

Aus der Klinik für Innere Medizin, Schwerpunkt Pneumologie

Direktor: Prof. Dr. med. C. Vogelmeier

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Titel der Dissertation:

*Vergleich von zwei Geräten und zwei Atemmustern bei der  
Gewinnung von exhalierem Atemwegskondensat*

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der  
gesamten Humanmedizin dem Fachbereich Medizin der  
Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von  
Eva-Maria Schober, geb. Hüttmann  
aus Deggendorf

Marburg, 2017

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg  
am: 16.11.2017.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Herr Prof. Dr. H. Schäfer

Referent: Herr Prof. Dr. A. Koczulla

1. Korreferent: Frau PD Dr. N. Otero Vazquez





## **Für meine Eltern**

*Wir sind niemals am Ziel,  
sondern immer auf dem Weg.*

(Vinzenz von Paul)



# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Historie . . . . .	1
1.2. Zusammensetzung des Atemwegskondensats . . . . .	2
1.2.1. Komponenten des Atemwegskondensats . . . . .	2
1.2.2. Verdünnung im EBC . . . . .	4
1.2.3. Ursprung des Atemwegskondensats . . . . .	5
1.3. Gewinnung von Atemwegskondensat . . . . .	9
1.3.1. Prinzip . . . . .	9
1.3.2. Geräte . . . . .	10
1.3.3. Allgemeine Richtlinien . . . . .	12
1.4. Analyse des Atemwegskondensats . . . . .	16
1.4.1. Zielparameter im Atemwegskondensat . . . . .	16
1.4.2. Unspezifische Zielparameter . . . . .	18
1.4.3. Spezifische Proteine . . . . .	25
1.5. Vergleichbarkeit der EBC Sammelgeräte . . . . .	29
1.6. Klinische Bedeutung von EBC . . . . .	30
1.7. Fragestellung . . . . .	31
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>33</b>
2.1. Probanden und Versuchsreihen . . . . .	33
2.2. Gewinnung von Atemwegskondensat . . . . .	34

2.3. Etablierte Labormethoden . . . . .	36
2.3.1. EBC Volumen, pH und Leitfähigkeit (Versuchsreihe 1)	36
2.3.2. Gesamtproteinkonzentration (Versuchsreihe 2) . . .	37
2.3.3. CCP und SP-A ELISA (Versuchsreihe 3) . . . . .	37
2.3.4. AAT-ELISA (Versuchsreihen 4 und 5) . . . . .	41
2.4. Statistische Analyse . . . . .	41
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>43</b>
3.1. Volumen (Versuchsreihe 1) . . . . .	43
3.1.1. Gerätevergleich . . . . .	43
3.1.2. Atemmuster . . . . .	43
3.1.3. Ventiliertes Volumen . . . . .	44
3.2. pH (Versuchsreihe 1) . . . . .	45
3.2.1. Gerätevergleich . . . . .	45
3.2.2. Atemmuster . . . . .	46
3.3. Leitfähigkeit (Versuchsreihe 1) . . . . .	48
3.3.1. Gerätevergleich . . . . .	48
3.3.2. Atemmuster . . . . .	49
3.4. Proteinmessungen (Versuchsreihen 2 bis 5) . . . . .	51
3.4.1. Gesamtproteinkonzentration (Versuchsreihe 2) . . .	51
3.4.2. Gesamtproteinmenge (Versuchsreihe 2) . . . . .	56
3.4.3. Messung spezifischer Proteine . . . . .	58
<b>4. Diskussion</b>	<b>65</b>
4.1. Volumen . . . . .	66
4.1.1. Gerätevergleich . . . . .	66
4.1.2. Atemmuster . . . . .	67



4.2. Leitfähigkeit . . . . .	69
4.2.1. Gerätevergleich . . . . .	69
4.2.2. Atemmuster . . . . .	70
4.3. pH . . . . .	71
4.3.1. Gerätevergleich . . . . .	71
4.3.2. Atemmuster . . . . .	72
4.4. Proteinmessungen . . . . .	74
4.4.1. Gesamtproteinkonzentration . . . . .	74
4.4.2. Spezifische Proteine . . . . .	76
4.4.3. Methodischer Aspekt - Beschichtung der Sammel- systeme . . . . .	80
4.5. Standardisierung der Proteinkonzentrationen im EBC . . . . .	81
4.6. Kritische Anmerkungen bezüglich der Studie . . . . .	83
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>87</b>
<b>6. Abstract</b>	<b>89</b>
<b>7. Literaturverzeichnis</b>	<b>91</b>
<b>A. Anhang</b>	<b>117</b>



# Abkürzungsverzeichnis

AAT .....	Alpha-1-Antitrypsin
CCP .....	Club Cell Protein
DECCS .....	device for exhaled breath condensate collection system
EBC .....	Exhaled Breath Condensate
ELF .....	Epithelial lining fluid
ELISA .....	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
F .....	Forcierte Atmung
KI .....	Konfidenzintervall
R .....	Ruhige Atmung
SP-A .....	Surfactant Protein A



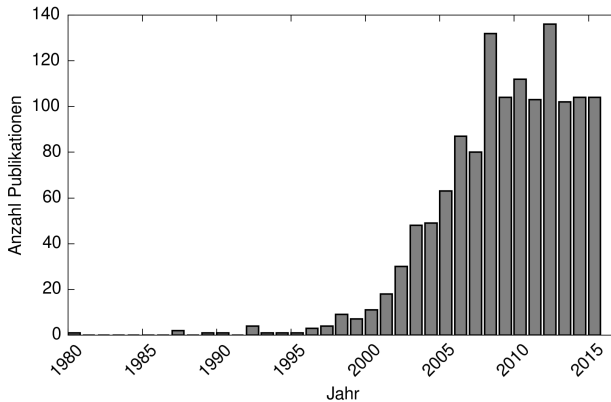
# 1. Einleitung

Die Gewinnung von Atemwegskondensat (Exhaled Breath Condensate, EBC) ist ein nichtinvasives Verfahren, um Zugang zum epithelialen Flüssigkeitsfilm (ELF) zu erlangen (Horvath et al., 2005). Das Exhalat wird dabei auf kalten Oberflächen kondensiert. Durch den nichtinvasiven Ansatz eignet es sich gut für Studien und Fragestellungen, die wiederholte Messungen erfordern. Im Gegensatz zu klinisch etablierter pulmologischer Diagnostik wie zum Beispiel der bronchioalveoläre Lavage (BAL), können EBC Proben risikofrei und einfach gewonnen werden. Das führte dazu, dass dieses Verfahren selbst bei Kindern erfolgreich angewendet wird (van Mastrigt et al., 2015; Fitzpatrick et al., 2014; Thomas et al., 2013; Trischler et al., 2012; Dodig et al., 2011; Baraldi et al., 2003). Bisläng handelt es sich allerdings um ein Verfahren, das wissenschaftlichen Fragestellungen vorbehalten ist und nicht in der klinischen Routine eingesetzt wird.

## 1.1. Historie

Russische Arbeitsgruppen veröffentlichten in den frühen 80er Jahren Arbeiten, die sich mit der Analyse von Atemwegskondensat beschäftigten (Sidorenko et al., 1980; Kurik et al., 1987). Seither hat sich eine Vielzahl von Forschungsgruppen mit dieser Thematik beschäftigt. In Abb. 1.1 ist dies anhand der großen Zahl von Publikationen dargestellt. Aktuell wird in Pubmed bei

Angabe des Stichwortes „Exhaled Breath Condensate“ eine Trefferzahl von 1213 Übereinstimmungen angezeigt (Stand 25.04.2016).



**Abbildung 1.1.:** Neuveröffentlichungen zum Stichwort „Exhaled breath condensate“ pro Jahr (1980-2015, Quelle: pub med).

## 1.2. Zusammensetzung des Atemwegskondensats

### 1.2.1. Komponenten des Atemwegskondensats

Atemwegskondensat besteht im Wesentlichen aus kondensiertem Wasserdampf, Aerosolen, sowie wasserlöslichen flüchtigen Komponenten (Davis et al., 2012).

**Wasserdampf** Es ist bekannt, dass die Ausatemluft nahezu vollständig mit Wasserdampf gesättigt ist. Der Wasserverlust über die Lunge beträgt schätzungsweise 350 mL pro Tag, wobei berücksichtigt werden sollte, dass das Ausmaß des Volumenverlustes von der Ventilationsrate abhängig ist (Effros et al., 2004). Es ist anzunehmen, dass fast das gesamte Volumen dieser Flüssigkeit auf Wasserdampf zurückzuführen ist, der durch Verdunstung des epithelialen Flüssigkeitsfilms (epithelial lining fluid, ELF) auf der Lungenoberfläche gebildet wird. Die Sättigung der Ausatemluft mit Wasserdampf ist physiologisch bedeutsam, da somit das Austrocknen der Atemwege und eine damit einhergehende Schädigung des Respirationstraktes vermieden werden (Effros et al., 2004).

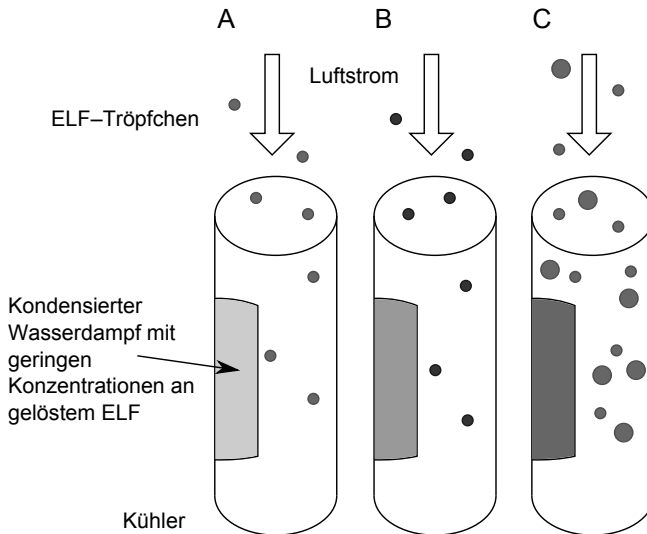
**Volatile Substanzen** Bisher wurden in der Ausatemluft über 3000 volatile Substanzen entdeckt (Popov, 2011; Buszewski et al., 2007). Im Atemwegskondensat werden die ausgeatmeten wasserlöslichen flüchtigen Bestandteile wie zum Beispiel Kohlenmonoxid, Stickstoffmonoxid, Kohlenwasserstoffe, Wasserstoffperoxid und Ammoniak absorbiert (Montuschi, 2007; Hunt, 2002).

**Aerosole** Die Aerosolfraktion mit einem Gesamtanteil am Atemwegskondensat von nur ungefähr 0,01 % ist Vehikel für nichtflüchtige Komponenten (Effros et al., 2005). Die Anzahl der bei Ruheatmung freigesetzten Aerosolpartikel liegt in einer Größenordnung von 0,1 bis 4 Partikel/cm<sup>3</sup>. Der durchschnittliche Durchmesser dieser Teilchen beträgt weniger als 0,3 µm (Fairchild und Stampfer, 1987). Innerhalb dieser respiratorischen Tröpfchen konnten Zytokine, Lipide, Surfactant, verschiedene Ione, Histamin, Serotonin, Adenosin und viele weitere Stoffe identifiziert werden (Hunt, 2002).

### **1.2.2. Verdünnung des epithelialen Flüssigkeitsfilms im Atemwegskondensat**

Der epitheliale Flüssigkeitsfilm ist ein ca. 50 µm dünner flüssiger Film, der das respiratorische Epithel bedeckt (Kubáň und Foret, 2013). Seine Zusammensetzung unterscheidet sich je nach Lokalisation im Respirationstrakt. In den luftleitenden Abschnitten besteht der epitheliale Flüssigkeitsfilm aus einer wässrigen und einer muzinösen Phase. In der wässrigen Phase finden sich lösliche Komponenten der bronchialen Sekretion und Serumproteine. Die muzinöse Phase enthält bronchiale Glykoproteine, Bindungsproteine der bronchialen Glykoproteine sowie einige Serumproteine. Der epitheliale Flüssigkeitsfilm im Bereich der gasaustauschenden Abschnitte (Bronchioli respiratorii, Alveolen) umfasst Phospholipide (80 %), Cholesterol (10 %), Proteine (10 %) und in sehr kleinen Mengen Saccharide (Dodig und Čepelak, 2013). Die Komponenten des epithelialen Flüssigkeitsfilms der Atemwege liegen im Atemwegskondensat wegen des hohen Anteils von Wasserdampf in stark verdünnter Konzentration vor. Schätzungen gehen von einer 2000 bis 10 000fachen Verdünnung aus (Hunt, 2007b). Effros et al. (2003) schätzen, dass bei gesunden Probanden pro ml Atemwegskondensat 0,02 bis 1,0 µl respiratorische Flüssigkeit enthalten ist. Die Konzentrationen nichtvolatiler Stoffe im Atemwegskondensat werden durch die vorherrschenden Konzentrationen dieser Stoffe im epithelialen Flüssigkeitsfilm und durch das Verhältnis der respiratorischen Tröpfchen zum Gesamtvolumen des Kondensats beeinflusst (siehe Abb. 1.2). Konzentrationsanstiege bestimmter Mediatoren können demzufolge entweder auf eine erhöhte Konzentration im epithelialen Flüssigkeitsfilm, auf ein erhöhtes Volumen bzw. auf eine erhöhte Anzahl der Aerosole des Epithelfilms oder aber auf ein vermindertes Volumen von Wasserdampf zurückgeführt werden (Effros et al., 2004).





**Abbildung 1.2.:** nach Effros et al. (2004): Der Konzentrationsanstieg eines gelösten Stoffes im EBC ist entweder auf eine erhöhte Konzentration innerhalb des epithelialen Flüssigkeitsfilms, (B) oder auf eine höhere Anzahl und/oder Volumen der respiratorischen Tröpfchen des epithelialen Flüssigkeitsfilms im Exhalat (C) zurückzuführen.

### 1.2.3. Ursprung des Atemwegskondensats

#### 1.2.3.1. Entstehung von Aerosolen im Atemtrakt

Es existieren unterschiedliche Theorien hinsichtlich der Entstehung von Aerosolen im Atemtrakt:

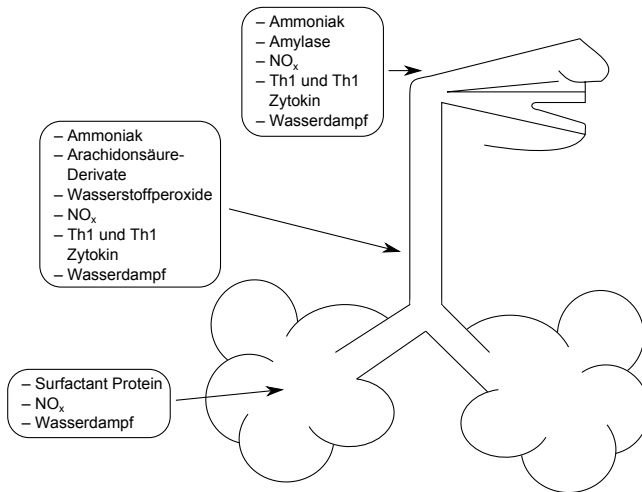
- Eine hohe Geschwindigkeit des Luftstrom in den Atemwegen führt zu „Mikroturbulenzen“, die ausreichend mechanische Kräfte bewirken

und damit Partikel von dem epithelialen Flüssigkeitsfilm lösen (Papineni und Rosenthal, 1997). Demzufolge ist davon auszugehen, dass ein gesteigerter Atemfluss zu einer höheren Ausbeute von Aerosolpartikeln führen kann.

- Weiterhin kann vermutet werden, dass durch das „Aufgehen“ der Alveolen während der Einatemphase Substanzen aus dem Flüssigkeitsfilm der Atemwege losgelöst werden (Hunt, 2002, 2007a) Der Nachweis von Phospholipiden – Hauptbestandteil von Surfactant – im Atemwegskondensat unterstützt diese Überlegung (Jackson et al., 2007).
- Johnson und Morawska entwickelten das BFFB-Modell (bronchiale fluid film burst model) und behaupten, dass die Aerosol-Produktion vor allem in den frühen Phasen der Einatmung stattfindet. Zudem soll die Aerosolkonzentration in einem proportionalen Verhältnis zum Anteil der vollständig kontrahierten und mit epithelialer Flüssigkeit verschlossenen Bronchiolen zu Beginn der Einatmung stehen (Johnson und Morawska, 2009). Grundlage dieser Hypothese sind bekannte Aspekte aus der Physiologie der Atmung. Innerhalb eines normalen Atemzyklus wird aufgrund kontraktiver Vorgänge während der Ausatmung epitheliale Flüssigkeit aus dem longitudinal verlaufenden Faltenrelief der bronchiolären Oberflächen in das Lumen der Bronchiolen abgegeben. Dies resultiert in einer kontinuierlichen Flüssigkeitsschicht, die die innere Oberfläche der Bronchiolen bedeckt. Eine durch Kontraktion der Bronchiolen verringerte mit Flüssigkeit überzogene Fläche, sowie Kräfte der Oberflächenspannung, fördern eine weitere Kontraktion der Atemwege. Trotz des in dem epithelialen Fluid vorkommenden Surfactants, das einen Kollaps des Atemwege verhindern soll, kann es in den Bronchiolen dennoch zum Kollaps der Atemwege kommen

und damit aufgrund der luminalen epithelialen Flüssigkeitsansammlung zum Verschluss der Bronchiolen. Die anschließende Einatmung führt zur Wiedereröffnung der Atemwege. Mit der Erweiterung der Bronchiolen schrumpft die subepitheliale Flüssigkeitsansammlung zu einer dünnmembranigen Blase. Bei der vollständigen Eröffnung des Bronchiolus platzt diese Blase schließlich auf und die darin enthaltene Flüssigkeit wird freigesetzt (Johnson und Morawska, 2009).

### 1.2.3.2. Entstehungsort des EBC



**Abbildung 1.3.:** nach Kazani und Israel (2010): Die im EBC nachweisbaren Substanzen können aus verschiedenen Abschnitten des Respirationstraktes stammen.

Derzeit ist noch unbekannt, in welchen Kompartimenten der Lunge die

respiratorischen Tröpfchen entstehen (Dodig und Čepelak, 2013).

**Proximale Atemwege:** Gemäß der „Turbulenztheorie“ müsste die Entstehung von Aerosol-Partikeln hauptsächlich im Bereich des Larynx, der Trachea und der Bifurkation der Segmentbronchien lokalisiert sein, da dort die größten Verwirbelungen auftreten (Hunt, 2002; Johnson und Morawska, 2009). Turbulenzen sind mit hohen Reynolds-Zahlen assoziiert. Bei Ruheatmung ( $1 \text{ l s}^{-1}$ ) beträgt die Reynolds Zahl in der Trachea 1500. Je distaler man sich jedoch im Atemtrakt befindet, desto stärker nimmt dieser Faktor (Johnson und Morawska, 2009) und damit die dort vorherrschenden Turbulenzen ab.

**Distale Atemwege:** Atemwegskondensat enthält nichtvolatile Stoffe, die vornehmlich in der bronchiolären und alveolären Region gebildet werden (Johnson und Morawska, 2009). Der Nachweis von Surfactant Proteinen und Phospholipiden – Hauptbestandteile des alveolären Surfactants – macht zumindest den alveolaren Bereich als Mitursprungsort des EBC wahrscheinlich (Lin et al., 2016; Fumagalli et al., 2012; Larsson et al., 2011; Jackson et al., 2007; Simpson et al., 2005).

**Oropharyngeale Beteiligung:** Bei der Gewinnung von Atemwegskondensat sollte auch eine mögliche Kontamination des Kondensats mit Speichel diskutiert werden. Als Indikatoren für Speichelbeimischungen wurden Amylase- und Phosphatmessungen durchgeführt (Gaber et al., 2006; Griesse et al., 2002; Effros et al., 2002). Die Ergebnisse sind diesbezüglich differenziert: einige Arbeitsgruppen konnten in den EBC-Proben keine Speichela-my-lase nachweisen, andere wiederum fanden Spuren davon. Effros et al. (2005) gehen davon aus, dass weniger als 10 % der respiratorischen Tröpf-

chen auf Speichelbeimengungen zurückzuführen sind. Eine andere Arbeitsgruppe konnte in diesem Zusammenhang nachweisen, dass die Speichelkontamination Zytokinbestimmungen im Atemwegskondensat kaum beeinflusst (Ichikawa et al., 2007).

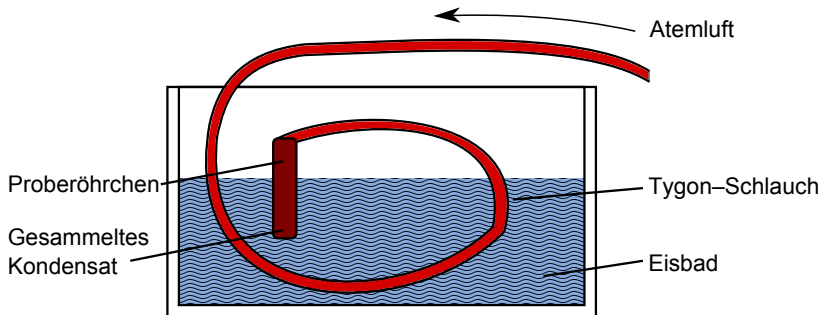
Verschiedene technische Möglichkeiten, wie z.B. eine Speichelfalle oder ein lang gebogenes Schlauchsystem können dazu beitragen, die Kontamination des EBC mit Speichel so gering wie möglich zu halten (Konstantinidi et al., 2015; Horvath et al., 2005).

Zusammengefasst ist davon auszugehen, dass sowohl der untere als auch der obere Atemtrakt zur Entstehung von EBC beitragen. Unklar bleibt allerdings, in welchem Verhältnis sie daran beteiligt sind (Rosias, 2012).

## **1.3. Gewinnung von Atemwegskondensat**

### **1.3.1. Prinzip**

Das Prinzip der EBC-Gewinnung ist das Kondensieren von Exhalat auf vorgekühlten Oberflächen. Prinzipiell bedarf die Gewinnung von EBC keiner aufwändigen und kostenintensiven technischen Ausrüstung. Grundsätzlich benötigt man für die Konstruktion eines Gerätes ein Mundstück mit einem Einwegventil, welches an ein Sammelsystem angeschlossen ist. Damit die Ausatemluft kondensieren kann, muss das Sammelsystem gekühlt werden. Dies kann mit Eis oder flüssigem Stickstoff erfolgen. Das Einwegventil gewährleistet, dass die Ausatemluft die Oberfläche des Sammelsystems passieren kann. Als Sammelgefäße können Glaskammern oder Kunststoffzylinder fungieren. Ein simpler, aber in früheren Studien vielfach verwendeter Versuchsaufbau ist in Abb. 1.4 dargestellt: ein mit Eis gefülltes Behältnis, darin ein Schlauchsystem, das am Ende an ein Sammelgefäß gekoppelt ist.



**Abbildung 1.4.:** nach Hunt (2002): Die Ausatemluft gelangt durch ein gekühltes Schlauchsystem. Das Kondensat kann dem Sammelgefäß entnommen werden.

### 1.3.2. Geräte

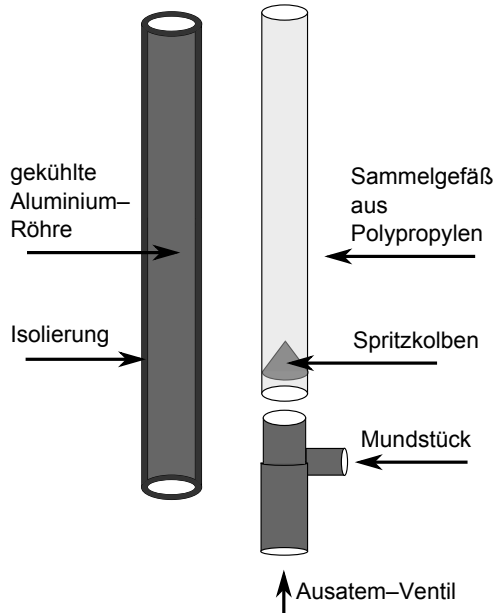
Zur Gewinnung von EBC wurden teilweise selbst konstruierte Apparaturen verwendet (Scheideler et al., 1993; Ho et al., 1998; Mutlu et al., 2001; Rosias et al., 2004; Montuschi, 2007; Vyas et al., 2012). Im Verlauf wurden allerdings auch kommerzielle Geräte entwickelt, wie der RTube<sup>TM</sup> (Respiratory Research, Inc., Charlottesville, VA), der ECoScreen (Jaeger Tonnies, Hoechberg, Germany), der ECoScreen 2 (FILT, Berlin, Deutschland), der ECoScreen Turbo - auch ECoScreen TurboDECCS genannt- (MEDIVAC, SRL, Parma, Italien) und der Anacon (Biostec, Valencia, Spanien). Alle Geräte funktionieren nach dem gleichen Prinzip: Kondensation von Ausatemluft an gekühlten Oberflächen. In der vorliegenden Arbeit kamen die kommerziell erhältlichen Geräte RTube<sup>TM</sup> und ECoScreen Turbo zum Einsatz. Ihre unterschiedliche Funktionsweise soll an dieser Stelle erläutert werden.

#### 1.3.2.1. RTube

Der Kern des RTube<sup>TM</sup> ist ein Polypropylen-Einwegsammelsystem mit einem Ausatemventil. Dieses dient gleichzeitig als eine Art Stempel, mit dem das Kondensat von den Wänden des Sammelsystems abgezogen werden kann. Als Kühlelement wird eine vorgekühlte Aluminiumröhre verwendet. In das vorgekühlte Aluminiumrohr wird das Sammelsystem eingeführt (Abb. 1.5 and 1.6). Die Temperatur der Aluminiumröhre kann beliebig gewählt werden. Die meisten Publikationen beschreiben eine Kühlung auf  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  oder  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Wegen der nicht vorhandenen konstanten Kühlung, kommt es im Messverlauf zu einer Erhöhung der Kondensationstemperatur. Ein großer Vorteil dieses Gerätes ist die einfache Transportmöglichkeit.

