



# Entzündungsmarker im Exhalat

G. Becher

## Zusammenfassung

---

Die Atemwegsentzündung ist das zentrale pathophysiologische Korrelat zu verschiedenen akuten und chronischen Atemwegserkrankungen. In der Routinediagnostik ist eine diagnostische Lücke erkennbar, zwischen beginnenden oder auch abklingenden entzündlichen Reaktionen und den objektiv meßbaren Veränderungen der Lungenfunktion in der Routinediagnostik mit  $FEV_1$  und FVC. Die Propagierung antientzündlicher Therapien in der Behandlung entzündlicher Atemwegserkrankungen erfordert die Entwicklung empfindlicher Methoden zum Wirkungsnachweis. Das Atemkondensat bzw. die Diagnostik von Entzündungsmarkern im Exhalat kann hier eine wachsende Bedeutung bekommen.

Aktuelle Untersuchungen zum Atemkondensat beschäftigen sich mit der Standardisierung der Probennahme und Lagerung, der empfindlichen quantitativen Bestimmung dieser Marker im Atemkondensat und der Validierung der klinischen Bedeutung. In Vergleichsstudien mit traditionellen Methoden wie Bronchiallavage und Sputum konnten zufriedenstellende Korrelationen dieser Atemkondensatmarker zu anerkannten Verfahren nachgewiesen werden. Der besondere Vorteil im Atemkondensat liegt in der Nichtinvasivität, der beliebigen Wiederholbarkeit und den fehlenden Anforderungen an die Mitarbeit des Patienten.

$H_2O_2$  gibt eine unspezifische, aber hochsensitive Information zur Atemwegsentzündung. Es korreliert signifikant ( $r = 0,8$ ) mit der Neutrophilenzahl in der Bronchial-

lavage und im Sputum. Werte unter 500 nmol/l gelten als normal.

Die Bestimmung anderer Marker im Atemkondensat durch Enzymimmunoassays (EIA), z.B. LTB<sub>4</sub>, LTCDE<sub>4</sub>, 8-iso-Prosthan, ist inzwischen auch durch alternative Meßmethoden wie LC-MS validiert worden und verlässlich durchführbar.

Das Atemkondensat ist eine sinnvolle Ergänzung der Lungenfunktionsdiagnostik zum Ausfüllen einer diagnostischen Lücke bei der Atemwegsentzündung. Die Sensitivität der Verfahren erlaubt ein nichtinvasives Entzündungsmonitoring in Bereichen, in denen keine Funktionseinschränkung meßbar wird. Durch das Atemkondensat werden für die Individualisierung der antientzündlichen Therapie bei Atemwegserkrankungen gerade unter Bedingungen einer Kostenkontrolle und wissenschaftlich begründeter Therapien neue Chancen eröffnet.

## **Einleitung**

---

Die Atemwegsentzündung ist das zentrale pathophysiologische Korrelat von verschiedenen akuten und chronischen Atemwegserkrankungen. Die entzündliche Reaktion ließ sich bis vor wenigen Jahren nur mit invasiven Methoden wie Bronchoskopie und Bronchiallavage nachweisen und quantifizieren. Dabei sind Ziel der Diagnostik die Beurteilung der Schleimhäute und die Zelldifferenzierung in der Lavage. Durch In-vitro-Untersuchungen und Stimulationsversuche mit Zellen der Atemwege konnte die Relevanz bestimmter Zellmarker der Atemwege für Entzündungsreaktionen nachgewiesen werden.

