspielenden Entzündungsgeschehen wie beim Asthma eine Rolle [282]. LTB₄ entsteht aus Arachidonsäure als ein Produkt der enzymatischen Wasserabspaltung von LTA₄. Es ist ein potenter Aktivator von Neutrophilen und gleichzeitig ein proinflammatorischer Mediator [283]. Auch Leukotriene lassen sich im Atemkondensat mittels Enzymimmunoassay nachweisen [224, 279–281, 284–288]. Für LTB₄ wurden die Ergebnisse des Enzymimmunoassays mit Hilfe einer Umkehr-Phase-HPLC validiert [220]. Erhöhte Werte an LTB₄ wurden im Atemkondensat von Kälbern nach experimentell durchgeführter Infektion des Respirationstraktes festgestellt. Bei Asthma liegen unterschiedliche Ergebnisse vor. So fanden Becher und Mitarbeiter erhöhte LTB₄- und LTE₄-Werte bei Asthmatikern [288], Csoma und Kollegen hingegen sahen bei Kindern mit Asthma keinen Unterschied in der LTB₄-Konzentration, wohl aber bei Cysteinyl-Leukotrienen (cys-LT: LTC₄, LTD₄, LTE₄) [280], die im Atemkondensat bei einer Exazerbation des Asthmas erhöht waren und nach Therapie mit inhalativen Steroiden (ICS) wieder regredient [284]. LTB₄, nicht aber LTE₄, wurde bei COPD-Patienten erhöht gefunden [278].

8-Isoprostan 8-Isoprostan entsteht aus Arachidonsäure durch nicht-enzymatische Reaktion mit Oxidanzien und kann daher als ein Marker für oxidativen Stress betrachtet werden [289]. Die meisten Studien verwendeten zum Nachweis von 8-Isoprostan ein kommerzielles Enzymimmunoassay [286, 287, 290, 291]. Die mittels Enzymimmunoassay gemessenen Werte wurden mittels Gaschromatographie/Massenspektrometrie validiert [220]. Bei Asthma bronchiale [275, 292], COPD [293], interstitiellen Lungenerkrankungen [290], zystischer Fibrose [291], ARDS [294] und obstruktiver Schlafapnoe [295] wurden erhöhte 8-Isoprostan-Konzentrationen ermittelt. Die bei einer Exazerbation eines Asthma bronchiale initial erhöht gefundenen 8-Isoprostanwerte mit den Lungenfunktionsparametern zeigten nach einer Therapie mit oral verabreichten Steroiden zwar einen signifikanten Abfall, waren aber immer noch erhöht im Vergleich zu gesunden Probanden [284, 292].

Andere Indikatoren für oxidativen Stress Produkte der Lipidperoxidation wurden ebenfalls im Atemkondensat nachgewiesen [235, 249, 296, 297]. Die Messung von Thiobarbitat-reaktiven Substanzen ist zwar einfach, aber auch eine unspezifische Methode zur Beurteilung der Lipidperoxidation [235]. Der colorimetrische Assay zum Nachweis Thiobarbitat-reaktiver Substanzen besitzt nur eine geringe Spezifität [235]. Erhöhte Konzentrationen von Thiobarbitat-reaktiven Substanzen wurden bei Asthmatikern und COPD-Patienten gefunden [235, 249].

Aldehyde (z. B. Malondialdehyd) sind Produkte der Lipidperoxidation, die oxidativen Stress anzeigen. Ein erniedrigtes Glutathion weist zusätzlich auf eine reduzierte antioxidative Kapazität hin [298]. Beide Mediatoren — Aldehyde und Glutathion — lassen sich im Atemkondensat nachweisen [217, 218]. Aldehyde werden mittels Flüssigkeitschromatographie, verbunden mit Massenspektrometrie, nachgewiesen [217, 218, 297]. Glutathion lässt sich mittels HPLC und Fluoreszenznachweis bestimmen [218]. Bei akutem Asthma fanden sich erhöhte Aldehyd- und erniedrigte Glutathion-Werte, die sich nach ICS-Therapie de-

nen von gesunden Probanden annäherten [218]. Aber auch bei der COPD wurden erhöhte Aldehyd-Konzentrationen gefunden [217].