#### 1.3.2.2. ECoScreen Turbo

Der ECoScreen Turbo (auch unter der Bezeichnung TurboDECCS bekannt), entwickelt von der Universität Parma, ist ein Atemwegskondensatsammler, dessen Kühlsystem auf einem thermoelektrischen Peltier-Modul basiert (Abb. 1.7). Das Kühlelement wird durch ein elektronisches Kontrollsystem gesteuert. Das Einwegsammelsystem (DECCS-System) wird in den mit der kalten Seite des Peltier-Elements verbundenen Aluminium-Behälter eingeführt. Das Sammelsystem besteht aus einem Mundstück, einem Einwegventil sowie einem Sammelgefäß. Die durchschnittliche Kühltemperatur liegt bei  $(-4 \pm 1)\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Durch die elektronische Kühlung wird eine konstante Kondensationstemperatur sichergestellt. Bei einem Gewicht von ca. 5 kg, ist der Transport des Gerätes im Vergleich zum RTube<sup>TM</sup> etwas unkomfortabler, aber dennoch praktikabel. Im Gegensatz zum RTube<sup>TM</sup> ist beim ECoScreen Turbo ein Stromanschluss erforderlich. Von Vorteil ist bei diesem Kondensator die Möglichkeit während der Probengewinnung einen Pneumotachogra-



**Abbildung 1.5.:** Messaufbau RTube™.

phen (EcoVent der Firma VIASYS Healthcare GmbH, Höchberg, Germany) anzuschließen. Somit kann gleichzeitig eine dauerhafte Spirometrie durchgeführt werden.

### **1.3.3. Allgemeine Richtlinien zur Gewinnung von Atemwegskondensat**

Die *American Thoracic Society* (ATS) und die *European Respiratory Society* (ERS) formulierten 2005 Empfehlungen hinsichtlich der EBC-Gewinnung (Hor-





Abbildung 1.6.: RTube™([www.rtube.com](http://www.rtube.com)).



Abbildung 1.7.: ECoScreen Turbo (privat).

vath et al., 2005). Auszüge aus den Empfehlungen sind nachfolgend zusammengefasst und durch weitere Literaturstellen ergänzt:

Die orale Gewinnung von Atemwegskondensat sollte in sitzender Position durchgeführt werden. Die Probanden sollen dazu angehalten werden, während der Messung eine Nasenklammer zu tragen, um mögliche Effekte durch die Komponenten der nasalen Atemluft auszuschließen.

Eine Sammelzeit von 10 Minuten ist ausreichend, da in diesem Zeitraum sowohl bei Erwachsenen als auch bei Kindern ab vier Jahren durchschnittlich 1 ml bis 2 ml Atemwegskondensat gewonnen werden kann. Dies sollte für viele Fragestellungen ausreichend Untersuchungsmaterial sein.

Die Probanden sollten darauf hingewiesen werden, bei Hustenreiz oder bei Aufstoßen die Sammlung von Kondensat kurz zu unterbrechen, indem sie das Mundstück verlassen.

Im Anschluss an die Gewinnung sollten die Proben bis zur weiteren Analyse bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt werden.

Die Lagerungsdauer sollte ein bis maximal drei Monate nicht überschreiten, da unklar ist, inwieweit die Nachweisbarkeit von Biomarkern in EBC Proben durch längerfristiges Einfrieren beeinflusst wird. Kostikas et al. (2005) untersuchten beispielsweise die Nachweisbarkeit von Leukotrien B4 in eingefrorenen EBC Proben nach einer, zwei sowie drei Wochen und konnten dabei zeigen, dass die Leukotrien B4 Konzentration in gefrorenen EBC Proben nach drei Wochen signifikant reduziert war. In anderen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Detektion der EBC Zielparameter Interleukin- $1\beta$ , der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) $\alpha$ , Isoprostan-8 oder Wasserstoffperoxid in gefrorenen EBC Proben nach zwei Wochen bis zwei Monate nicht signifikant verändert ist (van Beurden et al., 2002; Kostikas et al., 2003; Borrill et al., 2008). Ohanian et al. (2010) konnten zeigen, dass die Nachweisbarkeit von Cysteinyl Leukotrienen in EBC Proben gesunder Probanden nach

sechs Monaten Lagerung bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  vermindert ist. Lediglich für die EBC pH-Bestimmungen sind längere Lagerungen unbedenklich (Vaughan et al., 2003).

Die Probanden sollten gebeten werden, das Rauchen einer Zigarette kurz vor Messbeginn zu unterlassen. Es ist bekannt, dass Zigarettenrauch einen Anstieg von volatilen und nicht flüchtigen Substanzen im EBC induzieren kann. Dies konnte für  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 8-Isoprostan, Prostaglandin E2 und Leukotrien B4 gezeigt werden (Rosias, 2012). Calušić et al. (2011) untersuchten bei gesunden Rauchern außerdem, ob das Rauchen einer Zigarette unmittelbar vor Messbeginn den pH-Wert verändert. Die Untersuchungsergebnisse zeigten, dass das Rauchen kurz vor der EBC-Gewinnung zu einem Anstieg des pH-Wertes nach 120 min Beobachtungszeit führte (gemessen nach 15 min, 30 min, 60 min and 120 min). Die Leitfähigkeit als unspezifischer Parameter für Inflammation wird durch Zigarettenrauch ebenfalls verändert (Koczulla et al., 2010b).

Der Einfluss bestimmter Getränke und Nahrungsmittel auf die Zusammensetzung von EBC ist bislang nicht hinreichend untersucht. Kullmann et al. (2008) ermittelten allerdings niedrigere pH-Werte im EBC, nachdem gesunde Probanden unmittelbar vor Gewinnung der von Atemwegskondensat kohlenstoffhaltiger Getränke (Mineralwasser, Cola) getrunken hatten. Nahrungsaufnahme unmittelbar vor der Gewinnung von Atemwegskondensat scheint den pH-Wert im EBC nicht zu beeinflussen. Calušić et al. (2011) beobachteten 30 min, 60 min and 120 min nach Einnahme eines standardisierten Frühstücks stabile pH-Werte im EBC. Bikov et al. (2014) fanden bei gesunden Probanden deutlich erniedrigte pH-Werte im EBC, nachdem unmittelbar vor der EBC Gewinnung eine standardisierter oraler Glukosetoleranztest durchgeführt wurde. Aufgrund der bisherigen Datenlage hinsichtlich der Auswirkungen unterschiedlicher Nahrungsmittel und Getränke auf

die Zusammensetzung des EBC, sollten die Probanden auch weiterhin darauf hingewiesen werden, zwei Stunden vor Messbeginn auf Mahlzeiten und Getränke wie Cola oder Kaffee zu verzichten.

## **1.4. Analyse des Atemwegskondensats**

Für die Analyse des Atemwegskondensats werden Standardtechniken wie Enzym-gebundene Immunoassays, fluorometrischen Messungen, sowie pH-Wert Bestimmungen angewendet. Neuerdings werden auch hoch sensitive Verfahren, wie Chromatographie und Ionenmobilitätsspektrometrie, erfolgreich eingesetzt (Dodig und Čepelak, 2013). Aufgrund des hohen Verdünnungseffektes im Atemwegskondensat liegen die einzelnen Mediatoren allerdings in sehr niedrigen Konzentrationen vor, oftmals nahe der Detektionsgrenze (Lim und Thomas, 2013). Dies gefährdet die Reproduzierbarkeit und Aussagekraft der Messergebnisse im EBC und macht es aktuell für den Routinegebrauch ungeeignet.

### **1.4.1. Zielparameter im Atemwegskondensat**

Das Spektrum der bislang im Atemwegskondensat identifizieren Substanzen umfasst eine Vielzahl von Entzündungsmarkern (Corradi et al., 2010). Darüber hinaus konnte aber auch bakterielle und virale DNA im EBC nachgewiesen werden (Zakharkina et al., 2011; Carpagnano et al., 2011). Weiterhin gelang es der Arbeitsgruppe um Carpagnano 2014 die Besiedelung mit *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus* oder *Penicillium* spezies in den Atemwegen von an Lungenkrebs erkrankten Probanden mittels EBC-Analyse nachzuweisen. In der Tumorforschung wurde die EBC Methode ebenfalls erfolgreich angewendet. So konnten in EBC Proben von an Lungenkrebs

erkrankten Patienten verschiedene Genmutationen nachgewiesen werden (Anglim et al., 2008; Xiao et al., 2014; Chen et al., 2015). Anhand von Konzentrationsveränderungen verschiedener Substanzen können pathophysiologische Veränderungen innerhalb des Respirationstraktes abgebildet werden. Ziel der EBC Forschung ist es unter anderem, verlässliche Biomarker als Indikatoren für Lungenpathologien aufzuzeigen. Das bedeutet, dass Veränderungen in der Zusammensetzung des Atemwegskondensats registriert werden und einer Lungenerkrankung spezifisch zugeordnet werden können. Doch nicht nur in der Diagnostik von Lungenerkrankungen ist die Analyse von Atemwegskondensat interessant. Roberts et al. (2014) gelang bei an systemischer Fibrose oder an Diabetes mellitus Typ 1 erkrankten Kindern sowie gesunden Kontrollen im Alter von 6 bis 18 Jahren das C-Peptid als Biomarker für die Pankreasfunktion nachzuweisen. Auch im Bereich der neurodegenerativen Erkrankungen wurde die Analyse des Atemwegskondensates eingesetzt. So untersuchten Bach et al. (2015) in ihrer Arbeit unter anderem die Konzentration von Beta Amyloid – ein Markerprotein für die Alzheimer Erkrankung – im EBC von an Alzheimer Erkrankten Patienten und gesunden Probanden. Dabei konnten sie zwischen den beiden Gruppen keinen Unterschied aufzeigen.

Die im Atemwegskondensat nachgewiesenen Komponenten können nach verschiedenen Kriterien kategorisiert werden (Davis et al., 2012):

- 1. Kategorie:
  - volatile Komponenten
  - nichtvolatile Komponenten
  - nichtvolatile Komponenten, die aus volatilen Substanzen hervorgehen

- 2. Kategorie:
  - Komponenten mit sehr geringem Molekulargewicht
  - Komponenten mit geringem Molekulargewicht
  - Polypeptide
  - Proteine
  - Nukleinsäuren
- Sonstige Differenzierung:
  - Lipide
  - anorganische Moleküle
  - organische Moleküle
  - an Redoxreaktionen beteiligte Moleküle
  - an der pH-Regulation beteiligte Moleküle
  - Cytokine, Chemokine

In Tab. 1.1 werden exemplarisch im Atemwegskondensat vorkommende Stoffe, deren Ursprung sowie die damit assoziierten Erkrankungen aufgezeigt. Zusätzlich werden mögliche Analysemethoden der einzelnen Parameter angegeben. Tab. 1.2 gibt eine Übersicht über die Konzentrationen ausgewählter Biomarker im EBC bei gesunden Erwachsenen und Kindern. In Tab. 1.3 liegt das Augenmerk auf Veränderungen der Werte einzelner Mediatoren bei Krankheit, beispielhaft für die COPD dargestellt.

### **1.4.2. Unspezifische Zielparameter**

Im folgenden Abschnitt werden die für die vorliegende Arbeit relevanten Zielparameter genauer erläutert.

**Tabelle 1.1:** Übersicht über nachgewiesene Substanzen im EBC, nach Horvath et al. (2005).

Mediator	Herkunft	Krankheit	Analyse
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Neutrophile und eosinophile Granulozyten, Makrophagen, Epithelzellen	u.a. allergische Rhinitis, Asthma bronchiale, COPD, ARDS, Cystische Fibrose, Tabakkonsum	Kolorimetrische und fluorimetrische Messung
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> , NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Epithelialer Flüssigkeitsfilm der Atemwege	Asthma bronchiale, Cystische Fibrose, Bronchiectasie, Tabakkonsum	Spectrophotometrie, fluorimetrische Messung, Chemolumineszenz, Chromatographie, Leitfähigkeitsmessung
Adenosine	Degradation von ATP	Allergische Rhinitis, Asthma bronchiale, Tabakkonsum	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
8-Isoprostan	Arachidonsäure-derivat	Asthma bronchiale, COPD, Interstitielle Lungenerkrankung, Cystische Fibrose, ARDS, pulmonale Sarkoidose, obstruktive Schlafapnoe, Tabakkonsum	Kommerzielle enzymgebundene Immunoassays, Gaschromatographie
Leukotriene, u.a. Cys-LTs (LTC <sub>4</sub> /D <sub>4</sub> /E <sub>4</sub> )	Entzündungszellen, insbesondere Mastzellen und eosinophile Granulozyten	Asthma bronchiale, Cystische Fibrose, Patienten mit Lobektomie, Tabakkonsum	Enzymgebundene Immunoassays
Cytokine, u.a. IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, Interferon-, TNF	Entzündungszellen und strukturelle Zellen	Asthma, Nichtkleinzelliges Bronchialkarzinom, Obstruktive Schlafapnoe, Tabakkonsum	Enzymgebundene Immunoassays, ELISA,

**Tabelle 1.2.:** Übersicht über die Konzentrationen ausgewählter Biomarker im EBC bei gesunden Erwachsenen und Kindern, nach Dodig und Čepelak (2013). MW=Mittelwert, M=Median, IQR=Interquartilsabstand, SD=Standardabweichung

Mediator	Erwachsene	Kinder
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [μmol/L]	0-0,9 (range)	0,045 (0,017 – 0,082) (M, IQR)
pH	7,70 ± 0,49 (MW ± SD)	7,05 ± 0,35 (MW ± SD)
8-Isoprostan [ng/L]	6,2 ± 0,4 (MW ± SD)	5,2 ± 0,7 (MW ± SD)
Malondialdehyd [nmol/L]	15,6 (4-25) (M, IQR)	19,4 ± 1,9 (MW ± SD)
Interleukin-6 [ng/L]	2,7 ± 0,3 (MW ± SD)	2,6 ± 0,1 (MW ± SD)
Nitrite [μmol/L]	2,9 ( 1,6-5,3) (M, IQR )	0,41 (0,13-1,83) (M, IQR )

**Tabelle 1.3.:** Nachweis von Biomarker bei Gesunden und COPD-Patienten im Vergleich, nach Cepelak und Dodig (2007).

	Gesunde Probanden	COPD Patienten
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [μM]	0,16 ± 0,04	0,205 ± 0,054
8-Isoprostan [pg/ml]	6,7 ± 0,2	45,0 ± 3,6
IL-6 [pg/ml]	2,7 ± 0,6	8,0 ± 0,1
LTB <sub>4</sub> [pg/ml]	7,7 ± 0,5	8,5 ± 0,8
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> [μM]	0 – 2,1	2,62 ± 0,52
pH	7,7 ± 0,5	7,09 ± 7,23

#### 1.4.2.1. pH-Wert

Der pH-Wert ist definiert als der negative dekadische Logarithmus der Protonenkonzentration und ein Maß dafür, ob in einer wässrigen Lösung ein saures oder basisches Milieu vorliegt. Wenn der pH-Wert geringer als 7 ist, ist die Lösung sauer.



#### **1.4.2.2. pH als Inflammationsmarker**

Der pH-Wert im EBC gilt als unspezifischer Indikator für Entzündungsprozesse im Bereich der oberen und unteren Atemwege. Es konnte unter anderem eine enge Korrelation zwischen pH-Werten im EBC und im Sputum gemessenen Entzündungszellen (insbesondere Neutrophile und Eosinophile) aufgezeigt werden (Vaughan et al., 2003; Kostikas et al., 2002). Bei vielen entzündlichen Erkrankungen der Atemwege und der Lunge, z.B. chronisch obstruktive Lungenerkrankung (chronic obstructive pulmonary disease, COPD), Asthma bronchiale, Cystische Fibrose, Bronchiektasie, bronchopulmonaler Dysplasie, Infektionen mit dem Respiratorischen Synzytial Virus, akutes Lungenschädigungssyndrom (Synonym: acute respiratory distress syndrome, ARDS) ist der pH-Wert im EBC erniedrigt (Walsh et al., 2015; Vaschetto et al., 2015). Bei gesunden Erwachsenen liegt der pH-Wert im EBC in einem Bereich von 7,7 bis 8,2 und bei gesunden Kindern zwischen 7,7 bis 8,1. Als unterster Normwert wird ein pH von 7,4 angegeben (Walsh et al., 2015). Der EBC pH erweist sich als ein robuster Parameter, der durch unterschiedliche Einflussgrößen bei der Gewinnung und Aufbereitung von Atemwegskondensat keinen größeren Schwankungen unterliegt (Vaughan et al., 2003).

#### **1.4.2.3. pH-Homöostase**

Der pH-Wert im Bereich der Atemwege beeinflusst die Lungenphysiologie und die Funktion der Zellpopulationen in den Atemwegen (Hunt, 2006). Ein saures Milieu im Atemtrakt kann weitere pathophysiologische Vorgänge von Lungenerkrankungen fördern, wie z.B. eine Steigerung der Mukusviskosität, Bronchokonstriktion oder einer gestörten Zilienfunktion (Hoffmeyer et al., 2015; Vaughan et al., 2003). Die genauen Mechanismen der pH Ho-

möostase im Atemtrakt sind allerdings noch nicht vollständig erklärt. Bisher konnte nur der Glutaminase-Weg als regulierendes Element des pH Gleichgewichts identifiziert werden: Glutaminase induziert bei abfallendem pH des epithelialen Flüssigkeitsfilms eine gesteigerte epitheliale Ammoniak- und Bikarbonatproduktion. Daneben werden aber noch andere Regelkreise vermutet. Versagen diese Mechanismen, z.B. aufgrund von Infektionen und Entzündungsprozessen, ist ein saures Milieu im Bereich des epithelialen Flüssigkeitsfilms die Folge (Wells et al., 2005). Der pH-Wert im EBC wird nicht nur alleine durch die Azidität der respiratorischen Tröpfchen bestimmt, sondern auch durch verschiedene im Wasserdampf gelöste Säure-Base-Paare beeinflusst (Bikov et al., 2012). Diese sind neben dem  $\text{CO}_2$ , unter anderem Acetat-, Ammonium-, Bikarbonat-, Natrium-, Kalium-, Laktat-Ionen (Reinhold und Knobloch, 2009). Durch Protonierung nichtflüchtiger basischer Anionen im Rahmen von Entzündungsprozessen oder Infektionen werden diese innerhalb des EFL zu flüchtigen Säuren. Die Säuren gelangen in den Atemstrom und werden dabei im Wasserdampfkondensat der Ausatemluft festgehalten. Die Folge ist ein saurer pH im EBC (Dodig und Čepelak, 2013). Bei einem alkalischen epithelialen Flüssigkeitsfilm findet man dort vor allem konjugierende Basen der Säuren. Da diese nicht flüchtig sind, werden sie nicht abgeatmet (Hunt, 2007b). Der pH-Wert im EBC kann zwar nicht mit dem pH-Wert des epithelialen Flüssigkeitsfilms gleichgesetzt werden, bildet aber dessen Veränderungen ab (Hoffmeyer et al., 2015).

#### **1.4.2.4. pH-Messung**

Aufgrund der einfachen, schnellen und kostengünstigen Messmethode, z.B. mittels einer Glaselektrode, ist der pH-Wert einer der am häufigsten untersuchten Biomarker im EBC (Bikov et al., 2012). Aufgrund der Abhängig-

keit des EBC pH vom  $\text{CO}_2$  Gehalt werden drei unterschiedliche Vorgehensweisen diskutiert. Einige Autoren bevorzugen die Messung des pH-Wertes in nativen EBC Proben in der Annahme, dass dadurch der biologische pH-Wert in den Atemwegen unverfälscht abgebildet werden kann (Leung et al., 2006; Reinhold und Knobloch, 2009). Die ATS/ERS Task Force befürwortet zur Stabilisierung des pH-Wertes die Entgasung der EBC Proben mit einem „ $\text{CO}_2$ -freien Gas“ (Horvath et al., 2005). Kullmann et al. (2007) empfehlen für die Bestimmung des pH-Wertes eine Standardisierung des  $\text{CO}_2$  Gehalts im EBC entsprechend des physiologischen alveolären  $\text{CO}_2$  Partialdruckes bei 5,33 kPa, um bestmögliche repräsentative Daten zu erhalten. Hoffmeyer et al. (2015) schließen sich dieser Empfehlung an und raten weiterhin zur pH-Wert Bestimmung ein Blutgasanalysegerät zu verwenden, da diese noch sensitiver messen würden. In der vorliegenden Arbeit wurden die EBC Proben 20 Minuten mit Argon begast. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Entgasung mit Argon zu stabilen und reproduzierbaren pH-Werten führt (Hoffmeyer et al., 2009b). Nach einem Zeitintervall von 20 Minuten ist im EBC kaum  $\text{CO}_2$  mehr nachweisbar (Koczulla et al., 2010a). Es ist allerdings davon auszugehen, dass der  $\text{CO}_2$ -Gehalt im EBC während nachfolgender Messung durch Kontakt mit der Umgebungsluft wieder ansteigen kann. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist außerdem, dass die pH-Messung nach der Argon-Methode stabile Werte bei unterschiedlichen Kondensationstemperaturen des EBC zeigt. Für die  $\text{CO}_2$  Standardisierung bei 5,33 kPa konnte gezeigt werden, dass niedrigere Kondensationstemperaturen zu niedrigeren pH-Werten führten (Czebe et al., 2008). Bei einer vergleichenden Untersuchung von zwei Messaufbauten zur EBC Gewinnung mit unterschiedlichen Kondensationstemperaturen kann dann nicht mehr sicher diskriminiert werden, ob Abweichungen der Messwerte auf den Effekt der unterschiedlichen Kondensationstemperatur oder auf das Gerät zurückzuführen sind.

#### **1.4.2.5. Leitfähigkeit**

Die elektrische Leitfähigkeit im EBC scheint größtenteils auf das dort in hohen Konzentrationen vorliegende Ammonium zurückzuführen zu sein (Effros et al., 2004). Die Messung elektrischer Leitfähigkeit im EBC wurde insbesondere durchgeführt, um die in den Atemwegen vorliegenden Elektrolytkonzentrationen und die Verdünnung der respiratorischen Tröpfchen durch Wasserdampf, abzuschätzen (Effros et al., 2003).

#### **1.4.2.6. Leitfähigkeit und respiratorische Erkrankungen**

Nur wenige Arbeiten beschäftigten sich mit der Frage, inwiefern die Leitfähigkeit als Parameter zur Diagnose und Verlaufsbeobachtung respiratorischer Erkrankungen geeignet ist. Dressel et al. (2010) kamen zu dem Ergebnis, dass die Leitfähigkeit bei Lungentransplantierten Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen und anderen lungenerkrankten Patienten erhöht ist. Koczulla et al. (2010b) stellten fest, dass unmittelbar nach dem Rauchen einer Zigarette die Leitfähigkeit signifikant ansteigt. In beiden Arbeiten korrelierte der Anstieg der Leitfähigkeit mit einem Anstieg der Ammonium Konzentration im EBC. Deshalb kann vermutet werden, dass die elektrische Leitfähigkeit als Surrogatparameter für den Ammonium Gehalt im EBC während eines Krankheitsverlaufes fungieren könnte und somit möglicherweise auch Inflammation widerspiegelt (Dressel et al., 2010). Roberts et al. (2014) untersuchte bei an Diabetes mellitus Typ 1 und an Mukoviszidose (syn. Zystische Fibrose) erkrankten Kindern im Alter von 6 bis 18 Jahren die Leitfähigkeit im EBC. Pathophysiologisch resultieren bei der Mukoviszidose Erkrankung aufgrund defekter Chloridkanäle im Vergleich zu gesunden Probanden veränderte Ionenkonzentrationen in den intra- und extrazellulären Flüssigkeiten. Man ging davon aus, dass sich dieser Befund auch im EBC widerspiegeln

würde. Diese Annahme wurde allerdings nicht bestätigt.

#### **1.4.2.7. Messung der Leitfähigkeit**

Insgesamt ist die Messung der elektrischen Leitfähigkeit ein einfaches und schnelles Verfahren. Mit kommerziell erhältlichen Miniaturglas-Messzellen ist innerhalb weniger Sekunden ein stabiles Messergebnis zu erwarten.

#### **1.4.2.8. Gesamtproteinkonzentration**

EBC besteht zu 99,9 % aus Wasserdampf und zu 0,1 % aus Aerosolen. Die im EBC messbare totale Proteinkonzentration stellt die Aerosolfraction dar (Reinhold und Knobloch, 2009). Im Rahmen von Entzündungsprozessen kommt es zu einem Anstieg der Gesamtproteinkonzentration (Garey et al., 2004). Warwick et al. (2013) konnte bei Patienten mit akutem Asthma eine höhere Gesamtproteinkonzentration im EBC nachweisen verglichen zu stabilen Asthmatikern. Bei Rauchern können ebenfalls höhere Gesamtproteingemengen gemessen werden (Kubáň und Foret, 2013). Die Messergebnisse der totalen Gesamtproteinkonzentration im EBC gesunder Probanden liegen bei  $0,42 \mu\text{g ml}^{-1}$  bis  $107,7 \mu\text{g ml}^{-1}$ . Technische Faktoren, wie z.B. unterschiedliche Größe und Materialeigenschaften der Kondensationsoberflächen könnten die große Variabilität erklären (Liu et al., 2007). Biologische Faktoren wie Alter und Körpergröße gelten als Einflussfaktoren für die Gesamtproteinkonzentration (Bloemen et al., 2007).

#### **1.4.3. Spezifische Proteine**

Im Atemwegskondensat können unterschiedliche Proteine gemessen werden, unter anderem für Entzündungsprozesse spezifische Cytokine wie Interleukine (IL)- $1\beta$ , IL-4, IL-6, IL-8, sowie Leukotriene oder der Tumornekro-

sefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Hoffmeyer et al., 2009a; Garey et al., 2004). Nachfolgend sollen die für die vorliegende Arbeit relevanten Proteine näher vorgestellt werden. Es handelt sich dabei um das Surfactant Protein A, das Club Cell Protein sowie das Alpha-1-Antitrypsin.

#### **1.4.3.1. Surfactant Protein A**

Bisher beschrieben Simpson et al. (2005); Larsson et al. (2011); Lin et al. (2016) den Nachweis von Surfactant Protein A im EBC. Surfactant-Protein A (SP-A) ist der Hauptbestandteil der Proteinfraction des pulmonalen Surfactants. Das Kollagen-ähnliche Glykoprotein gehört zur Familie der Collectine und wird von den Pneumozyten Typ II produziert (Betsuyaku et al., 2004). Genlokus dieses Proteins ist der lange Arm des Chromosoms 10 (Floros und Karinich, 1995). Das hydrophile SP-A mit einem Molekulargewicht von 650 kDa setzt sich aus sechs strukturellen Untereinheiten zusammen. Diese wiederum bestehen aus über Disulfidbrücken verknüpfte Polypeptide der Größe 35 kDa (Kishore et al., 2006). SP-A spielt eine wichtige Rolle in der Homöostase des Surfactant (Foster et al., 2014). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass SP-A auch bei der pulmonalen angeborenen Immunantwort beteiligt ist (Wang und Reid, 2007). Lungenerkrankungen können die SP-A Konzentration beeinflussen. In der Literatur werden beispielsweise erniedrigte SP-A Mengen in der bronchioalveolären Lavage von Patienten mit idiopathischer Lungenfibrose beschrieben oder aber erhöhte Werte bei Patienten mit pulmonaler Sarkoidose (van de Graaf et al., 1992). Bei COPD Patienten wurden verglichen mit gesunden Nichtrauchern erniedrigte SP-A Konzentration in der bronchioalveolären Lavage nachgewiesen (Honda et al., 1996; Shijubo et al., 1997; Betsuyaku et al., 2004). Mazur et al. (2011) fanden bei Rauchern erhöhte SP-A Konzentrationen in Serum und Sputum. In anderen

klinischen Studien konnte weiterhin gezeigt werden, dass die SP-A Konzentration in der bronchioalveolären Lavage bei Patienten mit ARDS verglichen mit gesunden Kontrollen erniedrigt waren (Goto et al., 2014).

