

Für die nicht-invasive Gewinnung von Informationen aus der Lunge erlangt das Atemkondensat zunehmend an Bedeutung. Es enthält neben Wasser - dem Hauptbestandteil - eine Vielzahl chemischer und biochemischer Bestandteile, die sich als Gas im Atemkondensat lösen können, mit dem Wasser verdampfen oder als Aerosol aus dem "epithelial lining fluid" der Lunge herausgelöst werden und so in das Atemkondensat gelangen. Bisher wurde bereits eine Vielzahl von Markern im Atemkondensat nachgewiesen und deren Veränderungen bei verschiedenen, vor allem aber entzündlichen Lungenerkrankungen, erforscht.

In der vorliegenden Arbeit werden sowohl methodische Aspekte der Atemkondensatentstehung als auch verschiedene Marker auf ihre Bedeutung bei unterschiedlichen Lungenerkrankungen untersucht. Schwerpunkte dabei sind die Charakterisierung des aktuellen Entzündungsgeschehens bei akutem Lungenversagen oder der COPD bzw. des mechanischen Stresses bei Beatmung sowie das Erkennen von malignen Veränderungen aus nicht-invasiv gewonnenem Untersuchungsmaterial von Patienten mit einem Lungenkarzinom.

Somit stellt das Atemkondensat eine hervorragende Erweiterung der Möglichkeiten dar, biochemische, immunserologische und molekularbiologische Informationen aus der Lunge zu gewinnen. Es bietet alle Voraussetzungen, in wenigen Jahren ein unverzichtbares Werkzeug pneumologischer Diagnostik zu werden.

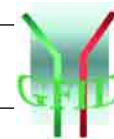
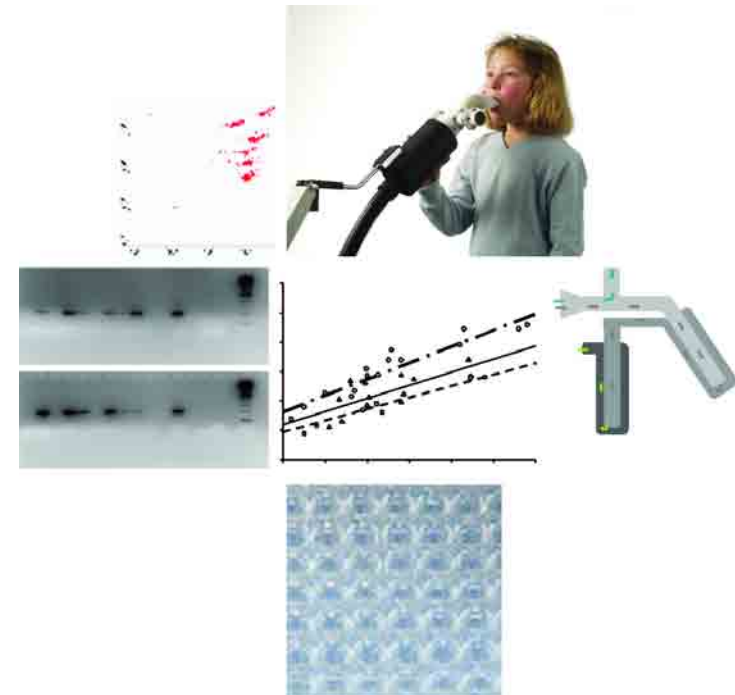
Christian Geßner

Das Atemkondensat



Christian Geßner

Das Atemkondensat - nicht-invasiv gewonnene biochemische Informationen aus der Lunge



Immundiagnostische Bibliothek
der Gesellschaft zur Förderung der Immundiagnostik e.V.

Das Atemkondensat — nicht-invasiv gewonnene biochemische Informationen aus der Lunge

An
der Medizinischen Fakultät
des Universitätsklinikums Leipzig
angefertigte

HABILITATIONSSCHRIFT
zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae habitatus
— Dr. med. habil. —

vorgelegt von

Dr. med. Christian Geßner
geboren am 1. März 1968 in Leipzig
Leipzig, den 20. 01. 2005

Bibliographische Beschreibung

Dr. Geßner, Christian

Das Atemkondensat — nicht-invasiv gewonnene biochemische Informationen aus der Lunge

Universität Leipzig, Habilitation.
130 S., 455 Lit., 17 Tab., 17 Abb.