pH-Wert Der pH-Wert der Atemwege bzw. der Lunge setzt sich aus verschiedenen Säuren (z. B. Laktat, Kohlensäure) und Basen (z. B. Ammoniak) als kombiniertes Puffersystem zusammen, wobei diese Substanzen im Bereich der Atemwege produziert und freigesetzt werden. Die Messung des pH-Wertes im Atemkondensat ist eine einfache, mit einer pH-Elektrode durchführbare Methode [221, 299]. Bei der Messung des Atemkondensat-pH unmittelbar nach der Atemkondensatgewinnung zeigen sich zu Anfang schwankende Werte, anschließend kommt es zu einem langsamen Anstieg des pH-Wertes, der mit dem Abdampfen des CO_2 einhergeht. Um konstante Werte zu erreichen, wurde von Hunt und Mitarbeitern eine Entgasung mittels eines Edelgases wie z. B. Argon durchgeführt [299]. Bei gesunden Probanden wurden damit pH-Werte um 7,7 gemessen (mit einer Spanne von 7,4 bis 8,8) [299]. Bei intubierten Patienten nach einer koronaren Bypassoperation lag der pH-Wert zwischen 5 und 7 [300]. Inwieweit der über eine Mundatmung gewonnene pH-Wert des Atemkondensates die Situation in den unteren Atemwegen bzw. in der Lunge widerspiegelt, ist derzeit Gegenstand einer noch währenden Diskussion, da im Mund hohe Ammoniak-Konzentrationen nachweisbar sind und Ammoniak einen der wichtigsten Puffer darstellt [221, 301–305].

Deutlich erniedrigte Atemkondensat-pH-Werte fanden sich bei akutem Asthma [261, 299], zystischer Fibrose [306], COPD [261], Bronchiektasen [261] und akuter Lungenschädigung (ARDS) [212]. Bei Patienten mit akuter Exazerbation eines Asthma bronchiale wurde darüber hinaus eine Normalisierung des pH im Atemkondensat nach erfolgreicher Therapie mit ICS beobachtet [299]. Außerdem wurden Korrelationen zu eosinophilen bzw. neutrophilen Granulozyten aus dem induzierten Sputum gefunden, was die Rolle des pH-Wertes im Atemkondensat als Marker für inflammatorische Prozesse unterstreicht [261]. Unterstützt wird dies durch Korrelationen der pro-inflammatorischen Interleukine IL-6 und IL-8 im Atemkondensat mit dem Atemkondensat-pH bei Patienten mit akuter Lungenschädigung [212].

Bei der Untersuchung der Variabilität des Atemkondensat-pH-Wertes innerhalb eines Tages bzw. einer Woche wurde eine Spanne von 3,5 % bzw. 4,5 % gefunden [221]. Ferner wurde festgestellt, dass der Atemkondensat-pH nicht durch Hyperventilation, die Sammelzeit, die Lagerung (bis zu zwei Jahren), eine Sammlung durch Nase bzw. Mund oder eine Atemwegsobstruktion nach Metacholin beeinflusst wird [221].

Ammoniak ($\text{NH}_3/\text{NH}_4^-$) Ammoniak entsteht durch die Spaltung des Harnstoffs durch die Urease sowie durch Glutaminase-Aktivität [305]. Die Konzentration des Ammoniaks, einer sehr gut löslichen Substanz, hat dabei Einfluss auf den pH des Atemkondensates [221, 301–305]. Eine verminderte Ammoniakkonzentration in Verbindung mit einem verminderten pH wurde bei akutem Asthma gefunden [305]. Auch in der Kühlfalle kann sich gasförmiger Ammoniak nachträglich im Atemkondensat anreichern. Außerdem ist eine Beimischung von Ammoniak aus dem Nasen-Rachen-Raum in der Expirationsluft von spontan Atmenden möglich. Die Mechanismen der Azidifizierung des Atemkondensates beim Asthma und anderen Lungenerkrankungen sind daher alles andere als geklärt [202,

213, 301–304]. Inwieweit das im Atemkondensat gemessene Ammonium bei Mundatmung die Produktion aus der Lunge widerspiegelt [305], steht somit noch nicht fest [301]. Man kann aber davon ausgehen, dass der pH im Mund einen Einfluss auf den Ammoniakgehalt der Ausatemluft hat [307].