#### 1.4.3.2. Sekretorisches Club Cell Protein

Bislang wurden keine Arbeiten veröffentlicht, die den Nachweis des Club Cell Proteins (CCP) im Atemwegskondensat beschreiben. Das sekretorische Club Cell Protein (früher sekretorisches Clara Cell Protein genannt) wird hauptsächlich von den zuvor als Clara Zellen bezeichneten Keulenzellen (engl. Club Cell) produziert und sezerniert<sup>1</sup>. Die nicht zilientragenden Keulenzellen befinden sich sowohl im Bereich der distalen respiratorischen und terminalen Bronchiolen als auch im Bereich der oberen Atemwege (Lock-Johansson et al., 2014; Barnes, 2015). Darüber hinaus enthalten auch andere Organe wie z.B. Pankreas, Prostata, Ovarien und Uterus CCP sezernierende Zellen (Laucho-Contreras et al., 2016). Genlocus des Club Cell Proteins beim Menschen ist das Chromosom 11q12.3–12.1. Das Molekulargewicht des Club Cell Proteins beträgt 16 kDa. Die Proteinuntereinheiten des Homodimers sind durch Disulfidbrücken verbunden und umschließen eine hydrophobe Höhle (Laucho-Contreras et al., 2016). Die biologischen Funktionen des Club Cell Proteins umfassen antientzündliche und immunmodulatorische Effekte (Barnes, 2015). Aufgrund der Nachweisbarkeit des Club Cell Proteins in Serum und Plasma, in der bronchoalveolären Lavage sowie im Sputum wurde es jüngst als neuer potentieller Biomarker für akute und chronische Schädigung des Lungenepithels diskutiert (Emmanouil et al., 2015). In der Literatur

---

<sup>1</sup>Aufgrund des nationalsozialistischen Hintergrundes des österreichisch-deutschen Anatoms und Erstbeschreibers Max Clara, erfolgte 2013 die Umbenennung der Clara Zelle und des Clara Zell Proteins zur „Club Cell“ und „Club Cell secretory protein“ (Winkelmann und Noack, 2010; Irwin et al., 2013).

finden sich dazu Arbeiten bezüglich COPD, Asthma, idopathischer Lungenfibrose, Sarkoidose, chronisches Zigarettenrauchen, chronischer Rhinosinuitis, allergischer Rhinitis und Lungenkrebs (Kropski et al., 2009; Wang et al., 2013; Laucho-Contreras et al., 2016).

### **1.4.3.3. Alpha-1-Antitrypsin**

Koczulla et al. (2012) konnten erstmals bei gesunden Probanden sowie COPD Patienten Alpha-1 Antitrypsin im EBC nachweisen. Alpha-1-Antitrypsin ist ein Serum-Glykoprotein, welches hauptsächlich in den Hepatozyten produziert und schließlich in den Blutkreislauf sezerniert wird. Weiterhin wird es von mononukleären Phagozyten sowie Neutrophilen gebildet. Das Molekulargewicht des AATs beträgt 52 kDa. Das AAT Gen ist 12,2 Kilobasen lang und auf Chromosom 14 (q31 bis q32,2) lokalisiert. Das Alpha-A Antitrypsin gilt als hoch pleomorphes Protein, ca. 75 verschiedene Allelvarianten sind bekannt (Curiel et al., 1990). Alpha1-Antitrypsin ist prinzipiell in allen Körpergeweben nachweisbar (Fregonese und Stolk, 2008). Seine physiologische Bedeutung findet sich aber im Bereich der unteren Atemwege, wo es als eines der wichtigsten Proteaseinhibitoren das fragile Alveolargewebe vor der proteolytischen Aktivität von Proteasen, insbesondere vor der neutrophilen Elastase schützt (Biedermann und Köhnlein, 2006; Gadek et al., 1981). Täglich werden ca.  $34 \text{ mg kg}^{-1}$  AAT produziert (Biedermann und Köhnlein, 2006). Die AAT Konzentration im Serum liegt in etwas zwischen  $1,5 \text{ g l}^{-1}$  bis  $3,5 \text{ g l}^{-1}$  (Fregonese und Stolk, 2008). Da es sich beim AAT auch um ein Akut-Phase-Protein handelt, sind bezüglich der AAT Serumkonzentration je nach Gesundheitszustand des Individuums Schwankungen möglich. So konnte gezeigt werden, dass Patienten, die an einer akuten systemischen oder pulmonalen Infektion leiden, erhöhte AAT Konzentrationen



im Serum aufweisen (Koczulla et al., 2012). 1963 beobachteten Carl-Bertil Laurell und Sten Eriksson bei Patienten mit Lungenemphysem erniedrigte AAT Konzentrationen im Serum und beschrieben damit erstmals das Krankheitsbild des Alpha-1 Antitrypsin Mangels (Fregonese und Stolk, 2008). Beim Alpha-1 Antitrypsin Mangel handelt es sich um eine genetische Erkrankung mit autosomal-rezessivem Erbgang, welche sich pulmonal in Form einer chronisch obstruktiven Bronchitits mit Lungenemphysem sowie hepatisch als chronische Hepatitis mit Übergang in eine Leberzirrhose manifestiert. Die meisten Patienten werden erstmalig zwischen dem 30. und 40. Lebensjahr mit pulmonalen Symptomen auffällig (Biedermann und Köhnlein, 2006).

## 1.5. Vergleichbarkeit der EBC Sammelgeräte

Unterschiedliche Materialeigenschaften und Kondensationstemperaturen der verschiedenen kommerziellen und nicht kommerziellen Messaufbauten beeinflussen die Zielparameter im EBC (Vyas et al., 2012; Whittaker et al., 2011; Hoffmeyer et al., 2009b; Czebe et al., 2008; Rosias et al., 2008; Liu et al., 2007). In der Literatur sind aber nur wenige Arbeiten zu finden, die sich mit der Vergleichbarkeit der einzelnen kommerziellen Geräte befassen.

### 1.5.0.1. Volumen

Soyer et al. (2006) bewerteten den ECoScreen bei Volumenausbeute gegenüber dem RTube™ als effektiver. Mit dem ECoScreen konnte signifikant mehr EBC Volumen gewonnen werden.

### **1.5.0.2. pH**

Koczulla et al. (2009) konnten im Vergleich des RTubes<sup>TM</sup> mit dem ECoScreen bezüglich des pH-Wertes keine Veränderungen feststellen.

### **1.5.0.3. Proteine**

Unterschiedliche Kondensationstemperaturen von Sammelgeräten können ebenfalls den Proteinnachweis im EBC beeinflussen. Bei einer konstant niedrigen Kondensationstemperatur scheinen höhere Proteinkonzentrationen nachweisbar zu sein (Soyer et al., 2006). Unterschiedliche Konstruktionsarten sowie Materialeigenschaften der Messaufbauten führen ebenfalls zu veränderten Konzentrationsergebnissen (Tufvesson und Bjermer, 2006; Rosias et al., 2006, 2008; Czebe et al., 2008).

## **1.6. Klinische Bedeutung von EBC**

Die EBC Diagnostik ist eine viel versprechende Methode, um nichtinvasiv Untersuchungsmaterial aus den Atemwegen und der Lunge zu gewinnen. Die Methode ist schnell, einfach und sicher in der Durchführung. Mangels hinreichender Standardisierung hinsichtlich methodischer Aspekte wird die EBC Diagnostik bis heute allerdings nicht routinemäßig in der klinischen Praxis eingesetzt. Die große Variabilität bei der Detektion von Biomarkern erschwert die Interpretation der Ergebnisse unterschiedlicher Arbeitsgruppen. Außerdem ist der Einfluss möglicher Faktoren wie z.B. unterschiedlicher Atmungsmusters auf die Zusammensetzung des EBC nicht geklärt.

## 1.7. Fragestellung

Die vorliegende Arbeit untersuchte das Atemwegskondensat gesunder Probanden. Dabei wurden im EBC die bereits erwähnten unspezifischen und spezifischen Zielparameter gemessen, um folgende Fragen zu beantworten:

1. Sind unterschiedliche kommerzielle Messaufbauten in der Analyse von Atemwegskondensat vergleichbar?
2. Beeinflussen unterschiedliche Atemmuster die Proteinmessung im Atemwegskondensat?
3. Ist durch Anwendung unterschiedlicher Atemmuster eine Analyse des Ursprungsortes des Atemwegskondensats möglich?



## 2. Material und Methoden

### 2.1. Probanden und Versuchsreihen

In die Studie wurden insgesamt 43 Probanden eingeschlossen ( $N = 43$ , 22 Männer / 21 Frauen, Durchschnittsalter  $25,56 \pm 4,20$  Jahre, durchschnittlicher BMI ( $22,63 \pm 3,00$ )  $\text{kg}^2 \text{m}^{-1}$ ). Zum Zeitpunkt der Studienteilnahme waren alle Probanden gesund, insbesondere gab es keine klinischen Hinweise für das Vorliegen einer Atemwegsinfektion. Der FEV1-Wert betrug bei allen Probanden  $>80\%$ . Alle Probanden waren Nichtraucher. Die Studienteilnehmer wurden über Inhalt und Ablauf der Untersuchung informiert. Alle Probanden unterzeichneten eine schriftliche Einverständniserklärung. Die Durchführung der Studie wurde von der Ethikkommission der Philipps-Universität Marburg genehmigt (Nr. 59/06).

Die Studie umfasste fünf Versuchsreihen. Einzelne Probanden nahmen an verschiedenen Messreihen teil. So erklärt sich die Differenz der insgesamt gemessenen Probanden und der tatsächlichen Teilnehmerzahl der Studie. In der ersten Messreihe wurde im EBC von 10 gesunden Probanden (23-30 Jahre) Volumen, pH und Leitfähigkeit bestimmt (Versuchsreihe I). Zur Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration wurde von 10 weiteren gesunden Probanden im Alter von 24 bis 29 Jahren EBC gewonnen (Versuchsreihe II). Die Konzentrationen der spezifischen Proteine CCP und SP-A wurde in den EBC Proben von 12 Probanden im Alter von 20 bis 31 Jahren gemessen

(Versuchsreihe III). Die Konzentration von Alpha-1 Antitrypsin wurde im EBC von 10 Probanden im Alter von 24-44 Jahre analysiert, wobei hierfür unbeschichtete Sammelgefäße verwendet wurden (Versuchsreihe IV). Um den Einfluss beschichteter Sammelgefäße auf die AAT Konzentrationen im EBC zu untersuchen, wurde von 12 gesunden Probanden im Alter von 18 bis 25 Jahren EBC gewonnen (Versuchsreihe V). Die im Anhang abgebildete Tab. A.1 fasst die Probanden-Charakteristika der einzelnen Versuchsreihen zusammen.

## **2.2. Gewinnung von Atemwegskondensat**

In einer einmaligen Sitzung wurden von jedem Probanden vier EBC-Proben gewonnen. Zur Gewinnung des Atemwegskondensats wurden die kommerziell erhältlichen Geräte ECoScreen Turbo (Viasys Healthcare GmbH, Hoechberg, Germany) und der RTube<sup>TM</sup> (Respiratory Research Inc., Charlottesville, USA) verwendet. Beim RTube<sup>TM</sup> wird das Sammelsystem in eine vorgekühlte Aluminiumröhre geschoben. Die Aluminiumröhre wurde vor Messbeginn auf eine Temperatur von  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gekühlt (Vaughan et al., 2003; Czebe et al., 2008). Der ECoScreen Turbo beinhaltet ein elektronisch gesteuertes Kühlelement. Dadurch wird eine konstante Kondensationstemperatur von durchschnittlich  $(-4 \pm 1)\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufrechterhalten. Zur Bestimmung des Ausatemvolumens während der Messung war an den ECoScreen Turbo per Adapter ein Spirometer (ECoVent, Viasys Healthcare GmbH, Hoechberg, Deutschland) angeschlossen.

Bei Anwendung des RTube<sup>TM</sup> besteht keine Möglichkeit das Ausatemvolumen zu messen. Die Probanden atmeten im „Cross-over“ Design jeweils zehn Minuten über den RTube<sup>TM</sup> und ECoScreen Turbo. Pro Gerät wurde diese Messung in Ruheatmung und Hyperventilation durchgeführt. Alle

vier Messungen erfolgten ohne Unterbrechung hintereinander. Die Geräte-reihenfolge war randomisiert. Vor Beginn der Messung erfolgte eine Spü-lung des Mund- und Rachenraumes mit Leitungswasser. Gemäß der Emp-fohlungen der ATS trugen die Probanden während der Messung eine Nasen-klemme (Horvath et al., 2005). Die Probanden wurden außerdem angehal-ten, die Messungen nüchtern durchzuführen, d.h. die letzte Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme musste vor Versuchsdurchführung mindestens zwei Stunden zurückliegen. Die Probanden wurden darauf hingewiesen bei Hus-ten oder dem Bedürfnis schlucken zu müssen, die EBC-Gewinnung kurzzei-tig zu unterbrechen. Nach der Gewinnung des Atemwegkondensats wurde dieses in Eppendorf Cups (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) abpipettiert. Dabei wurden in der ersten Versuchsreihe jeweils 250 µl des Kondensats für die Bestimmung des pH-Wertes und 100 µl für Leitfähigkeitsmessung in se-parate Cups abgeführt. Das verbleibende Probenmaterial wurde sofort nach der Messung bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Für die weiteren Messreihen wurde je-weils das gesamte EBC Volumen bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Um den Einfluss der Oberflächenbeschaffenheit der Sammelgeräte auf die Proteinbestimmung zu untersuchen, wurden sowohl beschichtete als auch unbeschichtete Sammel-gefäße verwendet. Hierfür wurden die Oberflächen der Sammelgefäße des ECoScreen Turbos als auch der Eppendorf Cups mit 1 % BSA in PBS über Nacht bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  beschichtet.

## **2.3. Etablierte Labormethoden**

### **2.3.1. EBC Volumen, pH und Leitfähigkeit (Versuchsreihe 1)**

Die EBC Volumina wurden mittels Eppendorf-Pipette beim Pipettieren aus den EBC Sammelgefäßen in die Eppendorf Tubes (Eppendorf Protein Lo-Bind Tubes, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) gemessen. Die Messung des pH-Wertes im EBC erfolgte in einem Eppendorfreaktionsgefäß. Für die pH-Messung wurden 250 µl EBC eingesetzt. Im Vorfeld der Messung wurden die Proben jeweils für 20 min bei Raumtemperatur mit dem inerten Gas Argon (Linde Gas, Germany, 99,9 % Reinheitsgrad) durchflutet, um die Proben von CO<sub>2</sub> zu entgasen. Mithilfe einer Glaspipette (Hirschmann, Eberstadt, Deutschland) wurde das Gas in die Proben geleitet. Anschließend wurde die Messung des pH-Wertes mittels einer Glaselektrode (WinLab® Data Line pH-Meter, Windaus Labortechnik GmbH&CoKG, Halberstadt, Deutschland) durchgeführt. Vor jeder Messung erfolgte eine Dreipunktkalibrierung des Gerätes (pH 4, 7, 9). Die Methode wurde zuvor beschrieben (Hüttmann et al., 2011). Für die Messung der Leitfähigkeit wurden 100 µl EBC eingesetzt. Die Bestimmung der Leitfähigkeit erfolgte mittels einer Glasmesszelle bei einer konstanten Temperatur von 25 °C (Leitfähigkeitsmessgerät LF 530, Wissenschaftliche-Technische Werkstätten G.M.B.H, Weilheim, Deutschland). Vor jedem neuen Messvorgang wurde die Messzelle zunächst mit Bidest Wasser gespült. Um eine Verschleppung von Spülflüssigkeit in die Proben zu vermeiden, wurde die Messzelle mehrfach mit einer mit 20 ml Luft gefüllten Spritze getrocknet. Anschließend wurde ein mit 100 µl EBC gefülltes Eppendorf-Tube von unten an einen dünnen, kurzen Schlauch herangeführt, um die Probe von oben mit einer Insulinspritze in die Messzel-



le einzusaugen. Sobald sich eine Probe in der Messzelle befand, begann die Messung der Leitfähigkeit. Die Methode wurde zuvor beschrieben (Koczulla et al., 2010b).

### 2.3.2. Gesamtproteinkonzentration (Versuchsreihe 2)

Die Gesamtproteinkonzentration im EBC wurde mittels Bicinchoninsäure Reaktion (Bicinchoninic acid, BCA) gemessen. Hierfür wurde ein kommerziell erhältliches BCA Kit verwendet (Quanti Pro<sup>TM</sup> Assay Kit, Sigma Aldrich, Germany). Der Messbereich dieser Methode lag zwischen  $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$  bis  $30 \mu\text{g ml}^{-1}$ . Für die Messung wurde das gesamte Probenmaterial mit einer Vakuumentrifuge lyophilisiert und anschließend in  $20 \mu\text{l}$  Aqua dest resuspendiert. Die Durchführung erfolgte gemäß Hersteller-Anleitung. Die Absorption wurde bei  $562 \text{ nm}$  gemessen (ELISA Reader Tecan Infinite<sup>®</sup> 200 PRO, Crailsheim, Germany).

### 2.3.3. CCP und SP-A ELISA (Versuchsreihe 3)

In der vorliegenden Arbeit wurden die Konzentrationen des Club Cell Proteins (CCP) und des Surfactant-Proteins A (SP-A) im EBC mithilfe kommerziell erhältlicher ELISA Kits ermittelt (BioVendor, Heidelberg, Germany). Die Durchführung erfolgte gemäß der Herstelleranleitung. Die Absorption wurde bei  $450 \text{ nm}$  gemessen (ELISA Reader Tecan Ultra 384 Reader). Für die Konzentrationsbestimmung von Club Cell Protein und Surfactant Protein A im EBC wurde das gesamte Probenmaterial eingesetzt. Die EBC-Proben wurden über Nacht lyophilisiert. Am nächsten Tag wurden sie mit  $100 \mu\text{l}$  Aqua dest bei  $8 \text{ }^{\circ}\text{C}$  resuspendiert. Die Resuspensionszeit betrug eine Stunde.

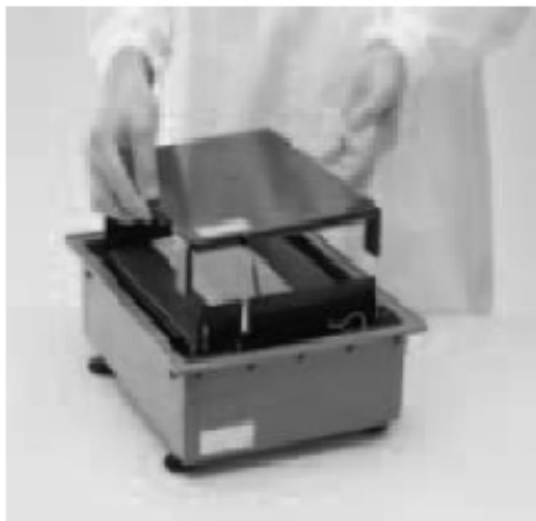
### **2.3.3.1. Western Blot**

Es war weiterhin versucht worden, SP-A und CCP per Western blot zu detektieren. Hierfür wurde wiederholt Probenmaterial von einer Person verwendet worden. Zur Proteinauftrennung wurde die SDS-Polyacrylamid Gel-Elektrophorese angewendet.

**Probenvorbereitung und Gelelektrophorese** Die eingefrorenen EBC-Proben wurden 12 Stunden mit einer Vakuumzentrifuge (Bachofer, Reutlingen, Deutschland) lyophilisiert. Anschließend wurde das Lyophilisat mit 15 µl Aqua dest bei 8 °C resuspendiert. Die Resuspensionszeit betrug 60 Minuten. Danach wurden die EBC-Proben mit 5 µl Roti load 1 (Roth, Karlsruhe, Deutschland) versetzt und für 90 Sekunden bei 95 °C denaturiert (Rotilabblock thermostat model H 250, Roth, Karlsruhe, Deutschland). Für die Elektrophorese wurden die Proben in die Taschen eines 10–20 % Tris-Tricin 1,0 mm Sammelgels (anamed, Gross-Bieberau, Deutschland) pipettiert. Als Laufpuffer wurden 12,5 ml eines 20fach konzentrierten Tris-Tricin-Puffer (72,68 g Tris (Base), 71,68 g Tricin, 2,88 g SDS 2 % in 500 ml Aqua dest, pH 8,5) in 250 ml Aqua dest verwendet. Als Proteinmarker wurden 5 µl des SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standards (Invitrogen by life technologies, Darmstadt, Deutschland) eingesetzt. Die Elektrophorese startete mit 80 Volt für 15 Minuten und wurde für weitere 80 Minuten bei 120 Volt fortgesetzt (Power station 300 Plug, Labnet, Edison, USA).

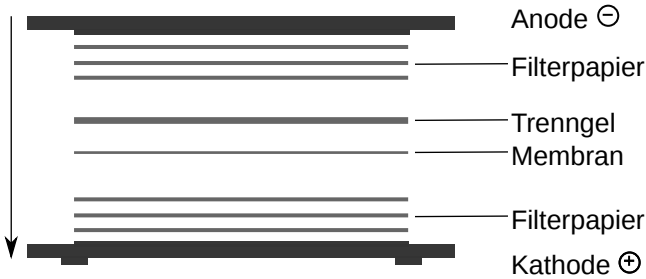
**Proteintransfer** Der Proteintransfer erfolgte in „Semi-Dry-Technik“. Nach Entfernung des Sammelgels vom Trenngel wurden sowohl das Trenngel als auch die 0,2 µm Nitrocellulose-Membran (Bio-Rad, München, Deutschland) für 15 Minuten mit Semi-Dry-Transferpuffer (11,6 g Tris (Base), 5,8 g Glycin, 0,8 g SDS, 400 ml Ethanol absolut mit Aqua dest auf 2 Liter aufgefüllt)

inkubiert. Das Trenngel und die Membran wurden zwischen mit Semi-Dry-Transfer-puffer eingeweichte Filterpapiere (Whatman 3MM Chr, Baden-Baden, Deutschland) geschichtet und zwischen zwei ebenfalls mit Semi-Dry-Transferpuffer angefeuchtete Graphitplatten (NovoBlot Multiphor II, Bioscience, Amersham, Uppsala, Schweden) gelegt (siehe Abb. 2.2). Der Proteintransfer erfolgte über eine angelegte Spannung von 12 Volt über 15 Minuten.



**Abbildung 2.1.:** NovoBlot Multiphor II, Data file Electrophoresis Multiphor II, Electrophoresis Systems, Amersham Bioscience, 11-0012-39 AA, 2004, S. 4.

Die Membran wurde für zwei Stunden auf einem Schüttler in einer Lösung bestehend aus 50 ml PBS (Phosphatpuffer, Dulbecco's PBS, ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ , PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) und 2,5 mg fett-



**Abbildung 2.2.:** Schematischer Aufbau des Proteintransfers.

armen Milchpulver (Roth, Karlsruhe, Deutschland) inkubiert, um unspezifische Bindungen bei der Detektion zu blockieren.

**Detektion** Auf einem Schüttelgerät wurde die Membran 12 Stunden bei 4 °C mit dem Erstantikörper Anti-CCP bzw. Anti-SP-A (BioVendor, Heidelberg, Deutschland) in einer 5 % Milchpulverlösung inkubiert. Die Erstantikörper wurden im Verhältnis 1:500 (10 µl Antikörper, 5 ml PBS, 5 % Milchpulver) eingesetzt. Die Membran wurde dreimal für 20 Minuten in 1fachem PBS (Phosphatpuffer, Dulbecco's PBS, ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) gewaschen. Im Anschluss wurde die Membran für zwei Stunden mit einem mit Meerrettichperoxidase markiertem Anti-Kaninchen Sekundäntikörper (Thermo SCIENTIFIC-Pierce, Rockford, USA) in einer 5 % Milchpulverlösung inkubiert. Dieser Antikörper wurde im Verhältnis 1:1000 (5 µl Zweitantikörper, 50 ml PBS, 5 % Milchpulver) angewendet. Danach wurde die Membran dreimal für jeweils 15 Minuten in 1fachem PBS gewaschen und anschließend für zwei Minuten mit den Substraten eines Chemilumineszenz Kits (Super Signal West Femto Maximum Sen-

sitivity Substrate, Pierce, Rockford, USA) inkubiert. Schließlich wurde die Membran auf einem Röntgenfilm (Thermo Scientific, Rockford, USA) visualisiert und fixiert (AGFA Entwickler G 150, AGFA Fixierer G 354, Bender-Gruppe, Baden-Baden, Deutschland). Als Positiv-Kontrolle wurde humanes Clara Cell Protein bzw. humanes SP-A Protein (BioVendor, Heidelberg, Deutschland) in Aqua dest mit einer Konzentration von  $100 \text{ ng ml}^{-1}$  verwendet.

### 2.3.4. AAT-ELISA (Versuchsreihen 4 und 5)

Weiterhin wurde die Konzentration des Alpha-1 Antitrypsins im EBC gemessen. Hierfür wurde das von Koczulla et al. (2012) entwickelte ELISA Protokoll angewendet. Es wurden jeweils 1 ml EBC eingesetzt, in einer Vakuumzentrifuge lyophilisiert und in  $100 \mu\text{l}$  0,1 % Tween in PBS resuspendiert. Die Absorption wurde bei 450 nm gemessen (ELISA Reader Tecan Infinite<sup>®</sup> 200 PRO, Crailsheim, Germany). Bei der Bestimmung von Alpha-1-Antitrypsin im EBC wurden sowohl unbeschichtete Sammelgefäße (Versuchsaufbau IV) als auch beschichteten Sammelgefäßen (Versuchsaufbau V) verwendet. Die Sammelgefäße wurden dabei mit 1 % BSA in PBS über Nacht bei  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  beschichtet.