Referat:

Für die nicht-invasive Gewinnung von Informationen aus der Lunge erlangt das Atemkondensat zunehmend an Bedeutung. Es enthält neben Wasser — dem Hauptbestandteil — eine Vielzahl chemischer und biochemischer Bestandteile, die sich als Gas im Atemkondensat lösen können, mit dem Wasser verdampfen oder als Aerosol aus dem „epithelial lining fluid“ der Lunge herausgelöst werden und so in das Atemkondensat gelangen. Bisher wurde bereits eine Vielzahl von Markern im Atemkondensat nachgewiesen und deren Veränderungen bei verschiedenen, vor allem aber entzündlichen Lungenerkrankungen, erforscht.

In den Publikationen, die dieser Arbeit zugrunde liegen, wurden sowohl methodische Aspekte der Atemkondensatentstehung als auch verschiedene Marker auf ihre Bedeutung bei unterschiedlichen Lungenerkrankungen untersucht. Es zeigte sich eine streng lineare Abhängigkeit der gewinnbaren Atemkondensatmenge vom geatmeten Volumen, während andere Faktoren wie Lungenfunktionsparameter, Alter und Größe auch im Vergleich unterschiedlicher Patientengruppen keinen Einfluss hatten. Als ein wichtiger Marker ließ sich Nitrit im Atemkondensat identifizieren, das mit dem Tidalvolumen bei beatmeten Patienten korrelierte und sich als ein Parameter für den mechanischen Stress der Lunge darstellte. Der pH-Wert im Atemkondensat charakterisierte das akute Entzündungsgeschehen und korrelierte sowohl mit den im Atemkondensat gefundenen Interleukinwerten als auch mit klinischen Scores der Schwere der Lungenschädigung. Darüber hinaus ließ sich anhand von Zytokinprofilen bei verschiedenen Erkrankungssituationen einer COPD das Entzündungsgeschehen gut charakterisieren, wobei vor allem durch inhalative Steroide eine Absenkung der Inflammationsmarker beobachtet wurde. Außerdem gelang aus dem Atemkondensat der Nachweis von humaner DNA mit Amplifizierung des Tumorsuppressorgens p53 bei Patienten mit einem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom.

Somit bietet das Atemkondensat eine hervorragende Erweiterung der Möglichkeiten, biochemische und molekularbiologische Informationen aus der Lunge zu gewinnen. Eine Haupttrichtung weiterer wissenschaftlicher Arbeiten sollte neben der Evaluierung verschiedener Marker auch die Klärung der Mechanismen der Aerosolbeimengung darstellen. Durch die fehlende Invasivität besteht die Möglichkeit einer Verlaufskontrolle pulmonaler Erkrankungen und somit eines nicht-invasiven Monitorings, was eine Bereicherung der diagnostischen Möglichkeiten, vor allem eine Ergänzung im Spektrum etablierter invasiver Methoden wie der Bronchoskopie mit bronchoalveolärer Lavage, darstellt. Das Atemkondensat kann sich somit in wenigen Jahren zu einem unverzichtbaren Werkzeug pneumologischer Diagnostik entwickeln.

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung	1
1.1	Die bronchoalveoläre Lavage als invasive diagnostische Methode	1
1.2	Nicht-invasive Diagnostik in der Pneumologie	3
1.2.1	Das induzierte Sputum	4
1.2.2	Die Messung von flüchtigen Substanzen in der Expirationsluft	9
1.2.3	Das Atemkondensat	10
1.2.3.1	Entstehung und Zusammensetzung	10
1.2.3.2	Vorrichtungen zur Gewinnung von Atemkondensat	11
1.2.3.3	Einflussfaktoren auf die Atemkondensatentstehung, Materialmenge und Nachweisverfahren	11
1.2.3.4	Reproduzierbarkeit der Methode	12
1.2.3.5	Standardisierung der Methode	12
1.2.3.6	Vergleich Atemkondensat und BAL/Bronchialflüssigkeit	13
1.2.3.7	Marker und Mediatoren im Atemkondensat	14
2	Fragestellung/Aufgabenstellung	22
3	Einflussfaktoren auf die Entstehung des Atemkondensates	24
3.1	Zusammenfassung	24
3.2	Einführung	25
3.3	Material und Methoden	26
3.4	Ergebnisse	28
3.5	Diskussion	32
4	Nitrit als Marker im Atemkondensat und seine Beziehung zum Tidalvolumen bei Patienten mit einer akuten Lungenschädigung	37
4.1	Zusammenfassung	37
4.2	Einführung	38
4.3	Material und Methoden	39
4.3.1	Patienten	39
4.3.2	Atemkondensatsammlung	39
4.3.3	Die bronchoalveoläre Lavage	41
4.3.4	EBC-NO ₂ ⁻	41
4.3.5	Entzündungsmarker	41