Die normale Diagnostik kann auf invasive Methoden wie Bronchoskopie und Bronchiallavage nur bei entsprechender Indikation zurückgreifen. Die traditionelle Lungenfunktionsuntersuchung beschränkt sich in der klinischen Praxis auf die Spirometrie mit den Parametern FVC (Forcierte Vitalkapazität) und FEV<sub>1</sub> (Einsekundenkapazität). Diese Untersuchungen erfassen Atemwegsentzündungen erst dann, wenn eine relevante Funktionseinschränkung

manifest ist. Weitergehende Funktionsdiagnostik wie die Bodyplethysmographie, Ergometrie, Ergooxytensiometrie oder Kapnographie kann die Schwelle der Erfassung der Atemwegsentszündung zwar senken, bleibt aber auch bei vielen entzündlichen Reaktionen ohne Befund. Die Erfassung der Atemwegsentszündung wird um so dringlicher, je mehr der frühzeitige Einsatz inhalativer Glukokortikosteroide (ICS) als antientzündliche Therapie einen Stellenwert in der Therapie bekommt.

In der Routinediagnostik wird somit eine diagnostische Lücke erkennbar, die eine Grauzone zwischen beginnenden oder auch abklingenden entzündlichen Reaktionen und den objektiv meßbaren Veränderungen der Lungenfunktion entstehen läßt.

Das Atemkondensat ist ein Probenmedium, das uns weitere Einblicke in pulmonale Prozesse gibt, um diese Lücke zu schließen. Eine Reihe spezifischer und unspezifischer Marker der Zellaktivität in den Atemwegen wurde bereits im Atemkondensat nachgewiesen [Barnes et al. 2004]. Damit gibt es Anlaß zu der Hoffnung, daß mit dem Atemkondensat ähnliche Ergebnisse gefunden werden wie sie aus In-vitro-Untersuchungen an Atemwegszellen bekannt sind. Hiermit soll eine Übersicht über aktuelle Entwicklungen beim Atemkondensat gegeben werden.

## Methoden

---

Aktuelle Untersuchungen beschäftigen sich mit der Standardisierung der Probennahme und Lagerung, der empfindlichen quantitativen Bestimmung dieser Marker im Atemkondensat und der Validierung der klinischen Bedeutung [Becher et al. 1995]. In Vergleichsstudien mit traditionellen Methoden wie Bronchiallavage und Sputum konnten zufriedenstellende Korrelationen dieser Atemkondensatmarker zu anerkannten Verfahren nachgewiesen werden [Deaton et al. 2004, Loukides et al. 2002]. Der besondere Vorteil im Atemkondensat liegt in der Nichtinvasivität, der beliebigen Wiederholbarkeit und den fehlenden Anforderungen an die Mitarbeit des Patienten.

Das Verfahren der Atemkondensatgewinnung mit kommerziell verfügbaren Geräten wie dem ECoScreen™ und dem ECoVent™ (ViasysHC) ist weitgehend standardisiert und reproduzierbar. Ein Handheld-Gerät RTube™ von RespiratoryResearch Corp. hat keine eigene Kühlung und gewinnt zumeist etwas weniger Kondensat pro Zeiteinheit. Bei besonderen Anforderungen an die gewünschten Zielparameter sind spezielle Vorschriften für das Probenhandling, die Aufbewahrung der Proben bezüglich Gefäßauswahl und Lagertemperatur sowie die Analytik zu beachten bzw. im Einzelfall zu erarbeiten. Probensammler und Lagerungsgefäße aus Glas sind ungeeignet für eine ausreichende Wiederfindungsrate von Markern. Die Lagerungszeit von Proben sollte auch bei  $-80^{\circ}\text{C}$  10 – 12 Wochen nicht überschreiten.  $\text{H}_2\text{O}_2$  ist allgemein nicht lagerfähig.

Die meisten bekannten Marker im Atemkondensat können mit speziell auf das Probenmaterial Atemkondensat adaptierten Enzymimmunoassays detektiert werden. Dabei sollten alle Methoden mit alternativen Verfahren und entsprechenden Standardadditionsverfahren validiert werden.