## 2.4. Statistische Analyse

Die Statistische Analyse erfolgte durch die Programme SigmaStat<sup>™</sup>, MedCalc<sup>™</sup> 11.1.1.0 and GraphPad Prism<sup>™</sup> 5.0. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler dargestellt. Die Überprüfung der Normalverteilung erfolgte nach D'Agostino and Pearson's omnibus Normalverteilungstest. Für den Vergleich der normal verteilten Werte wurde der gepaarte t-Test verwen-

det. Bei erfolgreichem Normalverteilungstest wurde der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test angewendet. Unterschiede zwischen den Ergebnissen der einzelnen Gruppen wurden durch die ANOVA-Testung näher exploriert. Auf die ANOVA-Testung folgten post-hoc Mehrfach-Vergleiche nach der Tukeys Testung. Die Intraklassen-Korrelationsanalyse (ICC) wurde für jede Gruppe durchgeführt, um die Übereinstimmung der einzelnen Messungen abzuschätzen. Für die graphische Darstellung des Vergleichs der unterschiedlichen Messmethoden wurde das Bland-Altman-Diagramm verwendet. EBC Daten wurden im Vorfeld zentriert und normalisiert. Zusätzlich wurde eine 100-fache Kreuzvalidierung für die Berechnung des Kreuzvalidierungswertes benutzt, wobei 10 % der Daten als Test-Daten verwendet wurden.

# 3. Ergebnisse

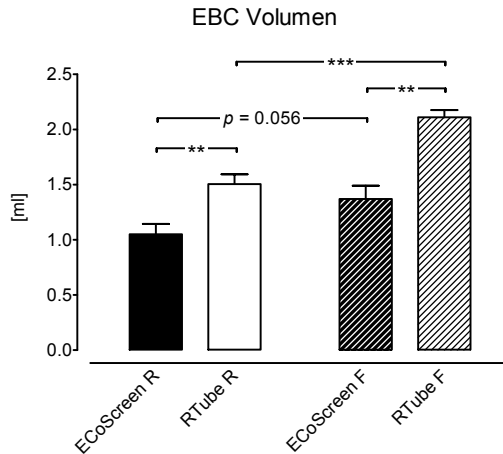
## 3.1. Volumen (Versuchsreihe 1)

### 3.1.1. Gerätevergleich

Es konnte gezeigt werden, dass mit dem RTube™ bei ruhiger Atmung verglichen mit dem ECoScreen Turbo signifikant mehr EBC Volumen gewonnen wird (RTube™:  $1,51 \pm 0,09$  ml vs. ECoScreen Turbo:  $1,05 \pm 0,09$  ml,  $p < 0,001$ ; Abb. 3.1, links). Auch bei forcierter Atmung wurden mit dem RTube™ signifikant höhere EBC Volumina gemessen (RTube™:  $2,11 \pm 0,07$  ml vs. ECoScreen Turbo:  $1,37 \pm 0,12$  ml,  $p < 0,001$ ; Abb. 3.1, rechts).

### 3.1.2. Atemmuster

Die Gegenüberstellung der unterschiedlichen Atemmanöver zeigte, dass forcierte Atmung eine höhere Volumenausbeute erbrachte. Mit dem RTube™ wurden bei ruhiger Atmung durchschnittlich  $1,51 \pm 0,09$  ml EBC gemessen. Nach forcierter Atmung konnte mit dem RTube™ signifikant mehr EBC Volumen gewonnen werden ( $2,11 \pm 0,07$  ml,  $p < 0,0001$ ; Abb. 3.1, weiße Balken). Mit dem ECoScreen Turbo wurde bei forcierter Atmung verglichen mit Ruheatmung nicht signifikant mehr EBC Volumen gemessen (ruhige Atmung:  $1,05 \pm 0,09$  ml vs. forcierter Atmung:  $1,37 \pm 0,12$  ml,  $p = 0,056$ ; Abb. 3.1; graue Balken)

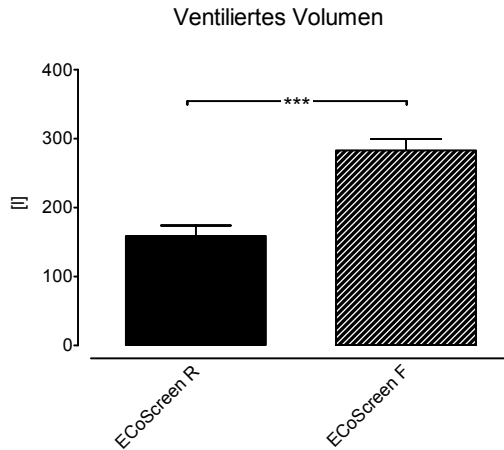


**Abbildung 3.1.:** Mit dem RTube™ wurden bei ruhiger und forcierter Atmung verglichen mit dem ECoScreen Turbo höhere EBC Volumina gemessen ( $p < 0,001$ ). Durch forcierte Atmung konnte mit beiden Geräten mehr EBC gewonnen werden. Beim RTube™ war der Unterschied zur Ruheatmung statistisch signifikant ( $p < 0,0001$ ).

### 3.1.3. Ventiliertes Volumen

Während der EBC Gewinnung konnte mit dem ECoScreen Turbo Gerät gleichzeitig das ventilierte Ausatemvolumen gemessen werden. Bei Anwendung des RTube™ war dies nicht möglich. Es konnte gezeigt werden, dass das Ausatemvolumen durch forcierte Atmung um das 1,78fache gesteigert wird (forcierte Atmung:  $282,9 \pm 16,49$  l vs. ruhige Atmung:  $158,82 \pm 15,05$  l,  $p < 0,0001$ ; Abb. 3.2).





**Abbildung 3.2.:** Forcierte Atmung bewirkte eine 1,78fache Steigerung des ventilierten Atemvolumens ( $p < 0,0001$ ).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass mit dem RTube™ signifikant mehr EBC produziert wird. Außerdem konnte mit forcierter Atmung mehr EBC Volumen gewonnen werden. Forcierte Atmung bewirkte eine 1,78fache Steigerung des Ausatemvolumens.

## 3.2. pH (Versuchsreihe 1)

### 3.2.1. Gerätevergleich

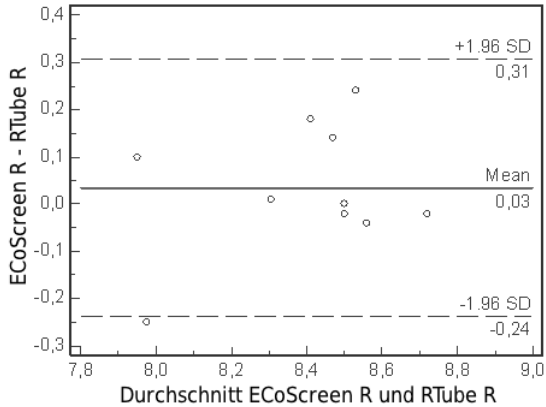
In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass mit dem RTube™ und ECoScreen Turbo bei Ruheatmung vergleichbare pH-Werte gemessen

werden (RTube™:  $8,38 \pm 0,08$  vs. ECoScreen Turbo:  $8,41 \pm 0,09$ ,  $p = 0,46$ ). Die Intraklassen-Korrelationsanalyse zeigte einen Wert von 0,86 (95 % KI 0,55 bis 0,96) mit einer Unter- und Obergrenze der Übereinstimmung bei  $-0,24$  (95 % KI  $-0,41$  bis  $-0,06$ ) und  $0,31$  (95 % KI 0,13 bis 0,48; Abb. 3.3). Die pH-Wert-Messung bei forcierter Atmung ergab für beide Geräte ähnlich gut übereinstimmende Werte. Bei forcierter Atmung wurde bei Anwendung des RTube™ ein durchschnittlicher pH-Wert von  $8,3 \pm 0,08$  gemessen. Bei Anwendung des ECoScreen Turbo lag der durchschnittliche pH-Wert bei  $8,38 \pm 0,1$ . Der Unterschied war dabei nicht signifikant ( $p = 0,17$ ). Der Intraklassen-Korrelationskoeffizient lag bei 0,84 (95 % KI 0,49 bis 0,96), die Unter- und Obergrenze der Übereinstimmung bei  $-0,23$  (95 % KI  $-0,43$  bis  $-0,03$ ) und  $0,37$  (95 % KI 0,18 bis 0,57; Abb. 3.4).

### 3.2.2. Atemmuster

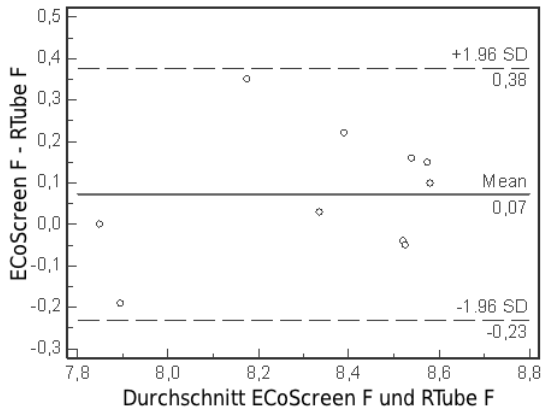
In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche Atemmuster den EBC pH-Wert nicht signifikant verändern. Dies konnte für den ECoScreen Turbo mit sehr guter Übereinstimmung aufgezeigt werden. Bei Ruheatmung wurde durchschnittlich ein EBC pH von  $8,41 \pm 0,09$  gemessen. Bei forcierter Atmung betrug der durchschnittliche EBC pH  $8,38 \pm 0,1$ . Der Unterschied war dabei nicht signifikant ( $p = 0,39$ ). Der Intraklassen-Korrelations-Koeffizient lag bei 0,92 (95 % KI 0,73 bis 0,98). Die Unter- und Obergrenze der Übereinstimmung lagen bei  $-0,27$  (95 % KI  $-0,42$  bis  $-0,12$ ) und  $0,2$  (95 % KI 0,05 bis 0,35; Abb. 3.5). Bei Anwendung des RTube™ stimmten die EBC pH-Werte nach ruhiger und forcierter Atmung moderat überein (ruhige Atmung:  $8,38 \pm 0,08$  vs. forcierte Atmung:  $8,3 \pm 0,08$ ,  $p = 0,33$ ). Es wurde ein Intraklassen-Korrelationskoeffizient von 0,61 (95 % KI 0,04 bis 0,88) ermittelt. Die Unter- und Obergrenze der Übereinstimmung lagen bei  $-0,51$  (95 % KI

–0,79 bis –0,23) bzw. 0,36 (95 % KI 0,08 bis 0,64; Abb. 3.6). Insgesamt kann-



**Abbildung 3.3.:** Bei Ruheatmung zeigten der RTube™ und ECoScreen Turbo vergleichbare pH-Werte.

te gezeigt werden, dass weder die Art des Gerätes noch das Atemmuster den pH-Wert signifikant verändern. Die Intraklassen-Korrelationskoeffizienten für die Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Atemmanöver lagen bei 0,61 (RTube™) und 0,92 (ECoScreen Turbo). Dies zeigt eine moderate bis sehr gute Übereinstimmung der Messergebnisse an. Die Intraklassen-Korrelationskoeffizienten bezüglich der Vergleichbarkeit der Gerätschaften lagen bei 0,86 (Ruheatmung) und 0,84 (forcierte Atmung). Dies impliziert eine gute Übereinstimmung der Messergebnisse.

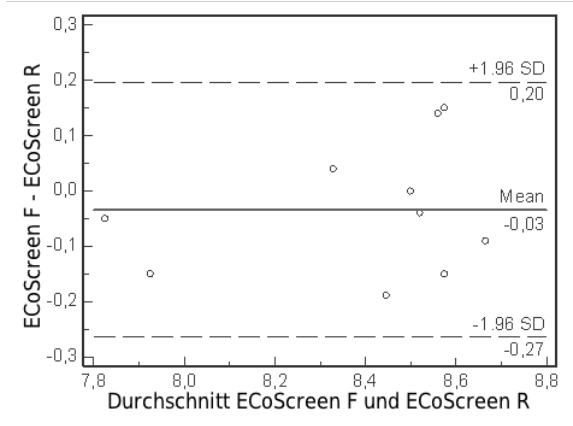


**Abbildung 3.4.:** Bei forcierter Atmung zeigten der RTube™ und ECoScreen Turbo vergleichbare pH-Werte.

### 3.3. Leitfähigkeit (Versuchsreihe 1)

#### 3.3.1. Gerätevergleich

Im Gerätevergleich bezüglich der Leitfähigkeit zeigte sich bei ruhiger Atmung kein statistisch signifikanter Unterschied (RTube™:  $64,15 \pm 12,25 \mu\text{S}/\text{cm}$  vs. ECoScreen Turbo  $80,6 \pm 10,21 \mu\text{S}/\text{cm}$ ,  $p = 0,087$ ). Der Intraklassen-Korrelationskoeffizient lag bei 0,66 (95% KI 0,13 bis 0,9). Die Untergrenze der Übereinstimmung war  $-36,58$  (95% KI  $-70,84$  bis  $-2,31$ ) und die obere Grenze lag bei  $69,48$  (95% KI  $35,21$  bis  $103,74$ ; Abb. 3.7). Bei forcierter Atmung wurden für beide Geräte übereinstimmende Werte gemessen (RTube™:  $68,7 \pm 7,02 \mu\text{S}/\text{cm}$  vs. ECoScreen Turbo  $69,6 \pm 7,14 \mu\text{S}/\text{cm}$ ,  $p = 0,83$ ). Der Intraklassen-Korrelationskoeffizient betrug hierbei 0,84 (95% Konfidenzin-

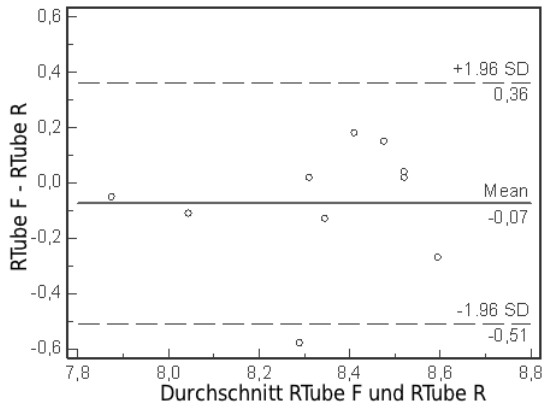


**Abbildung 3.5.:** Die untersuchten Atemmuster zeigten bei Verwendung des ECoScreen Turbos im Hinblick auf den Zielparameter EBC pH keine signifikanten Veränderungen.

tervall 0,48 bis 0,96). Die Unter- und Obergrenzen der Übereinstimmung lagen bei  $-24,73$  (95% KI  $-41,28$  bis  $-8,17$ ) und  $26,53$  (95% KI  $9,97$  bis  $43,08$ ; Abb. 3.8).

### 3.3.2. Atemmuster

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Atemmuster die Leitfähigkeit nicht signifikant verändert. Im Durchschnitt zeigten die mit dem RTube™ ermittelten Daten für ruhige und forcierte Atmung eine gute Übereinstimmung (ruhige Atmung:  $64,15 \pm 12,25 \mu\text{S}/\text{cm}$  vs. forcierte Atmung:  $68,7 \pm 7,02 \mu\text{S}/\text{cm}$ ,  $p = 0,55$ ). Der Intraklassen-Korrelationskoeffizient lag bei  $0,74$  (95% KI  $0,26$  bis  $0,93$ ). Bei einer Unter- und Ober-

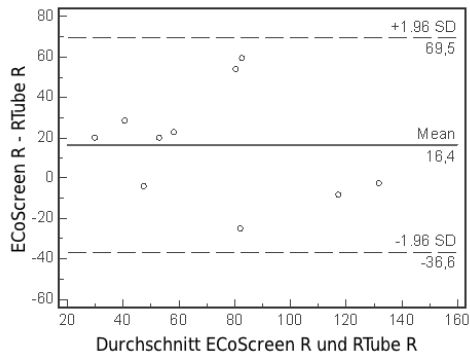


**Abbildung 3.6.:** Die untersuchten Atemmuster zeigten bei Verwendung des RTube™s im Hinblick auf den Zielparameter EBC pH keine signifikanten Veränderungen.

grenze der Übereinstimmung von  $-40,92$  (95% KI  $-70,29$  bis  $-11,54$ ) und  $50,01$  (95% KI  $20,64$  bis  $79,39$ ; Abb. 3.9) liegen individuelle Größenschwankungen vor. Bei Anwendung des ECoScreen Turbos konnte zwischen ruhiger und forcierter Atmung ebenfalls kein statistisch signifikanter Unterschied gemessen werden (ruhige Atmung:  $80,6 \pm 10,21 \mu\text{S}/\text{cm}$  vs. forcierte Atmung  $69,6 \pm 7,14 \mu\text{S}/\text{cm}$ ,  $p = 0,11$ ). Da der Intraklassen-Korrelationskoeffizient bei  $0,72$  (95% KI  $0,23$  bis  $0,92$ ) lag, die Unter- und Obergrenzen der Übereinstimmung  $-49,26$  (95% KI  $-73,98$  bis  $-24,54$ ) und  $27,26$  betragen, liegen wiederum relativ hohe individuelle Größenschwankungen vor (95% KI  $2,54$  bis  $51,98$ ; Abb. 3.10).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche Geräte und Atemmuster die Leitfähigkeit nicht signifikant verändern. Der Intraklassen-

Korrelationskoeffizient repräsentiert moderate bis gute Übereinstimmung (0,66 bis 0,84). Allerdings weisen die weiten Übereinstimmungsgrenzen auf eine geringgradige Übereinstimmung der Messergebnisse hinsichtlich der Vergleichbarkeit unterschiedlicher Apparaturen bei Ruheatmung sowie der Vergleichbarkeit unterschiedlicher Atemmuster beim ECoScreen Turbo hin.



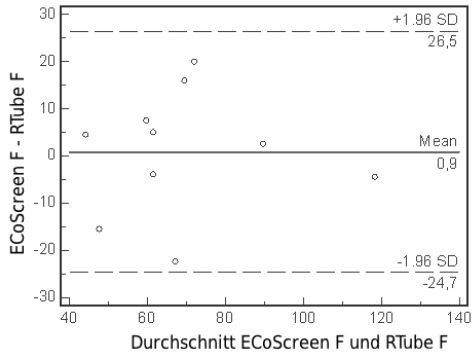
**Abbildung 3.7.:** Bei Ruheatmung wurde die Leitfähigkeit der beiden Geräten nicht statistisch signifikant verändert.

## 3.4. Proteinmessungen (Versuchsreihen 2 bis 5)

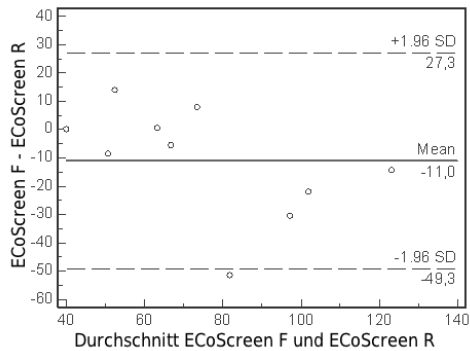
### 3.4.1. Gesamtproteinkonzentration (Versuchsreihe 2)

#### 3.4.1.1. Gerätevergleich

Im Gerätevergleich wurde bei Verwendung des ECoScreen Turbo bei Ruheatmung eine höhere Gesamtproteinkonzentration als bei Verwendung des

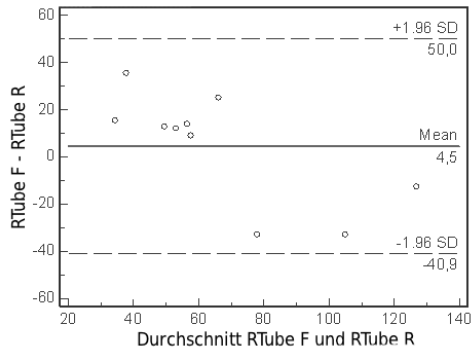


**Abbildung 3.8.:** Bei forcierter Atmung wurde die Leitfähigkeit bei beiden Geräten nicht statistisch signifikant verändert.



**Abbildung 3.9.:** Durch unterschiedliche Atemmuster wurde die Leitfähigkeit bei Anwendung des RTube™ nicht signifikant verändert.





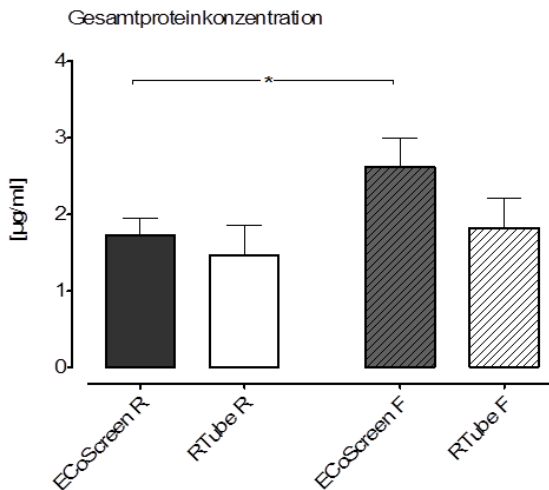
**Abbildung 3.10.:** Durch unterschiedliche Atemmuster wurde die Leitfähigkeit bei Anwendung des ECoScreen Turbo nicht signifikant verändert.

RTube™ gemessen (ECoScreen Turbo:  $(1,725 \pm 0,695) \mu\text{g ml}^{-1}$  vs. RTube™:  $(1,470 \pm 1,227) \mu\text{g ml}^{-1}$ ,  $p = 0,56$ ; Abb. 3.11, linke Balken). Der Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant. Bei forcierter Atmung wurde mit dem ECoScreen Turbo verglichen mit dem RTube™ zwar eine höhere Gesamtproteinkonzentration im EBC gemessen, der Unterschied war jedoch ebenso nicht statistisch signifikant (ECoScreen Turbo:  $(2,617 \pm 1,219) \mu\text{g ml}^{-1}$  vs. RTube™:  $(1,827 \pm 1,199) \mu\text{g ml}^{-1}$ ,  $p = 0,23$ ; Abb. 3.11, rechte Balken).

### 3.4.1.2. Atemmuster

Nach forcierter Atmung war im EBC eine höhere Gesamtproteinkonzentration messbar. Bei Anwendung des ECoScreen Turbo lag nach forcierter Atmung verglichen mit dem ruhigen Atemmuster eine statistisch signifikant höhere Gesamtproteinkonzentration im EBC vor (forcierter Atmung:

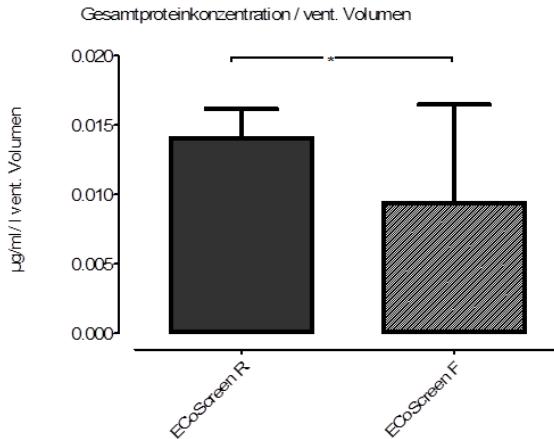
( $2,617 \pm 1,219$ )  $\mu\text{g ml}^{-1}$  vs. ruhige Atmung: ( $1,715 \pm 0,695$ )  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ;  $p < 0,05$ ; Abb. 3.11, graue Balken). Mit dem RTube™ konnte durch forcierte Atmung ebenfalls eine höhere Gesamtproteinkonzentration gewonnen werden. Der Unterschied war allerdings nicht statistisch signifikant (forcierte Atmung: ( $1,827 \pm 1,199$ )  $\mu\text{g ml}^{-1}$  vs. ruhige Atmung: ( $1,470 \pm 1,227$ )  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ,  $p = 0,43$ ).



**Abbildung 3.11.:** Bei Ruheatmung (R) und forcierter Atmung (F) wurde kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen dem RTube™ und dem ECoScreen Turbo festgestellt. Nach forcierter Atmung war im EBC eine höhere Gesamtproteinkonzentrationen nachweisbar. Bei Anwendung des ECoScreen Turbo war dieser Unterschied statistisch signifikant ( $p < 0,05$ )

### 3.4.1.3. Normierung der Gesamtproteinkonzentration

Bei Anwendung des ECoScreen Turbo konnte mithilfe eines Spirometers während des Messvorganges das Ausatemvolumen aufgezeichnet werden. Nach Normierung der Gesamtproteinkonzentration bezüglich des ventilierten Volumens ergaben sich bei ruhiger Atmung höhere normalisierte Gesamtproteinkonzentrationen als bei forcierter Atmung (ruhige Atmung:  $(0,0141 \pm 0,0067) \mu\text{g ml}^{-1} \text{l}^{-1}$  vs. forcierte Atmung:  $(0,0094 \pm 0,0071) \mu\text{g ml}^{-1} \text{l}^{-1}$ ;  $p < 0,05$ ; Abb. 3.12).



**Abbildung 3.12.:** Bei der Normierung der Gesamtproteinkonzentration bezüglich des ventilierten Volumens ergaben sich bei ruhiger Atmung (R) höhere normalisierte Gesamtproteinkonzentrationen als bei forcierter Atmung (F) ( $p < 0,05$ )

### 3.4.2. Gesamtproteinmenge (Versuchsreihe 2)

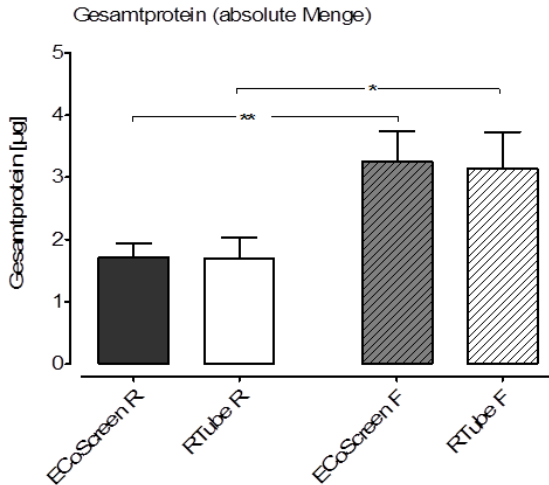
Für die Berechnung der Gesamtproteinmenge im EBC wurde die Gesamtproteinkonzentration mit dem EBC Volumen multipliziert.

#### 3.4.2.1. Gerätevergleich

Beim Vergleich der beiden Geräte bezüglich der unter Ruhebedingungen im EBC messbaren Gesamtproteinmengen zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied (ECoScreen Turbo:  $(1,7130 \pm 0,7129)$   $\mu\text{g}$  vs. RTube™:  $(1,685 \pm 1,084)$   $\mu\text{g}$ ;  $p = 0,95$ ; Abb. 3.13, linke Balken). Auch bei forcierter Atmung konnten mit dem ECoScreen Turbo keine signifikant höheren Gesamtproteinmengen im EBC gemessen werden als mit dem RTube™ (ECoScreen Turbo:  $(3,246 \pm 1,545)$   $\mu\text{g}$  vs. RTube™  $(3,142 \pm 1,850)$   $\mu\text{g}$ ;  $p = 0,89$ ; Abb. 3.13, rechte Balken).