4.3.6	Statistische Auswertung	41
4.4	Ergebnisse	42
4.4.1	EBC-NO ₂ ⁻ und klinische Scores	42
4.4.2	EBC-NO ₂ ⁻ und Beatmungsparameter	42
4.4.3	EBC-NO ₂ ⁻ und Entzündungsmarker	44
4.4.4	EBC-NO ₂ ⁻ normalisiert auf V _T	44
4.4.5	Korrelation von EBC-NO ₂ ⁻ und BAL-NO ₂ ⁻	44
4.5	Diskussion	46
5	Die Protonenkonzentration des Atemkondensates und der Nachweis proinflammatorischer Mediatoren im Atemkondensat bei akuter Lungenschädigung	49
5.1	Zusammenfassung	49
5.2	Einführung	50
5.3	Material und Methoden	50
5.3.1	Studienpatienten und klinische Scores	50
5.3.2	Das Sammeln von Atemkondensat	51
5.3.3	Die pH-Messung	51
5.3.4	Mediatoren und Serummarker	53
5.3.5	Statistische Analyse	53
5.4	Ergebnisse	53
5.4.1	Amylasemessung und EBC-Verdünnungsfaktor	53
5.4.2	Methodische Aspekte der pH-Messung	54
5.4.3	EBC-pH, EBC-NH ₄ ⁺ und EBC-Laktat bei spontan atmenden Probanden und beatmeten Patienten	54
5.4.4	Bikarbonat, pCO ₂ und EBC-pH	54
5.4.5	Korrelation des EBC-pH mit dem pH des bronchialen ELF	54
5.4.6	Proinflammatorische Zytokine und der EBC-pH	54
5.4.7	Der EBC-pH und die Scores der Lungenschädigung und Krankheitsschwere	56
5.5	Diskussion	57
6	Der Nachweis von p53-Genmutationen im Atemkondensat bei Patienten mit einem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom	61
6.1	Zusammenfassung	61
6.2	Einführung	62
6.3	Material und Methoden	63
6.3.1	Das Sammeln von Atemkondensat	63
6.3.2	Durchführung der PCR	64
6.3.3	Sequenzierungsanalyse	64
6.3.4	Statistische Auswertung	64
6.4	Ergebnisse	65
6.4.1	Methodische Aspekte des Nachweises von humaner DNA im Atemkondensat	65
6.4.2	Nachweis des β-Actin-Genfragments im Atemkondensat	66

6.4.3	Nachweis von p53-Mutationen im Atemkondensat	67
6.5	Diskussion	69
7	Zytokinmuster im Atemkondensat bei Patienten mit chronisch-obstruktiver Lungenerkrankung	72
7.1	Zusammenfassung	72
7.2	Einführung	73
7.3	Material und Methoden	74
7.3.1	Studienpatienten und klinische Scores	74
7.3.2	Das Sammeln von Atemkondensat und Markerbestimmung	75
7.3.3	Die bronchoalveoläre Lavage	75
7.3.4	Der Bead-basierte multiplexe Immunoassay	76
7.3.5	Statistische Auswertung	76
7.4	Ergebnisse	76
7.4.1	Charakterisierung der Patienten	76
7.4.2	Allgemeine Charakterisierung der Atemkondensatproben	76
7.4.3	Inflammatorische Zytokine im Atemkondensat	78
7.4.4	Korrelation der Zytokine im EBC mit den Lungenfunktions- und den Beatmungsparametern	78
7.4.5	Einfluss von inhalativen Kortikosteroiden auf die Zytokine im Atemkondensat bei COPD-Patienten	78
7.4.6	Korrelation von Zytokinen in der BALF und dem EBC	82
7.5	Diskussion	82
8	Diskussion und Ausblick	87
8.1	Einflussfaktoren auf das Atemkondensat	87
8.2	Nitrit im Atemkondensat und seine Beziehung zum Tidalvolumen	88
8.3	Die Protonenkonzentration des Atemkondensates und der Nachweis proinflammatorischer Mediatoren im Atemkondensat	89
8.4	Zytokinmuster im Atemkondensat bei Patienten mit COPD	91
8.5	Tumorscreening im Atemkondensat	92
8.6	Ausblick	93
	Liste der Abkürzungen	95
	Literaturverzeichnis	97
	Danksagung	127
A	Lebenslauf	128
B	Selbstständigkeitserklärung	130