Nur für  $\text{H}_2\text{O}_2$  gibt es derzeit eine verfügbare quasi Online-Analysenmethode, das kürzlich eingeführte ECoCheck-System auf der Basis eines Biosensors. Allein dieses Verfahren gewährleistet die in Atemkondensatproben notwendige Empfindlichkeit und Schnelligkeit der Analyse für den nicht stabilen Analyten [Lehmann et al. 2004]. Die vorhandene traditionelle Laboranalytik wie Spektrophotometrie und Fluorometrie kann diese Anforderungen nicht erfüllen.

## Ergebnisse

---

$\text{H}_2\text{O}_2$  gibt eine unspezifische, aber hochsensitive Information zur Atemwegsentzündung. Es korreliert signifikant ( $r = 0,8$ ) mit der Neutrophilenzahl in der Bronchiallavage und im Sputum [Deaton et al. 2004, Loukides et al. 2002]. Werte unter 500 nmol/l werden bei Lungengesun-

Tab. 1. Messung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> im Atemkondensat von gesunden Probanden (n = 19) beiderlei Geschlechts bei Kondensatsammlung mit dem RTube™ und dem ECoScreen™.

Sammler	ECoScreen	RTube
Atemkondensatvolumen in ml/100 l exhalierter Luft	1,332	0,993
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in nmol/Probe	1,25	0,90
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in nmol/l Probe	626	841
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in nmol/100 l exhalierter Luft	0,83	0,84

### Zirkadianer Trend bei gesunden Probanden (n=18)

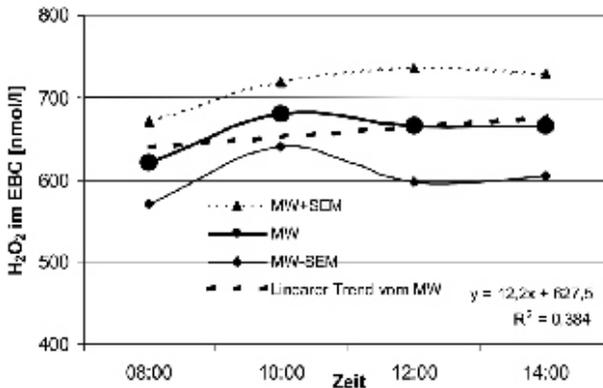


Abb. 1. Darstellung des zirkadianen Trends von Wasserstoffperoxid im Atemkondensat bei gesunden Probanden.

den gefunden, während bei Patienten mit exazerbiertem Asthma COPD-Werte über 1000 nmol/l im Atemkondensat gefunden werden. Die sinnvollste Standardisierung der Meßwerte bezüglich Probenvolumen (nmol/l) oder z.B. exhalierter Luftvolumen (nmol/100 l) oder exhalierter Zeit wird noch diskutiert. In Abbildung 1 wird dargestellt, daß die Angabe als Substanzmenge pro exhalierter Luft möglicherweise besser ist als die Angabe in nmol/l Atem-

**10 Tage Follow Up mit gesunden Probanden -  
1, 1,64 and 2 S Abweichung**

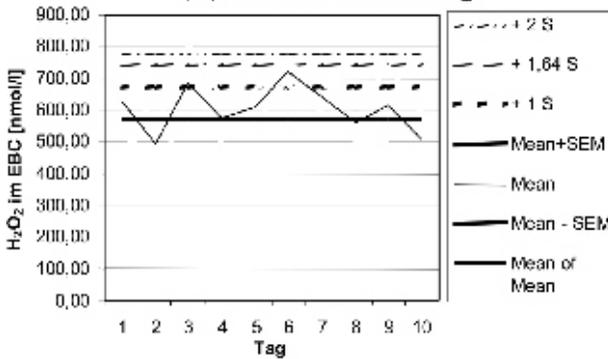


Abb. 2. Darstellung eines 10-Tage-Trends von Wasserstoffperoxid im Atemkondensat bei gesunden Probanden.