#### 3.4.2.2. Atemmuster

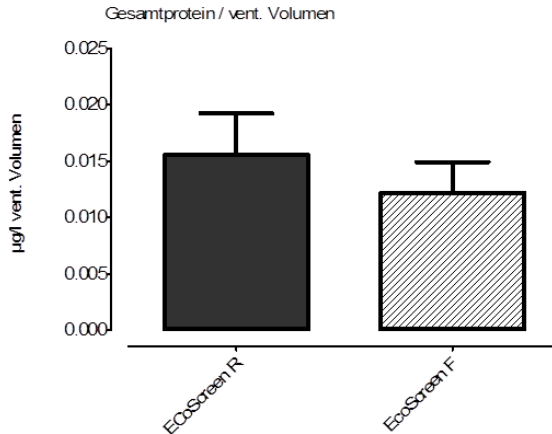
Es konnte gezeigt werden, dass bei forcierter Atmung sowohl bei Anwendung des ECoScreen Turbo als auch des RTube™ höhere Gesamtproteinmengen im EBC gemessen werden. Nach ruhiger Atmung wurde mit dem RTube™ eine durchschnittliche Gesamtproteinmenge von  $(1,685 \pm 1,084)$   $\mu\text{g}$  im EBC gemessen, nach forcierter Atmung betrug die Gesamtproteinmenge durchschnittlich  $(3,142 \pm 1,850)$   $\mu\text{g}$ . Der Unterschied war dabei statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ) (Abb. 3.13, weiße Balken). Bei Anwendung der ECoScreen Turbo war nach forcierter Atmung ebenfalls statistisch signifikant mehr Gesamtprotein im EBC nachweisbar (forcierter Atmung:  $(3,246 \pm 1,545)$   $\mu\text{g}$  vs. ruhige Atmung:  $(1,7130 \pm 0,7129)$   $\mu\text{g}$ ;  $p < 0,005$ ; Abb. 3.13, graue Balken).



**Abbildung 3.13.:** Forcierte Atmung erhöhte sowohl beim ECoScreen Turbo als auch bei Anwendung des RTube™ signifikant die Gesamtproteinmenge im EBC (ECoScreen Turbo:  $p < 0,005$ ; RTube™:  $p < 0,05$ ). Das Gerät selbst hatte keinen Einfluss auf die Gesamtproteinmenge.

### 3.4.2.3. Normierung der Gesamtproteinmenge

Nach Normierung der Gesamtproteinmenge bezüglich des ventilierten Volumens zeigte sich, dass die absolute Proteinmenge pro ventiliertes Atemvolumen bei forcierter Atmung nicht signifikant höher war als bei ruhiger Atmung (forcierte Atmung:  $(0,0121 \pm 0,0088) \mu\text{g l}^{-1}$  vs. ruhige Atmung:  $(0,0155 \pm 0,0117) \mu\text{g l}^{-1}$ ;  $p = 0,13$ ; Abb. 3.14).



**Abbildung 3.14.:** Nach Normierung der Gesamtproteinmenge bezüglich des ventilierten Atemvolumens fand sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen forcierter Atmung und Ruheatmung.

### 3.4.3. Messung spezifischer Proteine

#### 3.4.3.1. Club Cell Protein und Surfactant Protein A (Versuchsreihe 3)

Bei über der Hälfte der Messungen lagen die gemessenen Konzentrationen des Club Cell Proteins und das Surfactant Proteins A unterhalb der Nachweisgrenze. Auch durch Beschichtung der Sammelgefäße mit 1 % BSA in PBS und Konzentrierung der EBC Proben (Lyophilisierung) ließen sich keine verlässlichen Ergebnisse erzielen. Auch in den Western Blot Untersuchungen ist es nicht gelungen SP-A und CCP reproduzierbar im EBC zu detektieren.

### 3.4.3.2. Alpha-1-Antitrypsin (Versuchsreihe 4)

Hierfür wurde EBC sowohl mit dem RTube™ als auch mit dem ECoScreen Turbo gewonnen. Die Sammelgefäße waren nicht beschichtet.

**Konzentration** Im Gerätevergleich war bei Verwendung des RTube™ bei Ruheatmung tendenziell eine höhere Alpha-A-Antitrypsin (AAT) Konzentration als bei Verwendung des ECoScreen Turbo messbar. Der Unterschied war dabei aber nicht statistisch signifikant (RTube™:  $(453,2 \pm 542,0)$  pg ml<sup>-1</sup> vs. ECoScreen Turbo:  $(293,2 \pm 274,8)$  pg ml<sup>-1</sup>;  $p = 0,742$ ; Abb. 3.15, links oben graue Balken).

Nach forcierter Atmung wurden mit dem ECoScreen Turbo verglichen mit dem RTube™ tendenziell höhere AAT Konzentrationen im EBC gemessen. Der Unterschied war dabei allerdings nicht statistisch signifikant (ECoScreen Turbo:  $(1360 \pm 1009)$  pg ml<sup>-1</sup> vs. RTube™:  $(248,8 \pm 317,1)$  pg ml<sup>-1</sup>,  $p = 0,156$ ; Abb. 3.15, links oben, weiße Balken).

Bei Betrachtung des Atemmusters zeigten sich folgende Ergebnisse: Nach forcierter Atmung wurden bei Anwendung des ECoScreen Turbo verglichen mit dem ruhigen Atemmuster statistisch signifikant höhere AAT Konzentrationen im EBC gemessen (F:  $(1360 \pm 1009)$  pg ml<sup>-1</sup> vs. R:  $(293,2 \pm 274,8)$  pg ml<sup>-1</sup>;  $p = 0,0078$ ; Abb. 3.15, links oben). Bei Anwendung des RTube™ lagen nach forcierter Atmung verglichen mit dem ruhigen Atemmanöver tendenziell geringere AAT Konzentration im EBC vor (R:  $(453,2 \pm 542,0)$  pg ml<sup>-1</sup> vs. F:  $(248,5 \pm 317,7)$  pg ml<sup>-1</sup>;  $p = 0,5625$ , Abb. 3.15, links oben).

**Normierte Konzentration** Nach Normierung der AAT Proteinkonzentration bezüglich des ventilierten Volumens zeigte sich bei forcierter Atmung pro ventiliertes Ausatemvolumen eine signifikant höhere Proteinkonzentration im Vergleich zur Ruheatmung (F:  $(4,371 \pm 3,096)$  pg ml<sup>-1</sup> l<sup>-1</sup> vs.

R:  $(1,825 \pm 1,212)$  pg ml<sup>-1</sup> l<sup>-1</sup>;  $p = 0,039$ , Abb. 3.15, rechts oben).

**Absolute Proteinmenge** Nach Berechnung der absoluten AAT Mengen zeigten sich die Ergebnisse nahezu unverändert. Beim Vergleich der Geräte konnte gezeigt werden, dass bei Ruheatmung mit dem RTube™ eine etwas höhere AAT Menge im EBC erzielt werden konnte, wobei der Unterschied nicht statistisch signifikant war (RTube™:  $(425,2 \pm 502,7)$  pg vs. ECoScreen Turbo:  $(308,8 \pm 293,2)$  pg;  $p = 1,0$ ; Abb. 3.15, links unten graue Balken). Bei forcierter Atmung wurde mit dem ECoScreen Turbo verglichen mit dem RTube™ tendenziell höhere Proteinkonzentrationen von AAT im EBC gemessen. Der Unterschied war dabei allerdings ebenso nicht statistisch signifikant (ECoScreen Turbo:  $(1360 \pm 1009)$  pg ml<sup>-1</sup> vs. RTube™:  $(248,8 \pm 317,1)$  pg ml<sup>-1</sup>,  $p = 0,156$ ; Abb. 3.15, links unten, weiße Balken).

Bei Betrachtung des Atemmusters zeigten sich folgende Ergebnisse: Bei Anwendung des ECoScreen Turbo wurden nach forcierter Atmung verglichen mit dem ruhigen Atemmuster statistisch signifikant höhere AAT Mengen im EBC gemessen (F:  $(2122 \pm 1686)$  pg vs. R:  $(308,8 \pm 293,2)$  pg;  $p = 0,0078$ ; Abb. 3.15, links unten). Mit dem RTube™ wurde durch forcierte Atmung verglichen mit dem ruhigen Atemmanöver allerdings eine geringere AAT Konzentration im EBC gemessen, wobei der Unterschied nicht statistisch signifikant war (R:  $(425,2 \pm 502,7)$  pg vs. F:  $(357,2 \pm 449,0)$  pg;  $p = 0,8438$ , Abb. 3.15, links unten).

**Normierte absolute Proteinmenge** Auch nach Normierung der absoluten Mengen von AAT im EBC konnte gezeigt werden, dass bei forcierter Atmung pro Ausatemvolumen statistisch signifikant höhere Proteinmengen von AAT im EBC messbar sind als nach Ruheatmung (F:  $(6,714 \pm 5,187)$  pg l<sup>-1</sup> vs. R:  $(1,908 \pm 1,261)$  pg l<sup>-1</sup>;  $p = 0,027$ , Abb. 3.15, rechts unten).



### 3.4.3.3. Alpha-1-Antitrypsin (Versuchsreihe 5)

Hierfür wurde EBC ausschließlich mittels ECoScreen Turbo gewonnen. Weiterhin waren die Sammelgefäße des ECoScreen Turbo sowie die Eppendorf Cups mit 1 % BSA in PBS beschichtet.

**AAT Konzentration** Es konnte gezeigt werden, dass nach forcierter Atmung statistisch signifikant höhere AAT Konzentrationen im EBC messbar sind

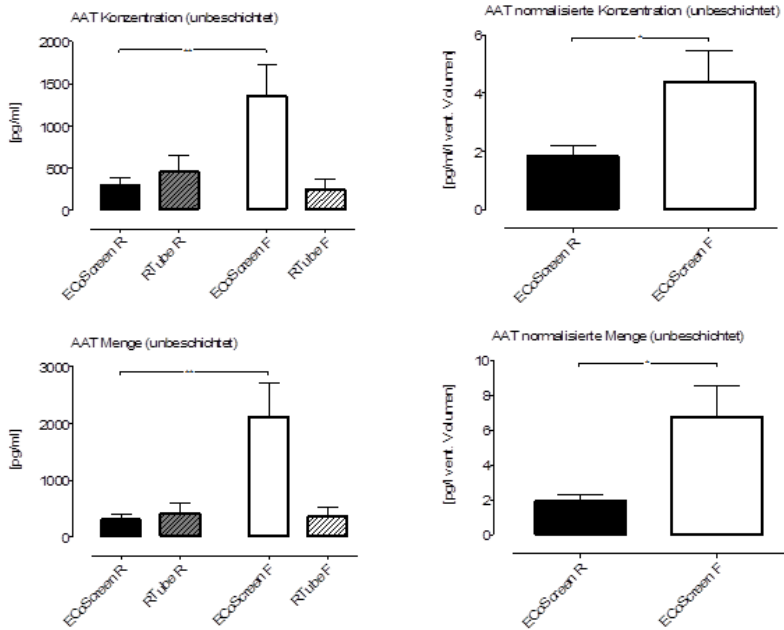
(F:  $(2439 \pm 1358)$  pg ml<sup>-1</sup> vs. R:  $(1056,0 \pm 759,9)$  pg ml<sup>-1</sup>;  $p < 0,005$ ; Abb. 3.16, links oben).

**Normierte Konzentration** Nach Normierung der AAT Konzentration bezüglich des ventilerten Atemvolumens zeigte sich nach forcierter Atmung ein Trend zu höheren Proteinkonzentrationen, allerdings war dieser Unterschied nicht statistisch signifikant (F:  $(9,056 \pm 5,300)$  pg ml<sup>-1</sup> l<sup>-1</sup> vs. R:  $(6,148 \pm 4,523)$  pg ml<sup>-1</sup> l<sup>-1</sup>;  $p = 0,08$ , Abb. 3.16, rechts oben).

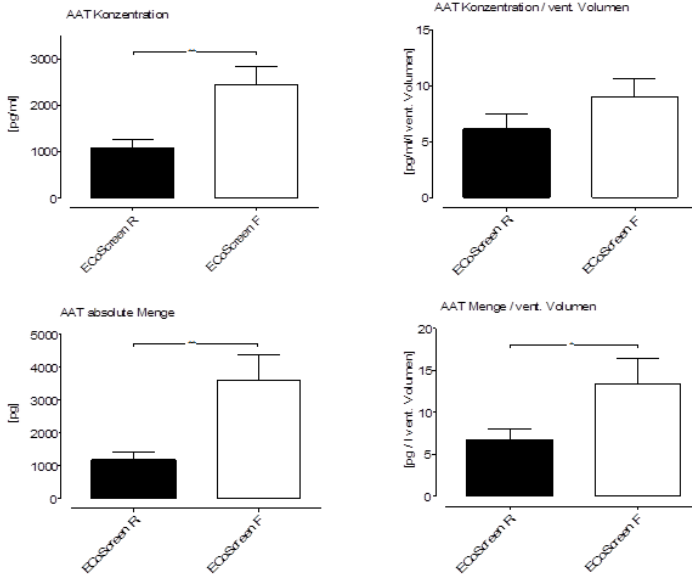
**Absolute Proteinmenge** Auch bei der Berechnung der absoluten Menge von Alpha-1 Antitrypsin zeigte sich, dass durch forcierte Atmung statistisch signifikant höhere Proteinmengen im EBC nachweisbar sind (F:  $(3608 \pm 2724)$  pg vs. R:  $(1159,0 \pm 864,3)$  pg;  $p < 0,005$ , Abb. 3.16, links unten).

**Normierte absolute Proteinmenge** Nach Normierung der absoluten Menge von AAT bezüglich des ventilerten Atemvolumens zeigte sich nach forcierter Atmung signifikant mehr AAT im EBC als nach Ruheatmung (F:  $(13,43 \pm 10,38)$  pg l<sup>-1</sup> vs. R:  $(6,643 \pm 4,908)$  pg l<sup>-1</sup>;  $p < 0,05$ , Abb. 3.16, rechts unten). Zusammenfassend ist zur Proteinmessung anzumerken, dass

sich die Ergebnisse je nach angewandeter Auswertungsmethode (Konzentration, Konzentration pro ventiliertes Volumen, absolute Proteinmenge, absolute Proteinmenge pro ventiliertes Volumen) teilweise anders präsentieren. Weiterhin konnte für die AAT-Messung im EBC gezeigt werden, dass bei Verwendung beschichteter Sammelgefäße signifikant höherer AAT Konzentrationen im EBC gemessen werden können als bei Verwendung unbeschichteter Sammelgefäße (3,6fach höhere Konzentration bei Ruheatmung, bzw. 1,79fach höhere Konzentration bei forcierter Atmung).



**Abbildung 3.15.:** Darstellung der AAT Messungen (unbeschichtete Sammelgefäße) auf unterschiedliche Arten: Durch forcierte Atmung können bei Anwendung des ECoScreen Turbo statistisch signifikant höhere AAT Konzentrationen ( $p = 0,0078$ ) sowie absolute AAT Mengen ( $p = 0,0078$ ) im EBC gemessen werden. Dies gilt auch für die pro Ausatemvolumen normierten AAT Konzentrationen ( $p = 0,039$ ) und absoluten Mengen ( $p = 0,027$ ) im EBC. Bei Verwendung des RTube™ werden bei forciertem Atemmanöver verglichen mit der forcierten Atmung geringere Konzentrationen/Mengen von AAT im EBC gemessen. Die Unterschiede waren dabei aber nicht statistisch signifikant.



**Abbildung 3.16.:** Darstellung der AAT Messungen (beschichtete Sammelgefäße) auf unterschiedliche Arten: Es zeigte sich, dass durch forcierte Atmung eine signifikant höhere AAT Konzentration ( $p < 0,005$ ), absolute AAT Menge ( $p < 0,005$ ) sowie normierte AAT Menge ( $p < 0,05$ ) erreicht wird. Nach Normierung der AAT Konzentration bezüglich des ventilierten Atemvolumens zeigte sich nach forcierter Atmung ein Trend zu höheren Proteinkonzentrationen.

## 4. Diskussion

In der Literatur finden sich zahlreiche Arbeiten, die sich mit technischen Aspekten zur Methodik von Atemwegskondensat befassen. Im Fokus stehen dabei u.a. Effekte unterschiedlicher Kondensationstemperaturen (Vyas et al., 2012; Goldoni et al., 2005; Czebe et al., 2008) und Oberflächenbeschaffenheiten der Kondensationsflächen (Whittaker et al., 2011; Hoffmeyer et al., 2009b; Rosias et al., 2008; Liu et al., 2007; Rosias et al., 2006) hinsichtlich der Detektierbarkeit von biologischen Mediatoren. Die Autoren führten ihre Experimente dabei meist mit dem ECoScreen, dem RTube™ oder mit selbst konzipierten Geräten durch und erhoben so ihre Vergleichsdaten. Bislang wurden allerdings keine Studien publiziert, die die beiden kommerziell erhältlichen Geräte ECoScreen Turbo und RTube™ vergleichen. Anhand der Zielparameter Volumen, Leitfähigkeit, pH und Gesamtproteinkonzentration wurde in der vorliegenden Arbeit überprüft, ob die beiden Geräte in der Analyse von Atemwegskondensat vergleichbar sind. Darüber hinaus wurde die Frage gestellt, ob unterschiedliche Atemmuster die Zusammensetzung des Atemwegskondensats beeinflussen.

## 4.1. Volumen

### 4.1.1. Gerätevergleich

Bei Anwendung des RTube™ konnten während ruhiger und forcierter Atmung verglichen mit dem ECoScreen Turbo stets signifikant höhere EBC-Volumina produziert werden. In der Literatur finden sich für das Vorläufermodell des ECoScreen Turbo diesbezüglich gegensätzliche Angaben. Verschiedene Arbeitsgruppen publizierten, dass mit dem RTube™ eine geringere Volumenausbeute erreicht werde als mit dem ECoScreen (Czebe et al., 2008; Liu et al., 2007; Soyer et al., 2006). Andere Arbeitsgruppen dagegen erhielten mit dem ECoScreen eine geringere Ausbeute. Ursächlich können folgende Überlegungen in Betracht gezogen werden. Die genannten Apparaturen unterscheiden sich neben ihrem Aufbau in ihren Kondensationstemperaturen und -oberflächen. Es ist bekannt, dass bei einer niedrigeren Kondensationstemperatur mehr Kondensat entsteht (Vyas et al., 2012; Goldoni et al., 2005). Der ECoScreen Turbo zeichnet sich durch eine konstante Temperatur von ca.  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$  aus. Der ECoScreen hingegen weist eine konstant kühlere Kondensationstemperatur von  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  aus. Der RTube™ dagegen verfügt nicht über eine konstante Kondensationstemperatur. Die anfängliche Kondensationstemperatur liegt bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  und erreicht nach zehn minütiger Messzeit etwa  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Bezogen auf die Gesamtmesszeit zeichnen sich der RTube™ und die ECoScreen-Geräte also durch unterschiedliche Temperaturkurven aus. Der niedrigeren Starttemperatur des RTube™ steht die konstante Temperatur der ECoScreen-Geräte gegenüber. Ein weiterer Aspekt ist der Aufbau der Sammelsysteme. Im ECoScreen Turbo wird der Luftstrom vom Mundventil über einen leicht gebogenen Schlauch zum Sammelgefäß geleitet und entweicht dort durch ein neben dem Einlass an-

gebrachtes Druckventil. Im RTube™ dagegen ist das Mundventil im 90°-Winkel zum Sammelsystem, die Luft wird also an die Wand geleitet und führt so möglicherweise zu einem turbulenterem Flussprofil innerhalb des Sammelzylinders. Dadurch wird der Kontakt der Ausatemluft mit der Kondensationsoberfläche zusätzlich verstärkt, sodass mehr EBC kondensieren kann. Der RTube™ hat im Vergleich zum ECoScreen Turbo außerdem kein komplexes Schlauchsystem, durch das die Ausatemluft zur Kondensationsoberfläche geleitet wird. Es ist nicht auszuschließen, dass es hier innerhalb des Schlauchsystems zu Volumenverlusten kommt. Ein möglicherweise viel stärkerer Effekt ist die unterschiedliche Kondensationsfläche der untersuchten Geräte. Bereits Hoffmeyer et al. (2009b); Rosias et al. (2008) konnten einen Zusammenhang zwischen Kondensationsfläche und EBC-Volumen zeigen. Auch die vorliegenden Ergebnisse stützen dies. Während das Sammelgefäß im ECoScreen Turbo eine gekühlte Innenfläche von etwa 190 cm<sup>2</sup> besitzt, ist die entsprechende Fläche im RTube™ mit etwa 279 cm<sup>2</sup> um das 1.5fache größer. In der vorliegenden Arbeit entspricht dies auch in etwa dem Unterschied in der Volumenausbeute. Somit kann die höhere Volumenausbeute beim RTube™ auf die größere Kondensationsoberfläche zurückgeführt werden.

#### **4.1.2. Atemmuster**

In einer zweiten Fragestellung wurde der Einfluss des Atemmusters auf das Volumen des Atemwegskondensats untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass forcierte Atmung unabhängig von der Art des Gerätes größere EBC Volumina produziert. Weiterhin lässt sich aus den Daten des ECoScreen Turbo feststellen, dass forciertes Atmen im Vergleich zur Ruheatmung ein um das 1,78fache gesteigertes gesamtes ventiliertes Atemvolumen ergibt. Dar-

aus lässt sich schlussfolgern, dass ein gesteigertes ventiliertes Volumen eine höhere EBC Volumenausbeute bedingt. In der Literatur finden sich vergleichbare Ergebnisse. In einer Arbeit von Schleiss et al. (2000), in der die Abhängigkeit des Hydrogenperoxid-Gehalts im Atemwegskondensat von der expiratorischen Flussrate untersucht wurde, zeigte sich eine Steigerung des EBC-Volumens bei Erhöhung des expiratorischen Flusses. Gessner et al. (2001) demonstrierten, dass das Kondensatvolumen in erster Linie von dem ventilierten Volumen abhängig zu sein scheint. Sie konnten eine starke Korrelation zwischen Atemkondensat und ventiliertem Volumen aufzeigen. McCafferty et al. (2004) gingen der Frage nach, inwiefern unterschiedliche Atemzug- und Atemminutenvolumina unter anderem Einfluss auf die gewonnenen EBC-Volumina haben. Auch diese Arbeitsgruppe bestätigte, dass bei einem Atemzugvolumen  $> 1000$  ml sowie einem Atemminutenvolumen  $> 15$  l  $\text{min}^{-1}$  mehr EBC gewonnen wird. Ebenso gelang es Liu und Thomas (2007) bei gesunden Probanden, COPD Patienten und Asthma Patienten einen signifikanten Zusammenhang zwischen EBC Volumina und Atemzug- bzw. Atemminutenvolumen herzustellen. Zwei weitere Arbeitsgruppen untersuchten die Abhängigkeit des EBC Volumens vom Atemmuster. Gajdocsi et al. (2011) forderten 16 gesunde Probanden auf, über 10 Minuten mit einem gesteigerten Atemzugvolumen zu atmen. Verglichen mit der EBC Volumenausbeute unter Ruheatmung konnte dabei signifikant mehr EBC gewonnen werden. Debley et al. (2011) konnten bei Asthma-Patienten zeigen, dass durch die Verdoppelung des Atemminutenvolumens signifikant mehr EBC gewonnen wird.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Verwendung unterschiedlicher Messaufbauten zur Gewinnung von Atemwegskondensat zu unterschiedlichen EBC-Volumina führt. Der RTube™ erreichte signifikant mehr EBC Volumen. Durch ein forciertes Atemmuster lässt sich unabhängig von



der Art des Gerätes signifikant mehr EBC gewinnen.

## 4.2. Leitfähigkeit

In dieser Arbeit konnte aufgezeigt werden, dass die Leitfähigkeit im EBC durch unterschiedliche Gerätschaften und Atemmanöver nicht statistisch signifikant verändert wird.

### 4.2.1. Gerätevergleich

Mit dem ECoScreen Turbo und RTube™ wurden sowohl bei ruhigem als auch forciertem Atemmuster vergleichbare Leitfähigkeits-Werte gemessen. Die bisher in der Literatur veröffentlichte Daten zur Leitfähigkeitsmessung in nativen EBC Proben (keine Lyophilisierung oder Vakuumverdampfung der EBC Proben vor Messung) bestätigten die in der vorliegenden Arbeit gemessenen Daten bei Ruheatmung. So ermittelten Dressel et al. (2010) in EBC Proben von gesunden Probanden eine durchschnittliche Leitfähigkeit von  $(71,0 \pm 34,9) \mu\text{S cm}^{-1}$ . Die EBC Proben wurden dabei mit dem ECoScreen gewonnen. Koczulla et al. (2010b) fand bei gesunden Probanden nach ruhiger Atmung vergleichbare Messergebnisse. In dieser Studie wurde zur EBC Gewinnung der RTube™ eingesetzt. Bikov et al. (2012) verwendeten in ihrer Arbeit zur Gewinnung von Atemwegskondensat ebenfalls den RTube™. Insgesamt wurde die Leitfähigkeit im EBC von 7 gesunden Probanden gemessen. Diese lag im Mittel bei  $52,659 \mu\text{S cm}^{-1}$ . Für den ECoScreen Turbo DECCS liegen derzeit keine Vergleichsdaten vor. Vyas et al. (2012) gingen der Frage nach, ob sich unterschiedliche Kondensationstemperaturen auf die Analyse des Atemwegskondensats auswirken. Sie untersuchten dabei die Parameter EBC Volumen, Gesamtproteinkonzentration, Hydrogenperoxid,

die Nitratkonzentration sowie die Leitfähigkeit. Als Sammelgerät wurde die von Liu und Thomas (2007) beschriebene Apparatur aus Glas verwendet. Als Kühlelement wurde zum einen Wasser mit einer Temperatur von 4 °C verwendet. In einem zweiten Versuchsaufbau wurde trockenes Eis (-20 °C) als kühlendes Element benutzt. 20 gesunde Probanden wurden aufgefordert 10 Minuten ruhig zu atmen. Die Messung wurde jeweils mit beiden Aufbauten durchgeführt. Für die Messung der Leitfähigkeit wurden 800 µl EBC zuvor lyophilisiert und anschließend mit 800 µl deionisiertem Wasser resuspendiert. Anschließend erfolgte die Messung der Leitfähigkeit. Es konnte dabei gezeigt werden, dass sich die Mittelwerte zwischen beiden Versuchsaufbauten sehr ähnelten ( $(18,78 \pm 6,71) \mu\text{S cm}^{-1}$  bei einer Temperatur von 4 °C vs.  $(15,32 \pm 6,28) \mu\text{S cm}^{-1}$  bei einer Temperatur von -20 °C).