Zytokine Zytokine im Atemkondensat wurden mit ELISA-Assays nachgewiesen. Bei der Bestimmung von Zytokinen im Atemkondensat stoßen diese üblichen Nachweismethoden oft an ihre Sensitivitätsgrenzen. Es ist daher erforderlich, die Proben zu lyophilisieren und in geringerem Volumen erneut zu lösen. Dabei konnten verschiedene Zytokine im Atemkondensat nachgewiesen werden: IL-6, IL-8, IL-4, IL-1 β , TNF- α , IL-10 [204, 212, 223, 226, 295, 308, 309]. Bei IL-8 und IL-6 gelang der Nachweis nur bei einem Teil der untersuchten Patienten [212, 308]. Erhöhte Konzentrationen für IL-4 und verminderte Konzentrationen von Interferon- γ wurden beim akuten Asthma bei Kindern beschrieben [226]. Eine Therapie mit ICS führte zu einem Anstieg von Interferon- γ und zu einem signifikanten Abfall von IL-4 im Atemkondensat. IL-6 war bei Patienten mit einem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom [223], einer obstruktiven Schlafapnoe [295] sowie nach Zigarettenkonsum [225] erhöht. Bei beatmeten Patienten mit akuter Lungenschädigung fanden sich im Atemkondensat erhöhte IL-6- und IL-8-Konzentrationen, die mit dem Ausmaß der Azidifizierung korrelierten [212].

Vitronectin und Endothelin im Atemkondensat wurden bei fibrosierenden Lungenerkrankungen erhöht gefunden und als Marker für die Verlaufskontrolle zur Beurteilung der Krankheitsaktivität bei Lungenfibrose vorgeschlagen [310]. Sogar das Vorhandensein des Hepatozyten-Wachstumsfaktors konnte im Atemkondensat gezeigt werden. Hier wurden bei Patienten mit einer Pneumonie im Vergleich zu gesunden Probanden erhöhte Konzentrationen gefunden [311].

DNA Eines der attraktivsten klinischen Anwendungsgebiete des Atemkondensates wäre das nicht-invasive Screening für ein Lungenkarzinom. Hier besteht sowohl die dringende Notwendigkeit für eine verbesserte Methodik als auch höchste klinische Relevanz. Erste Schritte auf dem Weg zu einer solchen Entwicklung, nämlich der gezielte Nachweis der DNA einzelner Gene im Atemkondensat, wurden bereits gemacht. So konnten in unseren Untersuchungen z. B. bei gesunden Probanden und bei Patienten mit Lungenkarzinomen das β -Actin Gen in 65,7 % der Fälle und bei den Tumorpatienten in 36,4 % der Fälle sogar eine somatische Mutation des wichtigen Tumorsuppressorgens p53 in der im Atemkondensat enthaltenen DNA nachgewiesen werden [229].

Kapitel 2

Fragestellung/Aufgabenstellung

Die Analyse des Atemkondensates eröffnet Möglichkeiten des nicht-invasiven Monitorings von Zuständen, die mit oxidativem Stress und Entzündung in den Atemwegen einhergehen. Trotz zahlreicher Veröffentlichungen und bereits vorliegender vielfältiger Studienergebnisse sind noch zahlreiche Fragen unbeantwortet. Mit einigen dieser offenen Fragen befassten sich unsere Untersuchungen.

Von besonderer Bedeutung war für uns die Beantwortung der Frage, welche Faktoren bei der Entstehung des Atemkondensates Einfluss haben. Zu klären war, von welchen Umständen die gewinnbare Atemkondensatmenge abhängig ist bzw. beeinflusst werden kann und inwieweit hierbei pulmonale Erkrankungen, Lungenfunktionsparameter oder Alter und Größe des Patienten eine Rolle spielen. Daneben bestand die Frage, ob die im Atemkondensat enthaltenen Stoffe und das Atemkondensatvolumen von den gleichen Einflussfaktoren abhängig sind oder sich unterschiedlich verhalten.