**Asthma - Inhalativer Provokationstest mit Allergenen (n=30)**

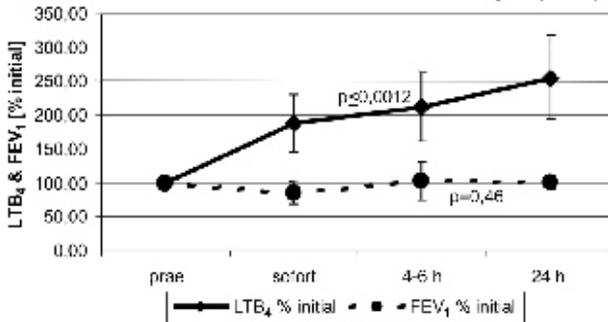


Abb. 3. Darstellung von  $FEV_1$  und Leukotrien- $B_4$  im Atemkondensat bei einem bronchialen Provokationstest bei Patienten mit Asthma bronchiale.

kondensat. Die Effektivität des Probensammlers bei Verwendung unterschiedlicher Systeme kann einen Einfluß auf die Meßergebnisse haben.

Eine zirkadiane Rhythmik konnte bisher nicht nachgewiesen werden. In einer eigenen Studie an 18 lungen-gesunden Probanden konnte bei guter intraindividuel-ler

Reproduzierbarkeit und höherer interindividueller Variabilität keine sichere zirkadiane Tendenz nachgewiesen werden.

In einer 10-Tage-Studie wurde gezeigt, daß bei gesunden Probanden auch bei längerer Beobachtungszeit eine ausreichende Reproduzierbarkeit der Messungen vorhanden ist.

In einer anderen Studie wurde untersucht, inwiefern geringgradige allergische bronchiale Reaktionen im Atemkondensat nachweisbar sind. Dazu wurde bei 30 Patienten mit allergischem Asthma ein inhalativer bronchialer Provokationstest mit Allergen durchgeführt. Die klinische Relevanz des Allergens war entsprechend der anamnestischen Angaben mittels RAST und Haut-Prick-Test nachgewiesen worden. Die inhalative Provokation erfolgte mit einer 1 : 1000-Verdünnung des Allergens mit dem PARI-Boy mit 10-l-Atembeutel. Die Inhalation wurde nach Leeratmen des Beutels, bei Auftreten von Symptomen oder bei einem signifikanten FEV<sub>1</sub>-Abfall gestoppt.

Der Abfall der Einsekundenkapazität lag unmittelbar nach der Provokation bei etwa 20%. Nach 4 bzw. 24 Stunden war keine Einschränkung der Lungenfunktion meßbar. Gemäß Auswertung der Spirometrie und der erfragten Beschwerden hatte kein Patient definitionsgemäß eine Spätreaktion.

Leukotrien-B<sub>4</sub>, ein Marker der Neutrophilenaktivierung und der chronischen Entzündung, stieg unmittelbar nach Provokation um etwa 80% an und stieg innerhalb von 24 Stunden auf etwa 250% des Ausgangswerts, entsprechend einem Anstieg um 150%.

Dieser Befund ist dahingehend zu interpretieren, daß durch die allergische Reaktion eine nachhaltige unspezifische neutrophile Entzündung ausgelöst wurde. Diese Reaktion war in der traditionellen Lungenfunktion nicht sichtbar.

Ein ähnlicher Befund wurde inzwischen bei asthmatischen Patienten unter Ozonexposition für 8-Isoprostan beschrieben [Montuschi et al. 2002].

## Diskussion

---

Das Atemkondensat ist standardisiert zu gewinnen, und es können viele mögliche Krankheitsmarker valide detektiert werden. Bei der Suche nach einer sinnvollen Bezugsgröße wird neben der Angabe der Konzentration im Atemkondensat auch die Angabe pro exhalierter Luftmenge diskutiert. Denkbar ist auch der Bezug zu einem jeweils anderen nichtkrankheitsabhängigen Marker im Kondensat.