#### **4.2.2. Atemmuster**

Es konnte gezeigt werden, dass sich die Leitfähigkeit im EBC nach forciertem Atemmuster nicht veränderte. In der Literatur finden sich bislang nur wenige Arbeiten, die den Einfluss unterschiedlicher Atemmuster auf die Leitfähigkeit untersucht haben. Lediglich Debley et al. (2011) untersuchten bei erwachsenen stabilen Asthma-Patienten den Verdünnungsfaktor des epithelialen Flüssigkeitsfilms im EBC durch Messung der Leitfähigkeit. Die EBC Gewinnung erfolgte dabei unter anderem auch bei gesteigertem Atemminutenvolumen. Als Sammelgerät wurde der EcoScreen verwendet. Der über die im EBC gemessene Leitfähigkeit geschätzte Verdünnungsfaktor war dabei nach gesteigertem Minutenvolumen nicht verändert.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Leitfähigkeit im EBC als stabiler Parameter gewertet werden kann, da sie weder vom Gerät noch von unterschiedlichen Atemmanövern beeinflusst wird.

## 4.3. pH

### 4.3.1. Gerätevergleich

Bezüglich der Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Messaufbauten konnte gezeigt werden, dass mit dem RTube™ und dem ECoScreen Turbo vergleichbare pH-Werte gemessen werden. Koczulla et al. (2010a) publizierten für den RTube™ bei identischer Messmethode (20 minütige Entgasung der EBC-Proben mit Argon) vergleichbare pH-Werte. Selbst bei Unterschieden in der Durchführung der pH-Bestimmung wird bei gesunden Probanden bei Anwendung des RTube™ im Median ein pH-Wert von 8,0 gemessen (Prieto et al., 2007; Paget-Brown et al., 2006; Soyer et al., 2006). Für die pH-Werte der mit dem ECoScreen Turbo gesammelten Proben gibt es bislang noch wenig Vergleichsliteratur. Hoffmeyer et al. (2014) ermittelten in ihrer Studie den pH-Wert im EBC von 10 gesunden Probanden im Alter von 21 bis 29 Jahren. Die Probanden atmeten für 10 Minuten ruhig ein und aus. Vor Durchführung der pH-Messung wurden die EBC Probanden 10 Minuten mit Argon entgast. Die anschließend gemessenen pH-Werte lagen im Mittel bei  $(7,454 \pm 0,028)$  Goldoni et al. (2013) untersuchten u.a. von 39 gesunden Nichtrauchern den pH-Werte im EBC. Die Probanden atmeten 15 Minuten ruhig ein und aus. Die EBC Proben wurden vor Messung des pH-Wertes ebenfalls 10 Minuten lang mit Argon entgast. Der ermittelte Median Wert der gemessenen pH-Werte lag bei 8,05.

Bisherige Vergleichsarbeiten bezogen sich auf die Anwendung der Vorläufermodelle des ECoScreen Turbo, den EcoScreen I und II. Dabei ist anzumerken, dass der EcoScreen I aufgrund technischer Mängel mittlerweile nicht mehr produziert wird (Konstantinidi et al., 2015). Umso wichtiger ist die vergleichende Untersuchung des Nachfolgermodells ECoScreen Tur-

bo hinsichtlich elementarer Zielparameter in der EBC-Forschung. In diesem Zusammenhang ist insbesondere die Reproduzierbarkeit des pH-Wertes entscheidend, da der pH im EBC als potentiell relevanter nichtinvasiv gewinnbarer unspezifischer Inflammationsmarker diskutiert wird (Kane et al., 2009; Ferrazzoni et al., 2009; Carpagnano et al., 2004).

### **4.3.2. Atemmuster**

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche Atemmanöver keine signifikanten Veränderungen des pH-Wertes bewirken. Dies gilt sowohl für den RTube™ als auch für den ECoScreen Turbo. In der Literatur finden sich diesbezüglich vergleichbare Angaben für den RTube™. Für den ECoScreen Turbo gibt es bislang noch keine Vergleichsdaten. Vaughan et al. (2003) konnten bei Anwendung des RTube™ sowohl bei Hyperventilation als auch bei Hypoventilation keine veränderten pH-Werte nachweisen. McCafferty et al. (2004) untersuchten mit dem EcoScreen, ob unterschiedliche Atemzugvolumina (1500 ml, 759 ml) und unterschiedliche Atemminutenvolumina ( $7,51 \text{ min}^{-1}$ ,  $15,01 \text{ min}^{-1}$  and  $22,51 \text{ min}^{-1}$ ) Abweichungen im pH-Wert zur Folge haben könnten. Auch diese Arbeitsgruppe schlussfolgerte, dass das Atemmuster keinen Einfluss auf den EBC pH-Wert nimmt. Die Überlegung, dass Hyperventilation zu veränderten pH-Werten führen könnte, ist durchaus berechtigt. Es ist bekannt, dass der pH-Wert im Ausatemkondensat durch die Konzentration volatiler und nicht volatiler Bestandteile bestimmt wird (Effros et al., 2006; Wells et al., 2005; Dwyer, 2004). Unter der Annahme, dass durch forcierte Atmung eine höhere Konzentration von alveolärem und endobronchialem  $\text{CO}_2$  und konsekutiv mehr  $\text{H}^+$  und  $\text{HCO}_3^-$  Ionen im EBC erreicht wird, lässt sich ein veränderter pH-Wert schlussfolgern. Diese Hypothese kann allerdings weder durch die vorliegen-

de noch durch frühere Arbeiten bestätigt werden.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass der pH-Wert im EBC ein stabiler und robuster Parameter ist. Weder unterschiedliche Messmanöver noch Messaufbauten führen zu signifikant veränderten pH-Werten. Generell muss bei der Gegenüberstellung publizierter pH-Werte allerdings die unterschiedliche Aufbereitung der EBC Probe vor der pH Messung berücksichtigt werden. Findet die pH-Messung bei einem standardisierten  $p\text{CO}_2$  Gehalt im EBC von 5,33 kPa statt, werden weitaus niedrigere pH-Werte gemessen (Kullmann et al., 2007; Czebe et al., 2008; Antus et al., 2010; Hoffmeyer et al., 2015) Wird im Vorfeld der pH-Analyse auf eine Deareation mit Argon verzichtet, werden ebenfalls niedrigere pH-Werte im EBC gemessen, da keine Entfernung von  $\text{CO}_2$  stattfindet (Prieto et al., 2007). Es wird vielfach diskutiert, dass die Durchflutung der EBC-Proben mit dem inerten Argon zu stabilen Messergebnissen bei der pH-Messung führte (Horvath et al., 2005). Dabei beeinflussen sowohl die Zeitdauer der Begasung mit Argon als auch die technische Durchführung der Begasung die Messergebnisse. Lin et al. (2011) verglichen in ihrer Arbeit unter anderem die EBC pH-Werte in Abhängigkeit von der Begasungsmethode. So wurde einmal der Argonstrom mit  $400 \text{ ml min}^{-1}$  auf die Oberfläche der EBC Probe gerichtet, während bei der anderen Begasungsvariante das Gas durch die Lösung geblasen wurde. Die Begasungsdauer betrug 600 Sekunden. Beim Vergleich der beiden Methoden wurden nach 60 Sekunden Begasung signifikant unterschiedliche pH-Werte gemessen. Nach 300 Sekunden zeigten beide Methoden vergleichbare pH-Werte an. In der Zeitspanne von 300 bis 600 Sekunden blieben die pH-Werte bei beiden Methoden stabil. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass sich mit der oberflächlichen Begasung bereits nach 60 Sekunden ein stabiler pH-Wert einstellte, während dies mit der anderen Methode erst nach 300 Sekunden der Fall war. Prieto et al. (2011) verglichen EBC pH-Werte

nach 2 min, 4 min and 8 min Begasung mit Argon. Es konnte gezeigt werden, dass der pH-Wert nach 4 minütiger Begasung signifikant weniger sauer war als nach 2 Minuten. Hingegen veränderte sich der pH-Wert zwischen 4 und 8 Minuten nicht mehr signifikant. Die Arbeitsgruppe postulierte folglich, dass die EBC Proben vier Minuten mit Argon begast werden sollten, um stabile pH-Werte zu erhalten.

## **4.4. Proteinmessungen**

In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Sammelgeräte beim Nachweis verschiedener Biomarker im EBC unterschiedlich effektiv sind (Hoffmeyer et al., 2009a; Rosias et al., 2008; Soyer et al., 2006; Leung et al., 2006; Rosias et al., 2006). Ursächlich können dafür Unterschiede in der Kondensationstemperatur oder in den Oberflächenbeschaffenheiten der Kondensationsflächen sein (Kazani und Israel, 2010). Zudem scheinen auch biochemische Eigenschaften von Biomarkern, z.B. Temperaturempfindlichkeit oder Adsorptionsverhalten, die Nachweisbarkeit im EBC zu beeinflussen (Vyas et al., 2012; Davidsson und Schmekel, 2010). Erkenntnisse über die Vergleichbarkeit von Geräten bei der Analyse von Zielparametern im EBC sind für die Reproduzierbarkeit der Messdaten von großer Bedeutung.

### **4.4.1. Gesamtproteinkonzentration**

#### **4.4.1.1. Gerätevergleich**

Bislang gibt es keine Arbeit, die den RTube™ mit dem ECoScreen Turbo bezüglich der Gesamtproteinkonzentration vergleichend untersucht. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass im Gerätevergleich bei der Gesamtproteinkonzentration nach Ruheatmung kein statistisch signifikan-

ter Unterschied zu beobachten ist. Die in Ruheatmung mit dem RTube™ und ECoScreen Turbo bestimmten Gesamtproteinkonzentrationen liegen im Bereich der für den RTube™ und ECoScreen gemessenen Literaturwerte bei gesunden Nichtrauchern (Czebe et al., 2008; Bloemen et al., 2007; McCafferty et al., 2004; Gessner et al., 2001). Goldoni et al. (2013) ermittelten von 39 gesunden Probanden (Nichtraucher) die Gesamtproteinkonzentration im EBC, nachdem sie 15 Minuten ruhig ein und ausatmeten. Als Sammelgerät wurde der ECoScreen Turbo verwendet. Die dabei gemessenen Konzentrationen lagen bei  $0,7 \text{ mg l}^{-1}$ . Die im Anhang abgebildete Tab. A.6 gibt eine Übersicht über die bislang für unterschiedliche Messapparaturen publizierten Gesamtproteinkonzentrationen. Bei dem untersuchten Kollektiv handelte es sich jeweils um gesunde Nichtraucher. Die Messungen erfolgten bei ruhigem Atemmuster. Insgesamt liegen die Messergebnisse aller Geräte in einer ähnlichen Größenordnung.

#### 4.4.1.2. Atemmanöver

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die Gesamtproteinkonzentration bei forcierter Atmung bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass nach forcierter Atmung eine höhere Gesamtproteinkonzentration im Atemwegskondensat messbar ist. Bei Anwendung des ECoScreen Turbo war nach forcierter Atmung im Vergleich zu ruhiger Atmung eine signifikant höhere Gesamtproteinkonzentration nachweisbar. Das forcierte Atemmanöver konnte beim ECoScreen Turbo anhand eines Atemflussgerätes kontrolliert werden und zeigte ein 1.78fach gesteigertes Ausatemvolumen. Möglicherweise führt forcierter Atmung durch Kompression der Atemwege zu stärkeren Abscherkräften an den Bronchialwänden. Dadurch kann vermehrt Protein vom epithelialen Flüssigkeitsfilm der Bronchialwände abgelöst werden und in die

Ausatemluft gelangen (Almstrand et al., 2010). Folglich kann nach forcierter Atmung eine höhere Proteinkonzentration gemessen werden. Eine weitere Theorie besagt, dass die durch hohe Atemstromgeschwindigkeiten ausgelösten Turbulenzen vor allem im Bereich der proximalen Atemwege die Aerosolentstehung begünstigen (Scheideler et al., 1993). Diese Annahme kann die gemessene höhere Gesamtproteinkonzentration nach forcierter Atmung ebenfalls erklären. Es ist davon auszugehen, dass forcierte Atmung zu einer höheren Atemflussgeschwindigkeit im Atemtrakt führt und damit die Turbulenzen verstärkt. Demzufolge kann mehr Protein von den Bronchialwänden, insbesondere bei den Aufzweigungen der Bronchien, losgelöst werden, in die Ausatemluft gelangen und in einer höheren Konzentration im EBC gemessen werden. Mit dem ECoScreen Turbo konnte nach forcierter Atmung signifikant mehr Protein detektiert werden. Eine mögliche Erklärung hierfür ist der Verdünnungseffekt beim RTube™. Wie bereits beschrieben, wird mit dem RTube™ mehr EBC-Volumen produziert. Bei gleich bleibender Menge respiratorischer Tröpfchen ist eine niedrigere Proteinkonzentration die Folge

## **4.4.2. Spezifische Proteine**

### **4.4.2.1. Club Cell Protein (CCP) und Surfactant Protein A (SP-A)**

Mit der Zielsetzung mehr über den Ursprungsort des EBCs zu erfahren, wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, die Konzentrationen eines alveolären (Surfactant Protein A, SP-A) und bronchialen Markerproteins (Club Cell Protein, CCP) nach ruhiger und forcierter Atmung im EBC zu bestimmen. Hierfür wurden kommerziell erhältliche ELISA Kits verwendet. Weiterhin wurden Western blot Untersuchungen durchgeführt. Es ist allerdings nicht gelungen, das Club Cell Protein und das Surfactant Protein A sowohl nach



ruhigem als auch nach forciertem Atemmuster reproduzierbar im EBC nachzuweisen. Bislang liegt allerdings auch keine Vergleichsarbeit vor, in der der Nachweis von CCP im EBC beschrieben wird. Jüngst versuchten Fernandez-Bustamante et al. (2014) die Konzentration des Club Cell Proteins im EBC bei 28 beatmeten gesunden Probanden nachzuweisen. Die EBC Gewinnung erfolgte für 20 Minuten mittels RTube™. Das Club Cell Protein konnte dabei im EBC nicht nachgewiesen werden. Simpson et al. (2005) konnten SP-A im EBC nachweisen. Jedoch untersuchte diese Arbeitsgruppe ein Kollektiv von Asthmapatienten. Es ist bekannt, dass das Surfactant-Protein A an der Regulation inflammatorischer Prozesse beteiligt ist (Wang und Reid, 2007). Cheng et al. (2000) konnte bei Asthma-Patienten verglichen mit gesunden Probanden höhere SP-A Konzentrationen in einer bronchioalveolären Lavage nachweisen. Folglich ist bei Asthma-Patienten auch eine höhere SP-A Konzentration im EBC zu erwarten. Larsson et al. (2011) bestimmte in seiner Arbeit neben der Albumin-Konzentration ebenfalls die Konzentration von Surfactant-Protein A im EBC gesunder Probanden nach Ruheatmung. Dazu wurde ein hauseigener ELISA verwendet. Insgesamt konnte lediglich in vier von 9 Proben SP-A nachgewiesen werden. Bei fehlender Referenzkonzentration wurden aber keine genauen SP-A Konzentrationen im EBC angegeben. Kürzlich publizierten Lin et al. (2016) den Nachweis von SP-A im EBC bei stabilen COPD Patienten und Nicht-COPD-Patienten. Hierfür wurde ein kommerziell erhältliches ELISA Kit verwendet. Allerdings sind die Daten kritisch anzusehen, da die veröffentlichten SP-A Konzentrationen (COPD Patienten:  $(4,165 \pm 2,950) \text{ pg ml}^{-1}$ ; Nicht-COPD Patienten:  $(7,706 \pm 3,923) \text{ pg ml}^{-1}$ ) außerhalb des von dem Hersteller des verwendeten ELISA Kits (Cloud-Clone Corp, Houston, TX, USA) angegebenen Detektionsbereichs ( $46,88 \text{ pg ml}^{-1}$  bis  $3000 \text{ pg ml}^{-1}$ ) liegen. Griese et al. (2002) nahmen in einer ihrer Arbeiten eine Proteinanalyse im EBC gesunder Pro-

banden mittels 2-DE Gelelektrophorese vor. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass die Größenordnungen relativ lungenspezifischer Proteine, wie z.B. Surfactant Protein-A oder Surfactant Protein-D nur sporadisch vertreten waren. Allerdings gaben sie auch zu bedenken, dass in 1 ml bronchoalveoläre Lavage 200 µg Protein enthalten ist und davon ca. 1 µg auf SP-A entfällt. Bei einer anzunehmenden 2000-10000fachen Verdünnung des epithelialen Flüssigkeitsfilm im EBC ist daher die erschwerte Detektion von SP-A im EBC anzunehmen.

#### **4.4.2.2. Alpha-1-Antitrypsin**

Ergänzend wurde in dieser Arbeit Alpha-1-Antitrypsin (AAT) im EBC gemessen. AAT konnte dabei reproduzierbar sowohl bei Anwendung des RTube™ als auch bei Anwendung des ECoScreen Turbo nachgewiesen werden. Koczulla et al. (2012) gelang es erstmals AAT im EBC nachzuweisen. In ihrer Arbeit untersuchten sie gesunde Probanden sowie Patienten mit stabiler und exazerbierter COPD. Zur Gewinnung des Atemwegkondensats atmeten die Probanden ruhig für insgesamt 10 Minuten. Als Sammelgerät wurde in dieser Studie der RTube™ verwendet. Die dabei für gesunde Probanden gemessenen mittleren AAT Konzentrationen lagen bei 251,32 pg ml<sup>-1</sup>. In der vorliegenden Arbeit lagen die bei Verwendung des RTube™ gemessenen AAT Konzentrationen in einem vergleichbaren Wertebereich (im Mittel 248,5 pg ml<sup>-1</sup>). Für den ECoScreen Turbo gibt es bislang keine Vergleichsdaten. Wie auch schon bei der Messung der Gesamtproteinkonzentration konnte gezeigt werden, dass durch forcierte Atmung eine höhere AAT Konzentration im EBC messbar ist. Bislang gibt es keine Vergleichsarbeiten bezüglich der AAT-Konzentration im EBC nach Hyperventilation. Fabian et al. (2011) untersuchten in ihrer Arbeit den Zusammenhang zwischen unter-

schiedlichen Atemmustern und der Anzahl der ausgeatmeten Partikel. Die Messungen wurden bei ruhiger und oberflächlicher Atmung, maximaler Einatmung, maximaler Ausatmung und rascher Ausatmung durchgeführt. Die Auswirkungen von Husten wurden ebenfalls untersucht. Nach maximaler Ausatmung wurde hierbei die höchste Partikelkonzentration gemessen. Dieses Ergebnis unterstützt die Beobachtung, dass durch forcierte Atmung eine höhere Gesamtproteinkonzentration, respektive eine höhere AAT-Konzentration im EBC messbar werden. Neuere Arbeiten weisen darauf hin, dass die Entstehung von EBC auf die Öffnung kollabierter Atemwege insbesondere im unteren Atemtrakt zurückzuführen ist (Johnson und Morawska, 2009; Almstrand et al., 2010; Schwarz et al., 2010). Johnson und Morawska (2009) brachten die Entstehung von Aerosolen erstmals mit dem Atemzyklus in Zusammenhang. Das „BFFB Modell“ (bronchiole fluid film burst) besagt, dass die Aerosolentstehung bei der Wiedereröffnung der Atemwege während der Inspiration stattfindet. Während der Ausatmung kommt es zu einem Verschluss der Atemwege. Infolgedessen bildet der epitheliale Flüssigkeitsfilm einen Meniskus innerhalb der Atemwege. Bei der Wiedereröffnung der Atemwege während der Inspiration bricht der Meniskus auf und Aerosole entstehen. Dieser Prozess soll vor allem im Bereich der terminalen Bronchiolen und Alveolen stattfinden (Almstrand et al., 2010). Bondesson et al. (2009) wiesen anhand ihrer Untersuchungen mit Technetium 99-m daraufhin, dass das EBC allerdings nur teilweise den epithelialen Flüssigkeitsfilm abbilden würde. Nachdem es nicht gelungen ist, CCP als bronchiales und SP-A als alveoläres Markerprotein reproduzierbar im EBC nachzuweisen, bleibt die Antwort auf die Frage nach dem genauen Ursprungsort des EBCs weiterhin offen.

#### **4.4.3. Methodischer Aspekt - Beschichtung der Sammelsysteme**

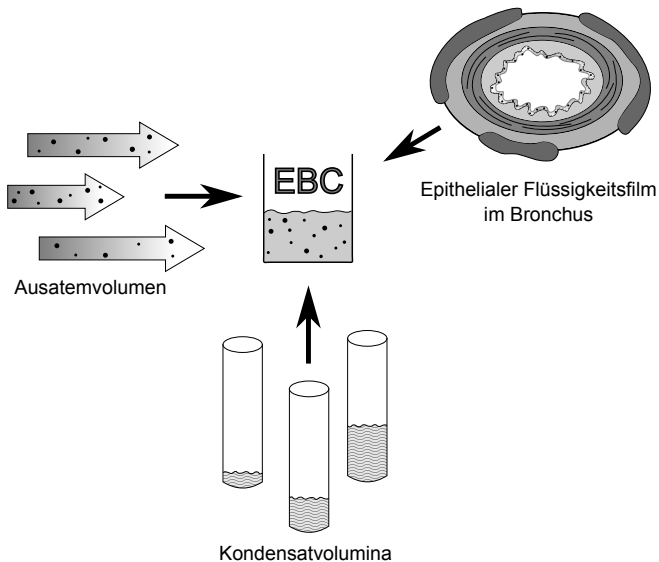
In der vorliegenden Arbeit wurde mit der Beschichtung der Sammelsysteme ein weiterer methodischer Aspekt untersucht. Tufvesson und Bjermer (2006) zeigten in ihrer Arbeit, dass sich durch die Beschichtung der Sammelsysteme die Detektion von Cytokinen und Eicosanoiden im EBC verbessern lässt. Die Sammelsysteme wurden dabei entweder mit Rinderalbumin (bovine serum albumine, BSA) oder 0,01 % Tween 20 für jeweils 30 Minuten beschichtet. Als Sammelgerät wurde der ECoScreen verwendet. Tufvesson und Bjermer (2006) konnten zeigen, dass durch die Beschichtung mit Tween 20 die Adsorption von Fettsäurederivaten - wie es Leukotriene und Prostaglandine sind- an den Sammelsystemen verringert werden kann und somit höhere Konzentrationen im EBC gemessen werden. Um die Adsorption von Cytokinen an den Sammelsystemen zu verringern, empfahlen sie aufgrund ihrer Messergebnisse die Beschichtung mit BSA. In der vorliegenden Arbeit sollte nun auch der Effekt der Beschichtung des Sammelsystems des ECoScreen Turbo auf die Messung der AAT Konzentration im EBC untersucht werden. Hierfür wurden die Sammelsysteme des ECoScreen Turbo mit 1 % BSA in PBS bei einer Temperatur von 4 °C über Nacht beschichtet. Es konnte gezeigt werden, dass bei Verwendung der beschichteten Sammelsysteme eine signifikant höhere AAT Konzentration im EBC messbar war, als bei Verwendung unbeschichteter Sammelsysteme. Die unter Ruhebedingungen im EBC gemessenen AAT Konzentrationen bei Verwendung beschichteter ECoScreen Turbo Sammelsystem waren um den Faktor 3,6, die unter forcierter Atmung gemessenen AAT Konzentrationen um den Faktor 1,79 erhöht. Allerdings ist die Methode der Beschichtung von Sammelsystemen nur begrenzt anwendbar. Insbesondere bei massenspektrometri-

schen Verfahren, wie z.B. der sehr sensitiven Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC-MS) können Probleme auftreten (Rosias, 2012; Bloemen et al., 2007). Diese bestehen aus einem Trennungs- und einem Analyseschritt. Erfolgt die Trennung nach der „trap-and-elute“-Technik, werden spezielle Trennsäulen verwendet, in denen Proteine aus der Probe zuerst gebunden („trap“) und anschließend gezielt freigesetzt („elute“) werden. Die Gesamtkapazität einer solchen Säule ist allerdings begrenzt und kann durch das zugegebene BSA überschritten werden. Dadurch kann die die Konzentration des nachzuweisenden Proteins unter der Nachweisgrenze liegen, obwohl es eigentlich in höherer Konzentration vorliegt (Kovalchuk et al., 2015). Auch bei der MALDI-TOF Methode (Matrix-Assistierte Laser-Desorption-Ionisierung kombiniert mit der Flugzeitanalyse) kann eine Beschichtung mit BSA den Nachweis von chemischen Verbindungen beeinträchtigen. So ist bekannt, dass BSA die Ionisierung von Proteinen stören kann (Kovalchuk et al., 2015; Bloemen et al., 2009).

## 4.5. Standardisierung der Proteinkonzentrationen im EBC

In der Zusammenschau der erhobenen Ergebnisse kann die Konzentration eines Biomarkers im EBC durch das Zusammenspiel unterschiedlicher Faktoren beeinflusst werden (siehe Abb. 4.1). Entscheidend ist dabei die Konzentration der Substanz im epithelialen Flüssigkeitsfilm, die Anzahl respiratorischer Tröpfchen in der Ausatemluft und schließlich deren Verdünnungsgrad im Atemwegskondensat (Effros et al., 2004). Weiterhin scheint das insgesamt ausgeatmete Volumen eine relevante Variable zu sein. Es könnte ein linearer Zusammenhang zwischen gewonnenem EBC-Volumen pro Minute und

ventiliertem Volumen gezeigt werden (Gessner et al., 2001; McCafferty et al., 2004). Bei einer konstanten Messdauer ist das ventilierte Volumen aufgrund individuell unterschiedlicher Atemfrequenzen und Atemminutenvolumina jedoch Schwankungen unterworfen (Reinhold und Knobloch, 2009). Darüber hinaus können unterschiedliche Atemmanöver unterschiedliche Flussprofile und Turbulenzen innerhalb der Atemwege begünstigen und somit die Konzentration respiratorischer Tröpfchen in der Ausatemluft und konsekutiv im EBC verändern (Reinhold et al., 2006). In den meisten Arbeiten



**Abbildung 4.1.:** Unterschiedliche Faktoren beeinflussen die gemessene Konzentration nichtvolatiler Substanzen im EBC.

fehlen jedoch Angaben bezogen auf das Ventilationsvolumen. Die Abhän-

gigkeit der Proteinkonzentration im EBC sowohl vom Kondensat- als auch vom Ventilationsvolumen wird also nicht berücksichtigt. Dabei ist aber zu bedenken, dass ein unterschiedlicher Verdünnungsgrad im EBC trotz gleicher Aerosolkonzentration in der Ausatemluft zu variablen Konzentrationen im EBC führen kann (Reinhold und Knobloch, 2009). Um dies zu vermeiden sind Normierungsverfahren notwendig. In der vorliegenden Arbeit wurden die Proteinkonzentrationen bezüglich des ventilierten Volumens normiert. Dabei kam es teils zu Änderungen der Ergebnisse. In der Literatur findet sich diesbezüglich ein ähnliches Beispiel. Reinhold et al. (2006) konnte in einer veterinärmedizinischen Arbeit bei Kälbern und Schweinen einen signifikanten Anstieg der Gesamtproteinkonzentration pro Milliliter EBC bei maximalem Ausatemstrom und maximalem Ausatemvolumen pro Minute feststellen. Nach Normierung der Gesamtproteinmenge bezüglich des Ausatemvolumens ( $\mu\text{g}/100\text{l}$ ) konnte dieser Effekt nicht mehr abgebildet werden. Die dargestellten Daten verdeutlichen die Komplexität der Konzentrationsmessungen von Biomolekülen im EBC. Aus diesem Grund erscheint es besonders sinnvoll, in zukünftigen Projekten entweder das ventilierte Atemvolumen anzugeben oder bei Messungen ein standardisiert limitiertes Atemvolumen einzuhalten. Zu empfehlen wäre ein standardisiertes Atemvolumen, um diesen dritten Faktor (neben Protein und Flüssigkeit) konstant zu halten.