Einen anderen Schwerpunkt bildete die Untersuchung der Rolle des Nitrits im Atemkondensat bei beatmeten Patienten mit einer akuten Lungenschädigung. Das besondere Interesse ergab sich dabei aus der Konstellation, dass erhöhte Nitritwerte mit einem vermehrten pulmonalen Entzündungsgeschehen assoziiert sind [162, 170, 256, 263], andererseits erhöhte Nitritwerte auch Folge einer mechanischen Dehnung von Typ-II-Pneumozyten sein können [339–341]. Daraus ergab sich die Fragestellung, ob im Atemkondensat von beatmeten Patienten mit einer unterschiedlichen Schwere der Lungenschädigung erhöhte Nitritwerte nachweisbar sind. Weiterhin war zu klären, ob die gefundenen Nitritwerte mit lokalen Entzündungsparametern korrelieren oder durch mechanischen Stress, der sich indirekt durch Beatmungsparameter wie das Tidalvolumen darstellt, beeinflusst werden.

Eine weitere Studie beschäftigte sich mit dem pH-Wert im Atemkondensat. Nachdem erniedrigte pH-Werte im Atemkondensat beim akuten Asthmaanfall beobachtet worden waren, die sich nach Therapie und Abklingen der Symptome wieder normalisierten [299], stellte sich die Frage nach der Eignung des pH-Wertes als einen Marker zur Bestimmung der pulmonalen Entzündung und/oder Schädigung bei entzündlichen Lungenerkrankungen unter den Bedingungen der Beatmung. Hierbei sollte das Atemkondensat auch im Vergleich zu anderen Entzündungsmarkern wie den Konzentrationen der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-8 untersucht werden. Gleichzeitig bestand die Aufgabenstellung,

pH-Wert beeinflussende Größen wie Ammonium und Laktat im Atemkondensat simultan zu untersuchen.

Ein anderes Anwendungsgebiet für das Atemkondensat ist das nicht-invasive Screening, das vor allem für Patienten mit einem erhöhten Risiko für ein Lungenkarzinom von Bedeutung wäre. Das Atemkondensat stellt eine potentielle Quelle dar, aus der sich frühzeitig Informationen über den Prozess der Karzinomentstehung aus der Lunge erhalten lassen. Veränderungen im Tumorsuppressorgen p53 sind bei Lungenkarzinomen häufige frühzeitige genetische Ereignisse. Solche Veränderungen sind somit ein geeigneter Marker für eine Früherkennung [342]. Um die Eignung des Atemkondensates bei der Suche nach frühen Ereignissen der Karzinogenese zu zeigen, war zunächst der Beweis anzutreten, dass sich im Atemkondensat genügend Material für weitergehende genetische Untersuchungen befindet. Dies erfolgte mit Hilfe des „house keeping“-Gens β -Actin. Im nächsten Schritt war zu zeigen, dass sich interessierende Exons des p53-Gens mittels PCR aus dem Atemkondensat amplifizieren und im dabei gewonnenen Material Mutationen nachweisen lassen. Diese Ergebnisse waren darüber hinaus den Resultaten der genetischen Analyse des Tumorgewebes gegenüberzustellen.

Die Möglichkeit eines nicht-invasiven Entzündungsmonitorings bei Patienten mit stabiler und exazerbierter COPD war eine weitere Aufgabenstellung unserer Untersuchungen. Hierbei bestand neben dem Erstellen eines Profils aus mehreren pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen aus nur 2 ml Atemkondensat infolge Einsatzes eines Multiplex-Array-Test-Kits die Aufgabe, die inflammatorische Situation bei stabiler COPD mit der bei Exazerbation hinsichtlich des Entzündungsprofils zu vergleichen und den Einfluss einer Therapie mit inhalativen Kortikosteroiden zu untersuchen. Auf diese Weise sollte eine Basis geschaffen werden, das Entzündungsgeschehen bei verschiedenen Stadien der COPD zu charakterisieren.

Die Antworten auf die verschiedenen Fragestellungen zum Atemkondensat, die Einordnung der Ergebnisse in den aktuellen Wissenschaftsstand auf diesem Gebiet und die kritische Wertung noch unbeantworteter Problemstellungen einschließlich des Aufzeigens möglicher Lösungsansätze sind dabei Hauptanliegen der folgenden Arbeit.