Kapitel 1

Einführung

1.1 Die bronchoalveoläre Lavage als invasive diagnostische Methode

Bei der Erforschung einer Vielzahl von Erkrankungen der Lunge und der Atemwege sowie zur besseren Charakterisierung des Entzündungsgeschehens zählt die Untersuchungstechnik der bronchoalveolären Lavage (BAL) zu den wichtigsten Werkzeugen der pneumologischen Diagnostik. Zytologische und mikrobiologische Analysen von BAL-Proben gehören dabei zu den etablierten Verfahren in der klinischen Diagnostik und Behandlung einer Reihe von Lungenerkrankungen, was dazu geführt hat, dass diese Verfahren routinemäßig in den meisten pulmologischen Zentren verfügbar sind [1] und anerkannte und etablierte Methoden [2] darstellen. Mit der Einführung der flexiblen Bronchoskopie in den 70iger Jahren — einer deutlich weniger invasiven Methode im Vergleich zur starren Bronchoskopie — wurde die Voraussetzung für eine breite Anwendung der BAL geschaffen [3].

Bei der BAL wird gezielt in einen vordefinierten Lungenabschnitt — meist der Mittellappen oder die Lingula — in jeweils 20 ml-Aliquoten isotonische Kochsalzlösung über einen vorher im Arbeitskanal in das zu untersuchende Segment vorgeschobenen Katheter gegeben. Die broncholaveoläre Spüllösung wird über den Katheter wieder aspiriert und für weitere Untersuchungen genutzt [4–6]. Neben der mikrobiologischen Untersuchung kommt vor allem der Analyse des Zelldifferentialbildes eine besondere Bedeutung zu. Außer der Bestimmung der Gesamtzellzahl werden die einzelnen Zellarten (ausgenommen Erythrozyten und Epithelzellen) dabei in ihrer prozentualen Verteilung sowie als Gesamtzahl pro ml angegeben. Von Interesse sind weiterhin die mit der Spülflüssigkeit gewonnen nicht-zellulären Bestandteile des „epithelial lining fluid“, also der die Lungenoberfläche ausgleitenden Flüssigkeit. Diese Bestandteile sind durch die zugegebene isotonische Kochsalzlösung in einem ungekannten Verhältnis verdünnt. Hierin liegt auch eine der Limitationen der Methode. Als Marker zur Standardisierung der nicht-zellulären Bestandteile wurden Albumin, Harnstoff und Methylenblau vorgeschlagen [7–9]. Allerdings werden diese Verfahren zur Standardisierung sehr kontrovers diskutiert [7, 10]. Fehlende Referenzwerte der in der BAL enthaltenen nicht-zellulären Bestandteile und das ungeklärte Problem der Probenverdünnung sind auch die Ursache dafür, dass eine quantitative Bestimmung

nicht-zellulärer Bestandteile nicht zum routinemäßigen Spektrum der Analyse der BAL gehört [6].

Komplikationen bei der BAL sind relativ selten [5]. Bei Patienten mit einer interstitiellen Lungenerkrankung wurde eine Komplikationsrate unter 5 % ermittelt. Es traten nur kleinere, nicht therapiebedürftige Probleme auf, so Fieber nach Bronchoskopie (2,5 %), Pneumonitis (0,4 %), Blutung (0,7 %) und Bronchospasmus (0,7 %) [11].