## 4.6. Kritische Anmerkungen bezüglich der Studie

Die Studie wurde als Pilotprojekt konzipiert und durchgeführt. Für die Untersuchungen wurden ausschließlich gesunde Probanden rekrutiert. Bei einem Durchschnittsalter von 25,56 Jahren handelt es sich um ein junges Kol-

lektiv, was die Varianz in der Bevölkerung nicht adäquat abbildet. Patienten mit einer obstruktiven Lungenerkrankung wurden in die Studie nicht eingeschlossen. Die Ergebnisse dieser Arbeit können deshalb nicht auf ein erkranktes Patientenkollektiv übertragen werden. Weitere Studien sind notwendig, um dies zu prüfen. Da für den RTube™ kein kommerzielles Spirometer erhältlich ist, konnte das expiratorische Volumen lediglich für den ECoScreen Turbo angegeben werden. Kritisch zu bedenken ist auch, dass es sich bei dem Projekt um eine reine Querschnittsstudie handelt. Somit kann eine Änderung der Ergebnisse im zeitlichen Verlauf nicht abgebildet werden. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass es sich bei der Analyse des pH-Wertes und der Leitfähigkeit im Atemwegskondensat um eine einfach durchführbare, nichtinvasive und kostengünstige Methode handelt. Die genannten diagnostischen Parameter zeichnen sich unabhängig von Atemmuster oder EBC-Sammelgerät durch stabile Messergebnisse aus. Darum eignet sich die Bestimmung von pH und Leitfähigkeit im EBC gut für individuelle Verlaufskontrolluntersuchungen im Rahmen von Longitudinalstudien.

Hinsichtlich der Proteinanalyse im Atemwegskondensat bleiben nach wie vor viele Fragen ungeklärt. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Ergebnisse der Proteinmessung abhängig vom gewählten Auswertungsverfahren unterschiedlich darstellen. Da die im EBC messbaren Proteinkonzentrationen sowohl vom Kondensatvolumen als auch vom ventilierten Volumen bestimmt werden, ist für zukünftige Forschungsprojekte eine Standardisierung des ventilierten Volumens ratsam (z.B. 100 l). Dadurch könnte auch eine bessere Vergleichbarkeit von Forschungsarbeiten ermöglicht werden. Trotz alledem müssen dabei individuelle Funktionsparameter wie z.B. Atemfrequenz oder Atemzugvolumen als wichtige Einflussgrößen berücksichtigt werden.

Mangels hinreichender Standardisierung wird die Gewinnung und Ana-



lyse von EBC bis heute nicht in der klinischen Routinediagnostik eingesetzt. Die Ergebnisse dieser Arbeit haben dazu beigetragen neue Erkenntnisse über die Gewinnung von Atemwegskondensat abzuleiten. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen außerdem, dass die unspezifischen Entzündungsparameter pH und Leitfähigkeit durch ein unterschiedliches Atemmanöver nicht verändert werden. Für die Proteinmessungen konnte allerdings gezeigt werden, dass diese durchaus durch unterschiedliche Atemmanöver beeinflusst werden. Für die Geräte RTube™ und ECoScreen Turbo steht nun fest, dass sie für die Analyse von pH-Wert, Leitfähigkeit und Messung der Gesamtproteinkonzentration gleichwertig angewendet werden können. Basierend auf dem aktuellen Wissensstand sollte bei Proteinbestimmungen im EBC berücksichtigt werden, dass die Ergebnisse stark von der verwendeten Analyseverfahren abhängig sind. Unter diesem Aspekt ist die Vergleichbarkeit von Messergebnissen bei der Proteinanalyse kritisch zu bewerten. Da es nicht gelungen ist, das alveoläre Markerprotein Surfactant Protein A und das im Bronchialsystem vorkommende Club Cell Protein im EBC nachzuweisen, kann die Frage nach dem Ursprungsort des EBC aktuell nicht beantwortet werden. Die Einfachheit und Nichtinvasivität zeichnen das EBC Verfahren aus. Damit bleibt es ein interessanter Ansatz, Informationen über den epithelialen Flüssigkeitsfilm der Lunge zu generieren. Ob es tatsächlich irgendwann ein klinisches Routineverfahren werden wird, ist zum aktuellen Zeitpunkt mit den vorliegenden Daten nicht hinreichend zu beantworten. Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten dürften allerdings in der Bewertung des Verfahrens von immenser Wichtigkeit sein.



## 5. Zusammenfassung

Die Gewinnung von Atemwegskondensat (Exhaled Breath Condensate, EBC) ist eine viel versprechende Methode, um nichtinvasiv Zugang zum epithelialen Flüssigkeitsfilm der Atemwege zu erlangen. Mangels hinreichender Standardisierung hinsichtlich methodischer Aspekte bleibt die EBC Gewinnung bislang allerdings wissenschaftlichen Fragestellungen vorbehalten ist und wird nicht in der klinischen Routinediagnostik eingesetzt. In der vorliegenden Arbeit wurde bei gesunden Probanden erstmals die Vergleichbarkeit der gängigen kommerziell erhältlichen Geräte RTube™ und ECoScreen Turbo anhand der EBC Zielparameter pH, Leitfähigkeit und Gesamtproteinkonzentration überprüft. Weiterhin wurde in dieser Arbeit der Einfluss unterschiedlicher Atemmanöver (Ruheatmung und forcierte Atmung) auf die Proteinmessung untersucht. Zusätzlich zur Gesamtproteinkonzentration wurden hierfür als spezifische Proteine das Surfactant Protein-A, das Club Cell Protein sowie das Alpha-1-Antitrypsin im EBC gemessen. Die Studie umfasste fünf Versuchsreihen, in denen jeweils von 10-12 gesunden Probanden EBC gesammelt wurde. Die Probanden atmeten im „Cross-over“ Design jeweils zehn Minuten über den RTube™ und ECoScreen Turbo. Pro Gerät wurde diese Messung in Ruheatmung und Hyperventilation durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die beiden kommerziell erwerblichen Geräte RTube™ und ECoScreen Turbo für die Analyse von pH und Leitfähigkeit im EBC gleichwertig angewendet werden können. Bezüglich der gemessenen Ge-

samtproteinkonzentrationen fand sich beim Gerätevergleich ebenfalls kein statistisch signifikanter Unterschied. Unterschiedliche Atemmanöver beeinflussen allerdings die Gesamtproteinkonzentration im EBC. So konnte gezeigt werden, dass forcierte Atmung zu höheren Gesamtproteinkonzentrationen im EBC führt. Mit der Zielsetzung, mehr über den Ursprungsort des EBCs zu erfahren, wurden in der vorliegenden Arbeit die Konzentrationen eines alveolären (Surfactant Protein A, SP-A) und bronchialen Markerproteins (Club Cell Protein, CCP) nach ruhiger und forcierter Atmung im EBC bestimmt. Da es nicht gelungen ist, sowohl das Club Cell Protein als auch das Surfactant Protein A reproduzierbar im EBC nachzuweisen, kann die Frage nach dem Ursprungsort des EBC aktuell nicht beantwortet werden. Ergänzend wurde in der vorliegenden Arbeit Alpha-1-Antitrypsin im EBC gemessen. Die Messungen wurden mit beiden Gerätschaften durchgeführt. Für den ECoScreen Turbo gibt es bislang keine Vergleichsdaten. Es konnte gezeigt werden, dass sich die mit beiden Geräten gemessenen AAT-Konzentrationen bei Ruheatmung im EBC nicht statistisch signifikant unterscheiden. Betrachtet man die unterschiedlichen Atemmanöver, so fanden sich nach forcierter Atmung höhere AAT Konzentrationen im EBC als nach ruhiger Atmung. Bislang gibt es keine Vergleichsarbeiten, die die AAT-Konzentration im EBC nach Hyperventilation untersuchte. Eine letzte wichtige Beobachtung dieser Arbeit betrifft die Standardisierung der Proteinanalyse im EBC. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Ergebnisse der Proteinmessung bei einer Normalisierung bezüglich des ventilierten Volumens teilweise verändern. Für zukünftige Forschungsprojekte ist deshalb eine Standardisierung des ventilierten Volumens dringend zu empfehlen.

## 6. Abstract

EBC collection (Exhaled breath condensate) is a promising non-invasive method to obtain samples from the epithelial lining fluid of the lung. Due to problems of standardization concerning methodical aspects EBC analysis is presently not used in clinical practice. For the first time the comparability for the two commercially available devices (RTube™ and ECoScreen Turbo) was assessed in healthy controls by measuring pH, conductivity and total protein. A further aim of the study was to assess the influence of different breathing patterns (tidal breathing and hyperventilation) on total protein amount and specific proteins (Surfactant Protein-A, Club Cell Protein, Alpha-1-Antitrypsin) in EBC. EBC was collected in different experimental setup ( $\geq 10$  individuals each) using the RTube™ and ECoScreen Turbo in a randomized crossover design, twice with every device - once in tidal breathing and once in hyperventilation. It could be shown that neither the device nor the breathing pattern significantly altered EBC pH or conductivity. Total protein measurements however were altered by breathing patterns. It could be shown that hyperventilation increased total protein concentrations in EBC. To analyse the source of EBC the bronchial Club Cell Protein (CCP) and Surfactant protein A (SP-A) as a marker of the alveolar fraction were measured after tidal and breathing and hyperventilation. However SP-A and CCP were not consistently detectable in EBC. Thus the question concerning the origin of EBC cannot be answered satisfying at the moment. Alpha-1

Antitrypsin (AAT) was consistently detectable in EBC using both the RTube™ and the ECoScreen Turbo. It was the first time that AAT was measured in EBC collected with den ECoScreen Turbo. It could be shown that AAT concentration was not statistic significantly altered by the device. Instead hyperventilation increased –similar to the measurements of total protein-AAT concentration in EBC. Up to now there is no research work that would have investigated AAT concentration in EBC after hyperventilation. Finally it could be shown that results of protein measurements changed significantly after normalizing the absolute amount or concentrations of total protein and AAT to ventilated air. Therefore standardization to the ventilated air is recommended for future protein analysis in EBC.

## 7. Literaturverzeichnis

- Almstrand, A. C., Bake, B., Ljungstrom, E., Larsson, P., Bredberg, A., Mirgorodskaya, E., und Olin, A. C. „Effect of airway opening on production of exhaled particles“. *J Appl Physiol*, 108(3), 584–8, **2010**.
- Anglim, P. P., Alonzo, T. A., und Laird-Offringa, I. A. „DNA methylation-based biomarkers for early detection of non-small cell lung cancer: An update“. *Mol Cancer*, 7, 81, **2008**.
- Antus, B., Barta, I., Kullmann, T., Lazar, Z., Valyon, M., Horvath, I., und Csiszer, E. „Assessment of Exhaled Breath Condensate pH in Exacerbations of Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease“. *Am J Respir Crit Care Med*, 182(12), 1492–1497, **2010**. ISSN 1073-449X. doi: 10.1164/rccm.201003-0451OC.
- Bach, J.-P., Gold, M., Mengel, D., Hattesoehl, A., Lubbe, D., Schmid, S., Tackenberg, B., Rieke, J., Maddula, S., Baumbach, J. I., Nell, C., Boeselt, T., Michelis, J., Alferink, J., Heneka, M., Oertel, W., Jessen, F., Janciauskiene, S., Vogelmeier, C., Dodel, R., und Koczulla, A. R. „Measuring Compounds in Exhaled Air to Detect Alzheimer’s Disease and Parkinson’s Disease“. *PLOS ONE*, 10(7), e0132227, **2015**. ISSN 1932-6203. doi: 10.1371/journal.pone.0132227.
- Baraldi, E., Ghironi, L., Piovan, V., Carraro, S., Ciabattini, G., Barnes, P. J., und

- Montuschi, P. „Increased exhaled 8-isoprostane in childhood asthma“. *Chest*, 124(1), 25–31, **2003**.
- Barnes, P. J. „Club Cells, Their Secretory Protein, and COPD“. *Chest*, 147(6), 1447–1448, **2015**. ISSN 0012-3692. doi:10.1378/chest.14-3171.
- Betsuyaku, T., Kuroki, Y., Nagai, K., Nasuhara, Y., und Nishimura, M. „Effects of ageing and smoking on SP-A and SP-D levels in bronchoalveolar lavage fluid“. *Eur Respir J*, 24(6), 964–70, **2004**.
- Biedermann, A. und Köhnlein, T. „Alpha-1-Antitrypsin-Mangel - eine versteckte Ursache der COPD: Überblick über Pathogenese, Diagnostik, Klinik und Therapie“. *Dtsch Arztebl International*, 103(26), A–1828–, **2006**.
- Bikov, A., Galffy, G., Tamasi, L., Bartusek, D., Antus, B., Losonczy, G., und Horvath, I. „Exhaled breath condensate pH decreases during exercise-induced bronchoconstriction“. *Respirology*, 19(4), 563–569, **2014**. ISSN 1440-1843. doi:10.1111/resp.12248.
- Bikov, A., Galffy, G., Tamasi, L., Lazar, Z., Losonczy, G., und Horvath, I. „Exhaled breath condensate pH is influenced by respiratory droplet dilution“. *J. Breath Res.*, 6(4), 046002, **2012**. ISSN 1752-7163. doi:10.1088/1752-7155/6/4/046002.
- Bloemen, K., Hooyberghs, J., Desager, K., Witters, E., und Schoeters, G. „Non-invasive biomarker sampling and analysis of the exhaled breath proteome“. *Prot. Clin. Appl.*, 3(4), 498–504, **2009**. ISSN 1862-8354. doi:10.1002/prca.200800095.
- Bloemen, K., Lissens, G., Desager, K., und Schoeters, G. „Determinants of variability of protein content, volume and pH of exhaled breath condensate“. *Respir Med*, 101, 1331–7, **2007**.



- Bondesson, E., Jansson, L. T., Bengtsson, T., und Wollmer, P. „Exhaled breath condensate-site and mechanisms of formation“. *J Breath Res*, 3, 016005, **2009**.
- Borrill, Z. L., Roy, K., und Singh, D. „Exhaled breath condensate biomarkers in COPD“. *Eur Respir J*, 32(2), 472–86, **2008**.
- Buszewski, B., Kesy, M., Ligor, T., und Amann, A. „Human exhaled air analytics: Biomarkers of diseases“. *Biomed Chromatogr*, 21(6), 553–66, **2007**.
- Calušić, A. L., Varnai, V. M., und Macan, J. „Acute effects of smoking and food consumption on breath condensate pH in healthy adults“. *Exp Lung Res*, 37(2), 92–100, **2011**.
- Carpagnano, G. E., Barnes, P. J., Francis, J., Wilson, N., Bush, A., und Kharitonov, S. A. „Breath condensate pH in children with cystic fibrosis and asthma: A new noninvasive marker of airway inflammation?“ *Chest*, 125(6), 2005–10, **2004**.
- Carpagnano, G. E., Koutelou, A., Natalicchio, M. I., Martinelli, D., Ruggieri, C., Di Taranto, A., Antonetti, R., Carpagnano, F., und Foschino-Barbaro, M. P. „HPV in exhaled breath condensate of lung cancer patients“. *Br J Cancer*, 105(8), 1183–1190, **2011**. ISSN 0007-0920. doi:10.1038/bjc.2011.354.
- Cepelak, I. und Dodig, S. „Exhaled breath condensate: A new method for lung disease diagnosis“. *Clin Chem Lab Med*, 45(8), 945–52, **2007**.
- Chen, J.-L., Chen, J.-R., Huang, F.-F., Tao, G.-H., Zhou, F., und Tao, Y.-J. „Analysis of p16 gene mutations and their expression using exhaled breath condensate in non-small-cell lung cancer“. *Oncology Letters*, 10(3), 1477–1480, **2015**. ISSN 1792-1074.

- Cheng, G., Ueda, T., Numao, T., Kuroki, Y., Nakajima, H., Fukushima, Y., Motojima, S., und Fukuda, T. „Increased levels of surfactant protein A and D in bronchoalveolar lavage fluids in patients with bronchial asthma“. *Eur Respir J*, 16(5), 831–5, **2000**.
- Corradi, M., Gergelova, P., und Mutti, A. „Use of exhaled breath condensate to investigate occupational lung diseases“. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 10(2), 93–8, **2010**.
- Curiel, D. T., Vogelmeier, C., Hubbard, R. C., Stier, L. E., und Crystal, R. G. „Molecular basis of alpha 1-antitrypsin deficiency and emphysema associated with the alpha 1-antitrypsin Mmineral springs allele.“ *Mol. Cell. Biol.*, 10(1), 47–56, **1990**. ISSN 0270-7306, 1098-5549. doi:10.1128/MCB.10.1.47.
- Czebe, K., Barta, I., Antus, B., Valyon, M., Horvath, I., und Kullmann, T. „Influence of condensing equipment and temperature on exhaled breath condensate pH, total protein and leukotriene concentrations“. *Respir Med*, 102, 720–5, **2008**.
- Davidsson, A. und Schmekel, B. „Efficacy of two breath condensers“. *J Clin Lab Anal*, 24(4), 219–23, **2010**.
- Davis, M. D., Montpetit, A., und Hunt, J. „Exhaled Breath Condensate: An Overview“. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 32(3), 363–375, **2012**. ISSN 0889-8561. doi:10.1016/j.iac.2012.06.014.
- Debley, J. S., Ohanian, A. S., Spiekerman, C. F., Aitken, M. L., und Hallstrand, T. S. „Effects of bronchoconstriction, minute ventilation, and deep inspiration on the composition of exhaled breath condensate“. *Chest*, 139, 16–22, **2011**.

- Dodig, S. und Čepelak, I. „Exhaled breath condensate – from an analytical point of view“. *Biochemia Medica*, S. 281–295, **2013**. ISSN 18467482. doi: 10.11613/BM.2013.034.
- Dodig, S., Richter, D., und Zrinski-Topic, R. „Review: Inflammatory markers in childhood asthma“. *Clin Chem Lab Med*, **2011**.
- Dressel, H., Muller, F., Fischer, R., Rommelt, H., Hohlfeld, J. M., Behr, J., Huber, R. M., Nowak, D., und Jorres, R. A. „Independent Information of Non-specific Biomarkers in Exhaled Breath Condensate“. *Respiration*, **2010**.
- Dwyer, T. M. „Sampling airway surface liquid: Non-volatiles in the exhaled breath condensate“. *Lung*, 182(4), 241–50, **2004**.
- Effros, R. M., Biller, J., Foss, B., Hoagland, K., Dunning, M. B., Castillo, D., Bosbous, M., Sun, F., und Shaker, R. „A simple method for estimating respiratory solute dilution in exhaled breath condensates“. *Am J Respir Crit Care Med*, 168, 1500–5, **2003**.
- Effros, R. M., Casaburi, R., Su, J., Dunning, M., Torday, J., Biller, J., und Shaker, R. „The effects of volatile salivary acids and bases on exhaled breath condensate pH“. *Am J Respir Crit Care Med*, 173, 386–92, **2006**.
- Effros, R. M., Dunning, r., M. B., Biller, J., und Shaker, R. „The promise and perils of exhaled breath condensates“. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 287(6), L1073–80, **2004**.
- Effros, R. M., Hoagland, K. W., Bosbous, M., Castillo, D., Foss, B., Dunning, M., Gare, M., Lin, W., und Sun, F. „Dilution of respiratory solutes in exhaled condensates“. *Am J Respir Crit Care Med*, 165(5), 663–9, **2002**.

- Effros, R. M., Peterson, B., Casaburi, R., Su, J., Dunning, M., Torday, J., Biller, J., und Shaker, R. „Epithelial lining fluid solute concentrations in chronic obstructive lung disease patients and normal subjects“. *J Appl Physiol*, 99, 1286–92, **2005**.
- Emmanouil, P., Loukides, S., Kostikas, K., Papatheodorou, G., Papaporfyriou, A., Hillas, G., Vamvakaris, I., Triggidou, R., Katafigiotis, P., Kokkini, A., Papiris, S., Koulouris, N., und Bakakos, P. „Sputum and BAL Clara cell secretory protein and surfactant protein D levels in asthma“. *Allergy*, 70(6), 711–714, **2015**. ISSN 1398-9995. doi:10.1111/all.12603.
- Fabian, P., Brain, J., Houseman, E. A., Gern, J., und Milton, D. K. „Origin of Exhaled Breath Particles from Healthy and Human Rhinovirus-Infected Subjects“. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv*, **2011**.
- Fairchild, C. I. und Stampfer, J. F. „Particle concentration in exhaled breath“. *Am Ind Hyg Assoc J*, 48(11), 948–9, **1987**.
- Fernandez-Bustamante, A., Klawitter, J., Repine, J. E., Agazio, A., Janocha, A. J., Shah, C., Moss, M., Douglas, I. S., Tran, Z. V., Erzurum, S. C., Christians, U., und Seres, T. „Early Effect of Tidal Volume on Lung Injury Biomarkers in Surgical Patients with Healthy Lungs“. *Anesthesiology*, 121(3), 469–481, **2014**. ISSN 0003-3022. doi:10.1097/ALN.0000000000000301.
- Ferrazzoni, S., Scarpa, M. C., Guarnieri, G., Corradi, M., Mutti, A., und Maestrelli, P. „Exhaled nitric oxide and breath condensate pH in asthmatic reactions induced by isocyanates“. *Chest*, 136(1), 155–62, **2009**.
- Fitzpatrick, A. M., Holbrook, J. T., Wei, C. Y., Brown, M. S., Wise, R. A., und Teague, W. G. „Exhaled Breath Condensate pH Does Not Discriminate Asymptomatic Gastroesophageal Reflux or the Response to Lansoprazole

- Treatment in Children with Poorly Controlled Asthma“. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*, 2(5), 579–586.e7, **2014**. ISSN 2213-2198. doi:10.1016/j.jaip.2014.04.006.
- Floros, J. und Karinch, A. M. „Human SP-A: Then and now“. *Am J Physiol*, 268(2 Pt 1), L162–5, **1995**.
- Foster, M. W., Thompson, J. W., Ledford, J. G., Dubois, L. G., Hollingsworth, J. W., Francisco, D., Tanyaratrisakul, S., Voelker, D. R., Kraft, M., Moseley, M. A., und Foster, W. M. „Identification and Quantitation of Coding Variants and Isoforms of Pulmonary Surfactant Protein A“. *J. Proteome Res.*, 13(8), 3722–3732, **2014**. ISSN 1535-3893. doi:10.1021/pr500307f.
- Fregonese, L. und Stolk, J. „Hereditary alpha-1-antitrypsin deficiency and its clinical consequences“. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 3, 16, **2008**. ISSN 1750-1172. doi:10.1186/1750-1172-3-16.
- Fumagalli, M., Ferrari, F., Luisetti, M., Stolk, J., Hiemstra, P. S., Capuano, D., Viglio, S., Fregonese, L., Cerveri, I., Corana, F., Tinelli, C., und Iadarola, P. „Profiling the Proteome of Exhaled Breath Condensate in Healthy Smokers and COPD Patients by LC-MS/MS“. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(11), 13894–13910, **2012**. doi:10.3390/ijms131113894.
- Gaber, F., Acevedo, F., Delin, I., Sundblad, B. M., Palmberg, L., Larsson, K., Kumlin, M., und Dahlen, S. E. „Saliva is one likely source of leukotriene B4 in exhaled breath condensate“. *Eur Respir J*, 28(6), 1229–35, **2006**.
- Gadek, J. E., Fells, G. A., Zimmerman, R. L., Rennard, S. I., und Crystal, R. G. „Antielastases of the human alveolar structures. Implications for the protease-antiprotease theory of emphysema“. *J. Clin. Invest.*, 68(4), 889–898, **1981**. ISSN 0021-9738.