Problematisch im Vergleich unterschiedlicher Studien bleibt die Effektivität der Kondensatgewinnung verschiedener Kondensatoren und die analytische Verarbeitung der Proben. Einflüsse der Lagerung, der verwendeten Materialien und der Analysenverfahren sind jeweils zu prüfen und mittels Standardadditionsverfahren auszuschließen.

In verschiedenen Studien wurde gezeigt, daß zumindest bei gesunden Probanden ein gute Reproduzierbarkeit der Messungen gegeben ist. Eine tageszeitabhängige Rhythmik war bislang nicht nachweisbar.

In Provokationstests bzw. Expositionsuntersuchungen konnte gezeigt werden, daß mit Parametern im Atemkondensat entzündliche Reaktionen empfindlicher nachweisbar sind als mit der traditionellen Lungenfunktionsprüfung [Becher et al. 1996, Montuschi et al. 2002].

Das Atemkondensat ist somit nicht nur eine Ergänzung der Lungenfunktionsdiagnostik, sondern eine tatsächliche Erweiterung um Parameter, die bislang nur mit invasiven Methoden verfügbar waren.

Gegenstand weiterer Untersuchungen sollte sein, inwiefern die simultane Bestimmung verschiedener Parameter des Arachidonsäurestoffwechsels die Möglichkeit einer differenzierten Entzündungsdiagnostik eröffnet.

Kombisensoren für mehrere Immunassays auf einem Biochip sind in Entwicklung. Weiter sollte zu erwarten sein, daß neben  $H_2O_2$  auch andere Parameter wie pH, NO-Metabolite o.ä. im Atemkondensat quasi online meßbar werden.

Die neuen diagnostischen Einblicke durch Exhalatdiagnostik sollten Anlaß sein, bestimmte diagnostische Stra-

tegien in der Früherkennung und der Verlaufsbeobachtung von Atemwegserkrankungen neu zu überdenken.

## Literatur

---

- Barnes PJ, Chung KF, Page CP* (2004) Inflammatory mediators of asthma: an update. *Pharmacological Reviews* 50: 5517-5596
- Becher G, Winsel K, Beck E, Stresemann E* (1995) Leukotriene B<sub>4</sub> in breath condensate of patients with bronchopulmonary diseases and in normals. *J Appl Cardiopulm Pathophysiol* 5: 215-219
- Becher G, Schütte W, Öhlmann K, Rothe M, Beck E, Neubauer G, Stresemann E* (1996) Leukotrienes in breathing condensate released during bronchial challenge test with allergen. *ERS Ann Congress, Stockholm* Sept. 7 – 11. *Eur Resp J* 9 (Suppl 23): 417S
- Cáp P, Chládek J, Pehal F, Mal M, Petru V, Barnes PJ, Montuschi P* (2004) Gas chromatography/mass spectrometry analysis of exhaled leukotrienes in asthmatic patients. *Thorax* 59: 465-470
- Deaton CM, Marlin DJ, Smith NC, Smith KC, Newton RJ, Gower SM, Cade SM, Roberts CA, Harris PA, Schroter RC, Kelly FJ* (2004) Breath condensate hydrogen peroxide correlates with both airway cytology and epithelial lining fluid ascorbic acid concentration in the horse free radical research. ■■■ 38: 201-208
- Lehmann C, Rothe M, Becher G* (2004) Empfindliche Wasserstoffperoxid-Messung. *LABO* 35: 31-32
- Loukides S, Bouros D, Papatheodorou G, Panagou P, Sifakas NM* (2002) The relationships among hydrogen peroxide in expired breath condensate, airway inflammation, and asthma severity. *Chest* 121: 338-346
- Montuschi P, Nightingale J, Kharitonov SA, Barnes PJ* (2002) Ozone-induced increase in exhaled 8-isoprosthane in healthy subjects is resistant to inhaled budesonide. *Free Radical Biology & Medicine* 33: 1403-1408