Eine Vielzahl von Lungenerkrankungen wurde bisher mittels der BAL untersucht. Hierbei konnten wertvolle Informationen über die Art der Schädigung und Immunantwort bei einzelnen Lungenerkrankungen gewonnen werden. Bei einem Teil von Lungenerkrankungen — sowohl infektiösen als auch nicht-infektiösen — sind die in der BAL gefundenen Ergebnisse diagnostisch, bei anderen Erkrankungen tragen sie zur Diagnose bei oder sind für den Behandlungsverlauf von Bedeutung (Tabelle 1.1).

Tabelle 1.1: Aussagewert von BAL-Ergebnissen bei verschiedenen Erkrankungen

Erkrankung	Literatur
Infektionserkrankungen	
<i>Infektionserkrankung, bei der eine Isolation aus der BAL diagnostisch ist</i>	
Pneumozystis carinii	[12]
Toxoplasma gondii	[13]
Strongyloides	[14]
Legionellen	[15, 16]
Histoplasma	[17]
Mycobacterium tuberculosis	[18, 19]
Mycoplasma	[20]
Influenza	[21]
Respiratory syncytial virus	[6]
<i>Infektionskrankheiten, bei denen eine Isolation aus der BAL nicht diagnostisch ist, aber zur Diagnosestellung und Behandlung beiträgt</i>	
Herpes simplex	[22]
Cytomegalievirus	[23, 24]
Bakterielle Infektionen	[25, 26]
Aspergillus	[21, 27]
Candida	[21]
Cryptococcus	[6]
atypische Mykobakterien	[6]
Nicht-infektiöse Erkrankungen	
<i>Nicht-infektiöse Erkrankungen, bei denen die Analyse der BAL diagnostisch ist</i>	
Alveolarproteinose	[28–30]
Eosinophile Granulome	[31–33]
Tumorerkrankungen	[34–36]
<i>Nicht-infektiöse Erkrankungen, bei denen die Analyse der BAL bei der Diagnosestellung hilfreich ist</i>	
pulmonale Hämorrhagie	[19, 37]
eosinophile Pneumonie	[38–45]
Berylliose	[46–49]

hypersensitive Pneumonitis	[50, 51]
Asbestose	[52–54]
Silikose	[55]
Sarkoidose	[56–59]
<i>Nicht-infektiöse Erkrankungen, bei denen die Analyse der BAL im Behandlungsverlauf hilfreich ist</i>	
idiopathische Lungenfibrose	[40, 41, 56, 60]
kollagen-vasculäre Erkrankungen	[40, 41, 60]
Sarkoidose	[42, 61–65]

Eine andere Betrachtungsweise ist die Unterscheidung nach den in der BAL nachweisbaren Substanzen unter Berücksichtigung ihrer Funktionen. Tabelle 1.2 gibt hier eine Aufzählung wichtiger Substanzen bzw. Substanzgruppen.

Tabelle 1.2. Wichtige Substanzgruppen, die in der BAL gemessen werden können

Substanzen/Substanzgruppen	Literatur
Surfactantbestandteile	[66]
Immunglobuline	[67]
Proteasen und Antiproteasen	[68]
Angiotensin converting enzyme	[69]
Antioxidantien, Oxidantien und Oxidationsprodukte	[70]
Mediatoren des Lipidstoffwechsels	[71]
Zytokine	[72]
Lösliche Adhäsionsmoleküle (sICAM-1 und sE-Selectin)	[73]
Marker für Fibrose und Bestandteile der extrazellulären Matrix	[74]
von Granulozyten stammende Marker	[75]
Tumormarker	[76]
Marker der Zellschädigung und des Zelluntergangs	[77]
Zellfreie Bestandteile	[78]

1.2 Nicht-invasive Diagnostik in der Pneumologie

Zu den neueren Entwicklungen in der Pneumologie gehören nicht-invasive Methoden der Informationsgewinnung aus den Atemwegen und dem Lungenparenchym:

1. das induzierte Sputum,
2. die Messung von flüchtigen Substanzen in der Expirationsluft sowie
3. das Atemkondensat [79].

Diese Methoden stellen den Beginn einer Entwicklung dar, deren Ziel es ist, auf einfache Weise weitreichende Informationen über die Lunge zu erhalten und dadurch die invasive