- Gajdocsi, R., Bikov, A., Antus, B., Horvath, I., Barnes, P. J., und Kharitonov, S. A. „Assessment of reproducibility of exhaled hydrogen peroxide concentration and the effect of breathing pattern in healthy subjects“. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv*, 24(6), 271–5, **2011**.
- Garey, K. W., Neuhauser, M. M., Robbins, R. A., Danziger, L. H., und Rubinstein, I. „Markers of inflammation in exhaled breath condensate of young healthy smokers“. *Chest*, 125(1), 22–6, **2004**.
- Gessner, C., Dihazi, H., Brettschneider, S., Hammerschmidt, S., Kuhn, H., Eschrich, K., Keller, T., Engelmann, L., Sack, U., und Wirtz, H. „Presence of cytokeratins in exhaled breath condensate of mechanical ventilated patients“. *Respiratory Medicine*, 102(2), 299–306, **2008**. ISSN 0954-6111, 1744-9049. doi:10.1016/j.rmed.2007.08.012.
- Gessner, C., Kuhn, H., Seyfarth, H. J., Pankau, H., Winkler, J., Schauer, J., und Wirtz, H. „Factors influencing breath condensate volume“. *Pneumologie*, 55(9), 414–9, **2001**.
- Goldoni, M., Caglieri, A., Andreoli, R., Poli, D., Manini, P., Vettori, M. V., Corradi, M., und Mutti, A. „Influence of condensation temperature on selected exhaled breath parameters“. *BMC Pulm Med*, 5, 10, **2005**.
- Goldoni, M., Corradi, M., Mozzoni, P., Folesani, G., Alinovi, R., Silvana Pinnelli, Andreoli, R., Pignini, D., Tillo, R., Filetti, A., Garavelli, C., und Antonio Mutti. „Concentration of exhaled breath condensate biomarkers after fractionated collection based on exhaled CO<sub>2</sub> signal“. *J. Breath Res.*, 7(1), 017101, **2013**. ISSN 1752-7163. doi:10.1088/1752-7155/7/1/017101.
- Goto, H., Mitsuhashi, A., und Nishioka, Y. „Role of surfactant protein A in

- non-infectious lung diseases“. *The Journal of Medical Investigation*, 61(1.2), 1–6, **2014**. doi:10.2152/jmi.61.1.
- Griese, M., Noss, J., und von Bredow, C. „Protein pattern of exhaled breath condensate and saliva“. *Proteomics*, 2(6), 690–6, **2002**.
- Ho, L. P., Innes, J. A., und Greening, A. P. „Nitrite levels in breath condensate of patients with cystic fibrosis is elevated in contrast to exhaled nitric oxide“. *Thorax*, 53(8), 680–4, **1998**.
- Hoffmeyer, F., Berresheim, H., Beine, A., Sucker, K., Brüning, T., und Bünger, J. „Methodological implications in pH standardization of exhaled breath condensate“. *J. Breath Res.*, 9(3), 036003, **2015**. ISSN 1752-7163. doi:10.1088/1752-7155/9/3/036003.
- Hoffmeyer, F., Raulf-Heimsoth, M., und Bruning, T. „Exhaled breath condensate and airway inflammation“. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 9, 16–22, **2009a**.
- Hoffmeyer, F., Raulf-Heimsoth, M., Harth, V., Bunger, J., und Bruning, T. *Comparative Analysis of Selected Exhaled Breath Biomarkers Obtained with Two Different Temperature-Controlled Devices*, Band 9. **2009b**. ISBN 1471-2466 (Electronic).
- Hoffmeyer, F., Sucker, K., Monsé, C., Berresheim, H., Jettkant, B., Rosenkranz, N., Brüning, T., und Bünger, J. „Different Patterns in Changes of Exhaled Breath Condensate pH and Exhaled Nitric Oxide After Ozone Exposure“. In M. Pokorski, Hg., „Environment Exposure to Pollutants“, Nummer 834 in *Advances in Experimental Medicine and Biology*, S. 39–47. Springer International Publishing, **2014**. ISBN 978-3-319-10002-9 978-3-319-10003-6. doi:10.1007/5584\_2014\_63.

- Honda, Y., Takahashi, H., Kuroki, Y., Akino, T., und Abe, S. „Decreased Contents of Surfactant Proteins A and D in BAL Fluids of Healthy Smokers“. *Chest*, 109(4), 1006–1009, **1996**. ISSN 0012-3692. doi: 10.1378/chest.109.4.1006.
- Horvath, I., Hunt, J., Barnes, P. J., Alving, K., Antczak, A., Baraldi, E., Becher, G., van Beurden, W. J., Corradi, M., Dekhuijzen, R., Dweik, R. A., Dwyer, T., Effros, R., Erzurum, S., Gaston, B., Gessner, C., Greening, A., Ho, L. P., Hohlfeld, J., Jobsis, Q., Laskowski, D., Loukides, S., Marlin, D., Montuschi, P., Olin, A. C., Redington, A. E., Reinhold, P., van Rensen, E. L., Rubinstein, I., Silkoff, P., Toren, K., Vass, G., Vogelberg, C., und Wirtz, H. „Exhaled breath condensate: Methodological recommendations and unresolved questions“. *Eur Respir J*, 26(3), 523–48, **2005**.
- Hunt, J. „Exhaled breath condensate: An evolving tool for noninvasive evaluation of lung disease“. *J Allergy Clin Immunol*, 110(1), 28–34, **2002**.
- Hunt, J. „Exhaled breath condensate pH: Reflecting acidification of the airway at all levels“. *Am J Respir Crit Care Med*, 173, 366–7, **2006**.
- Hunt, J. „Exhaled breath condensate: An overview“. *Immunol Allergy Clin North Am*, 27, 587–96; v, **2007a**.
- Hunt, J. „Exhaled breath condensate pH assays“. *Immunol Allergy Clin North Am*, 27, 597–606; vi, **2007b**.
- Hüttmann, E.-M., Greulich, T., Hattesoehl, A., Schmid, S., Noeske, S., Herr, C., John, G., Jörres, R. A., Müller, B., Vogelmeier, C., und Koczulla, A. R. „Comparison of Two Devices and Two Breathing Patterns for Exhaled Breath Condensate Sampling“. *PLoS ONE*, 6(11), e27467, **2011**.



- Ichikawa, T., Matsunaga, K., Minakata, Y., Yanagisawa, S., Ueshima, K., Akamatsu, K., Hirano, T., Nakanishi, M., Sugiura, H., Yamagata, T., und Ichinose, M. „Possible impact of salivary influence on cytokine analysis in exhaled breath condensate“. *Anal Chem Insights*, 2, 85–92, **2007**.
- Irwin, R. S., Augustyn, N., French, C. T., Rice, J., Tedeschi, V., und Welch, S. J. „Spread the Word About the Journal in 2013: From Citation Manipulation to Invalidation of Patient-Reported Outcomes Measures to Renaming the Clara Cell to New Journal Features“. *Chest*, 143(1), 1–4, **2013**. ISSN 0012-3692. doi:10.1378/chest.12-2762.
- Jackson, A. S., Sandrini, A., Campbell, C., Chow, S., Thomas, P. S., und Yates, D. H. „Comparison of biomarkers in exhaled breath condensate and bronchoalveolar lavage“. *Am J Respir Crit Care Med*, 175, 222–7, **2007**.
- Johnson, G. R. und Morawska, L. „The mechanism of breath aerosol formation“. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv*, 22, 229–37, **2009**.
- Kane, B., Borrill, Z., Southworth, T., Woodcock, A., und Singh, D. „Reduced exhaled breath condensate pH in asthmatic smokers using inhaled corticosteroids“. *Respirology*, 14(3), 419–23, **2009**.
- Kazani, S. und Israel, E. „Exhaled breath condensates in asthma: Diagnostic and therapeutic implications“. *J Breath Res*, 4(4), 047001, **2010**.
- Kishore, U., Greenhough, T. J., Waters, P., Shrive, A. K., Ghai, R., Kamran, M. F., Bernal, A. L., Reid, K. B., Madan, T., und Chakraborty, T. „Surfactant proteins SP-A and SP-D: Structure, function and receptors“. *Mol Immunol*, 43, 1293–315, **2006**.

- Koczulla, A. R., Noeske, S., Herr, C., Dette, F., Pinkenburg, O., Schmid, S., Jorres, R. A., Vogelmeier, C., und Bals, R. „Ambient temperature impacts on pH of exhaled breath condensate“. *Respirology*, 15, 155–9, **2010a**.
- Koczulla, A. R., Noeske, S., Herr, C., Jorres, R. A., Rommelt, H., Vogelmeier, C., und Bals, R. „Acute and chronic effects of smoking on inflammation markers in exhaled breath condensate in current smokers“. *Respiration*, 79, 61–7, **2010b**.
- Koczulla, A. R., Noeske, S., Herr, C., Koepke, J., Jörres, R. A., Nell, C., Schmid, S., Vogelmeier, C., und Bals, R. „Alpha-1 antitrypsin is elevated in exhaled breath condensate and serum in exacerbated COPD patients“. *Respiratory Medicine*, 106(1), 120–126, **2012**. ISSN 0954-6111, 1744-9049. doi:10.1016/j.rmed.2011.06.015.
- Koczulla, R., Dragonieri, S., Schot, R., Bals, R., Gauw, S., Vogelmeier, C., Rabe, K., Sterk, P., und Hiemstra, P. „Comparison of exhaled breath condensate pH using two commercially available devices in healthy controls, asthma and COPD patients.“ *Respir Res*, 10, 78, **2009**.
- Konstantinidi, E. M., Lappas, A. S., Tzortzi, A. S., und Behrakis, P. K. „Exhaled Breath Condensate: Technical and Diagnostic Aspects“. *The Scientific World Journal*, 2015, e435160, **2015**. ISSN 2356-6140. doi:10.1155/2015/435160.
- Kostikas, K., Gaga, M., Papatheodorou, G., Karamanis, T., Orphanidou, D., und Loukides, S. „Leukotriene B4 in exhaled breath condensate and sputum supernatant in patients with COPD and asthma“. *Chest*, 127(5), 1553–9, **2005**.

- Kostikas, K., Papatheodorou, G., Ganas, K., Psathakis, K., Panagou, P., und Loukides, S. „pH in expired breath condensate of patients with inflammatory airway diseases“. *Am J Respir Crit Care Med*, 165(10), 1364–70, **2002**.
- Kostikas, K., Papatheodorou, G., Psathakis, K., Panagou, P., und Loukides, S. „Oxidative stress in expired breath condensate of patients with COPD“. *Chest*, 124(4), 1373–80, **2003**.
- Kovalchuk, S. I., Anikanov, N. A., Ivanova, O. M., Ziganshin, R. H., und Gorovun, V. M. „Bovine serum albumin as a universal suppressor of non-specific peptide binding in vials prior to nano-chromatography coupled mass-spectrometry analysis“. *Analytica Chimica Acta*, 893, 57–64, **2015**. ISSN 0003-2670. doi:10.1016/j.aca.2015.08.027.
- Kropski, J. A., Fremont, R. D., Calfee, C. S., und Ware, L. B. „Clara cell protein (CC16), a marker of lung epithelial injury, is decreased in plasma and pulmonary edema fluid from patients with acute lung injury“. *Chest*, 135, 1440–7, **2009**.
- Kubáň, P. und Foret, F. „Exhaled breath condensate: Determination of non-volatile compounds and their potential for clinical diagnosis and monitoring. A review“. *Analytica Chimica Acta*, 805, 1–18, **2013**. ISSN 0003-2670. doi:10.1016/j.aca.2013.07.049.
- Kullmann, T., Barta, I., Antus, B., und Horvath, I. „Drinking influences exhaled breath condensate acidity“. *Lung*, 186(4), 263–8, **2008**.
- Kullmann, T., Barta, I., Lazar, Z., Szili, B., Barat, E., Valyon, M., Kollai, M., und Horvath, I. „Exhaled breath condensate pH standardised for CO<sub>2</sub> partial pressure“. *Eur Respir J*, 29, 496–501, **2007**.

- Kurik, M. V., Rolik, L. V., Parkhomenko, N. V., Tarakhan, L. I., und Savitskaia, N. V. „Physical properties of a condensate of exhaled air in chronic bronchitis patients“. *Vrach Delo*, (7), 37–9, **1987**.
- Larsson, P., Mirgorodskaya, E., Samuelsson, L., Bake, B., Almstrand, A. C., Bredberg, A., und Olin, A. C. „Surfactant protein A and albumin in particles in exhaled air“. *Respir Med*, **2011**.
- Laucho-Contreras, M. E., Polverino, F., Tesfaigzi, Y., Pilon, A., Celli, B. R., und Owen, C. A. „Club Cell Protein 16 (CC16) Augmentation: A Potential Disease-modifying Approach for Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD)“. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 20(7), 869–883, **2016**. ISSN 1472-8222. doi:10.1517/14728222.2016.1139084.
- Leung, T. F., Li, C. Y., Yung, E., Liu, E. K., Lam, C. W., und Wong, G. W. „Clinical and technical factors affecting pH and other biomarkers in exhaled breath condensate“. *Pediatr Pulmonol*, 41(1), 87–94, **2006**.
- Lim, M. Y. und Thomas, P. S. „Biomarkers in Exhaled Breath Condensate and Serum of Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Non-Small-Cell Lung Cancer“. *International Journal of Chronic Diseases*, 2013, e578613, **2013**. doi:10.1155/2013/578613.
- Lin, J. L., Bonnichsen, M. H., und Thomas, P. S. „Standardization of exhaled breath condensate: Effects of different de-aeration protocols on pH and HO concentrations“. *J Breath Res*, 5, 011001, **2011**.
- Lin, X.-F., Zhang, L., Shi, S.-Y., Fan, Y.-C., Wu, Z.-L., Zhang, X., und Sun, D.-Q. „Expression of surfactant protein-A in exhaled breath condensate of patients with chronic obstructive pulmonary disease“. *Molecular Medicine Reports*, 13(2), 1667–1672, **2016**. ISSN 1791-2997.

- Liu, J., Conrad, D. H., Chow, S., Tran, V. H., Yates, D. H., und Thomas, P. S. „Collection devices influence the constituents of exhaled breath condensate“. *Eur Respir J*, 30, 807–8, **2007**.
- Liu, J. und Thomas, P. „Exhaled breath condensate as a method of sampling airway nitric oxide and other markers of inflammation.“ *Medical Science Monitor*, 11(8), MT53–62, **2005**.
- Liu, J. und Thomas, P. S. „Relationship between exhaled breath condensate volume and measurements of lung volumes“. *Respiration*, 74, 142–5, **2007**.
- Lock-Johansson, S., Vestbo, J., und Sorensen, G. L. „Surfactant protein D, Club cell protein 16, Pulmonary and activation-regulated chemokine, C-reactive protein, and Fibrinogen biomarker variation in chronic obstructive lung disease“. *Respiratory Research*, 15, 147, **2014**. ISSN 1465-993X. doi:10.1186/s12931-014-0147-5.
- Mazur, W., Toljamo, T., Ohlmeier, S., Vuopala, K., Nieminen, P., Kobayashi, H., und Kinnula, V. L. „Elevation of surfactant protein A in plasma and sputum in cigarette smokers“. *European Respiratory Journal*, 38(2), 277–284, **2011**. ISSN 0903-1936, 1399-3003. doi:10.1183/09031936.00110510.
- McCafferty, J. B., Bradshaw, T. A., Tate, S., Greening, A. P., Innes, J. A., McCafferty, J. B., Bradshaw, T. A., Tate, S., Greening, A. P., und Innes, J. A. „Effects of breathing pattern and inspired air conditions on breath condensate volume, pH, nitrite, and protein concentrations“. *Thorax*, 59, 694–8, **2004**.
- Montuschi, P. „Analysis of exhaled breath condensate in respiratory medicine: Methodological aspects and potential clinical applications“. *Ther Adv Respir Dis*, 1, 5–23, **2007**.

- Mutlu, G. M., Garey, K. W., Robbins, R. A., Danziger, L. H., und Rubinstein, I. „Collection and analysis of exhaled breath condensate in humans“. *Am J Respir Crit Care Med*, 164(5), 731–7, **2001**.
- Ohanian, A. S., Zimmerman, J., und Debley, J. S. „Effects of sample processing, time and storage condition on cysteinyl leukotrienes in exhaled breath condensate“. *J Breath Res*, 4(4), 046002, **2010**.
- Paget-Brown, A. O., Ngamtrakulpanit, L., Smith, A., Bunyan, D., Hom, S., Nguyen, A., und Hunt, J. F. „Normative data for pH of exhaled breath condensate“. *Chest*, 129, 426–30, **2006**.
- Papineni, R. S. und Rosenthal, F. S. „The size distribution of droplets in the exhaled breath of healthy human subjects“. *J Aerosol Med*, 10(2), 105–16, **1997**.
- Popov, T. A. „Human exhaled breath analysis“. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 106(6), 451–6; quiz 457, **2011**.
- Prieto, L., Ferrer, A., Palop, J., Domenech, J., Llusar, R., und Rojas, R. „Differences in exhaled breath condensate pH measurements between samples obtained with two commercial devices“. *Respir Med*, 101, 1715–20, **2007**.
- Prieto, L., Orosa, B., Barato, D., und Marin, J. „The effect of different periods of argon deaeration on exhaled breath condensate pH“. *J Asthma*, 48(4), 319–23, **2011**.
- Reinhold, P., Jaeger, J., und Schroeder, C. „Evaluation of methodological and biological influences on the collection and composition of exhaled breath condensate“. *Biomarkers*, 11(2), 118–42, **2006**.

- Reinhold, P. und Knobloch, H. „Exhaled breath condensate: Lessons learned from veterinary medicine“. *J Breath Res*, 4, 017001, **2009**.
- Roberts, K., Liu, I., Jaffe, A., Verge, C. F., und Thomas, P. S. „Markers of pancreatic function in the breath“. *J. Breath Res.*, 8(4), 046009, **2014**. ISSN 1752-7163. doi:10.1088/1752-7155/8/4/046009.
- Rosias, P. „Methodological aspects of exhaled breath condensate collection and analysis“. *J. Breath Res.*, 6(2), 027102, **2012**. ISSN 1752-7163. doi:10.1088/1752-7155/6/2/027102.
- Rosias, P. P., Robroeks, C. M., Kester, A., den Hartog, G. J., Wodzig, W. K., Rijkers, G. T., Zimmermann, L. J., van Schayck, C. P., Jobsis, Q., und Dompeling, E. „Biomarker reproducibility in exhaled breath condensate collected with different condensers“. *Eur Respir J*, 31, 934–42, **2008**.
- Rosias, P. P., Robroeks, C. M., Niemarkt, H. J., Kester, A. D., Vernooij, J. H., Suykerbuyk, J., Teunissen, J., Heynens, J., Hendriks, H. J., Jobsis, Q., und Dompeling, E. „Breath condenser coatings affect measurement of biomarkers in exhaled breath condensate“. *Eur Respir J*, 28, 1036–41, **2006**.
- Rosias, P. P. R., Dompeling, E., Hendriks, H. J. E., Heijnens, J. W. C. M., Donckerwolcke, R. A. M. G., und Jöbsis, Q. „Exhaled breath condensate in children: Pearls and pitfalls“. *Pediatric Allergy and Immunology*, 15(1), 4–19, **2004**. ISSN 1399-3038. doi:10.1046/j.0905-6157.2003.00091.x.
- Scheideler, L., Manke, H. G., Schwulera, U., Inacker, O., und Hammerle, H. „Detection of nonvolatile macromolecules in breath. A possible diagnostic tool?“ *Am Rev Respir Dis*, 148(3), 778–84, **1993**.

- Schleiss, M. B., Holz, O., Behnke, M., Richter, K., Magnussen, H., und Jorres, R. A. „The concentration of hydrogen peroxide in exhaled air depends on expiratory flow rate“. *Eur Respir J*, 16(6), 1115–8, **2000**.
- Schwarz, K., Biller, H., Windt, H., Koch, W., und Hohlfeld, J. M. „Characterization of exhaled particles from the healthy human lung—a systematic analysis in relation to pulmonary function variables“. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv*, 23(6), 371–9, **2010**.
- Shijubo, N., Itoh, Y., Yamaguchi, T., Shibuya, Y., Morita, Y., Hirasawa, M., Okutani, R., Kawai, T., und Abe, S. „Serum and BAL Clara cell 10 kDa protein (CC10) levels and CC10-positive bronchiolar cells are decreased in smokers“. *Eur Respir J*, 10(5), 1108–14, **1997**.
- Sidorenko, G. I., Zborovskii, E. I., und Levina, D. I. „[Surface-active properties of the exhaled air condensate (a new method of studying lung function)]“. *Ter Arkh*, 52(3), 65–8, **1980**.
- Simpson, J. L., Wood, L. G., und Gibson, P. G. „Inflammatory mediators in exhaled breath, induced sputum and saliva“. *Clin Exp Allergy*, 35, 1180–5, **2005**.
- Soyer, O. U., Dizdar, E. A., Keskin, O., Lilly, C., und Kalayci, O. „Comparison of two methods for exhaled breath condensate collection“. *Allergy*, 61, 1016–8, **2006**.
- Thomas, P., Lowe, A., Samarasinghe, P., Lodge, C., Huang, Y., Abramson, M., Dharmage, S., und Jaffe, A. „Exhaled breath condensate in pediatric asthma: Promising new advance or pouring cold water on a lot of hot air? A systematic review“. *Pediatr. Pulmonol.*, 48(5), 419–442, **2013**. ISSN 1099-0496. doi:10.1002/ppul.22776.



- Trischler, J., Merkel, N., Konitzer, S., Muller, C. M., Unverzagt, S., und Lex, C. „Fractionated breath condensate sampling: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations of the alveolar fraction may be related to asthma control in children“. *Respir Res*, 13, 14, **2012**.
- Tufvesson, E. und Bjermer, L. „Methodological improvements for measuring eicosanoids and cytokines in exhaled breath condensate“. *Respiratory Medicine*, 100(1), 34–38, **2006**. ISSN 0954-6111, 1744-9049. doi: 10.1016/j.rmed.2005.04.007.
- van Beurden, W. J., Harff, G. A., Dekhuijzen, P. N., van den Bosch, M. J., Creemers, J. P., und Smeenk, F. W. „An efficient and reproducible method for measuring hydrogen peroxide in exhaled breath condensate“. *Respir Med*, 96(3), 197–203, **2002**.
- van de Graaf, E. A., Jansen, H. M., Lutter, R., Alberts, C., Kobesen, J., de Vries, I. J., und Out, T. A. „Surfactant protein A in bronchoalveolar lavage fluid“. *J Lab Clin Med*, 120, 252–63, **1992**.
- van Mastrigt, E., de Jongste, J. C., und Pijnenburg, M. W. „The analysis of volatile organic compounds in exhaled breath and biomarkers in exhaled breath condensate in children - clinical tools or scientific toys?“ *Clin. Exp. Allergy*, 45(7), 1170–1188, **2015**. ISSN 1365-2222. doi:10.1111/cea.12454.
- Vaschetto, R., Corradi, M., Goldoni, M., Cancelliere, L., Pulvirenti, S., Ugo Fazzini, Capuzzi, F., Longhini, F., Mutti, A., Corte, F. D., und Navalesi, P. „Sampling and analyzing alveolar exhaled breath condensate in mechanically ventilated patients: A feasibility study“. *J. Breath Res.*, 9(4), 047106, **2015**. ISSN 1752-7163. doi:10.1088/1752-7155/9/4/047106.

- Vaughan, J., Ngamtrakulpanit, L., Pajewski, T. N., Turner, R., Nguyen, T. A., Smith, A., Urban, P., Hom, S., Gaston, B., und Hunt, J. „Exhaled breath condensate pH is a robust and reproducible assay of airway acidity“. *Eur Respir J*, 22(6), 889–94, **2003**.
- Vyas, A., Zhang, Q., Gunaratne, S., Lee, W., Lin, J.-L., Lin, J.-S., Warwick, G., und Thomas, P. S. „The effect of temperature on exhaled breath condensate collection“. *J. Breath Res.*, 6(3), 036002, **2012**. ISSN 1752-7163. doi:10.1088/1752-7155/6/3/036002.
- Walsh, B. K., Davis, M. D., Hunt, J. F., Kheir, J. N., Smallwood, C. D., und Arnold, J. H. „The effects of lung recruitment maneuvers on exhaled breath condensate pH“. *J. Breath Res.*, 9(3), 036009, **2015**. ISSN 1752-7163. doi:10.1088/1752-7155/9/3/036009.
- Wang, H., Liu, Y., und Liu, Z. „Clara cell 10-kD protein in inflammatory upper airway diseases“. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 13(1), 25–30, **2013**.
- Wang, J. Y. und Reid, K. B. „The immunoregulatory roles of lung surfactant collectins SP-A, and SP-D, in allergen-induced airway inflammation“. *Immunobiology*, 212, 417–25, **2007**.
- Warwick, G., Thomas, P. S., und Yates, D. H. „Non-invasive biomarkers in exacerbations of obstructive lung disease“. *Respirology*, 18(5), 874–884, **2013**. ISSN 1440-1843. doi:10.1111/resp.12089.
- Wells, K., Vaughan, J., Pajewski, T. N., Hom, S., Ngamtrakulpanit, L., Smith, A., Nguyen, A., Turner, R., und Hunt, J. „Exhaled breath condensate pH assays are not influenced by oral ammonia“. *Thorax*, 60, 27–31, **2005**.

- Whittaker, A. G., Love, S., Parkin, T. D., Duz, M., Cathcart, M., und Hughes, K. J. „Assessment of the impact of collection temperature and sampler design on the measurement of exhaled breath condensate pH in healthy horses“. *Vet J*, **2011**.
- Winkelmann, A. und Noack, T. „The Clara cell: A “Third Reich eponym”?“ *European Respiratory Journal*, 36(4), 722–727, **2010**. ISSN 0903-1936, 1399-3003. doi:10.1183/09031936.00146609.
- Xiao, P., Chen, J.-r., Zhou, F., Lu, C.-x., Yang, Q., Tao, G.-h., Tao, Y.-j., und Chen, J.-l. „Methylation of P16 in exhaled breath condensate for diagnosis of non-small cell lung cancer“. *Lung Cancer*, 83(1), 56–60, **2014**. ISSN 0169-5002, 1872-8332. doi:10.1016/j.lungcan.2013.09.008.
- Zakharkina, T., Koczulla, A. R., Mardanova, O., Hattesoehl, A., und Bals, R. „Detection of microorganisms in exhaled breath condensate during acute exacerbations of COPD“. *Respirology*, 16(6), 932–8, **2011**.



# Abbildungsverzeichnis

1.1. Neuveröffentlichungen zum Stichwort „Exhaled breath condensate“ pro Jahr (1980-2015, Quelle: pub med). . . . .	2
1.2. nach Effros et al. (2004): Der Konzentrationsanstieg eines gelösten Stoffes im EBC ist entweder auf eine erhöhte Konzentration innerhalb des epithelialen Flüssigkeitsfilms, (B) oder auf eine höhere Anzahl und/oder Volumen der respiratorischen Tröpfchen des epithelialen Flüssigkeitsfilms im Exhalat (C) zurückzuführen. . . . .	5
1.3. nach Kazani und Israel (2010): Die im EBC nachweisbaren Substanzen können aus verschiedenen Abschnitten des Respirationstraktes stammen. . . . .	7
1.4. nach Hunt (2002): Die Ausatemluft gelangt durch ein gekühltes Schlauchsystem. Das Kondensat kann dem Sammelgefäß entnommen werden. . . . .	10
1.5. Messaufbau RTube™. . . . .	12
1.6. RTube™(www.rtube.com). . . . .	13
1.7. ECoScreen Turbo (privat). . . . .	13
2.1. NovoBlot Multiphor II, Data file Electrophoresis Multiphor II, Electrophoresis Systems, Amersham Bioscience, 11-0012-39 AA, 2004, S. 4. . . . .	39

---

2.2.	Schematischer Aufbau des Proteintransfers. . . . .	40
3.1.	Mit dem RTube™ wurden bei ruhiger und forcierter Atmung verglichen mit dem ECoScreen Turbo höhere EBC Volumina gemessen ( $p < 0,001$ ). Durch forcierte Atmung konnte mit beiden Geräten mehr EBC gewonnen werden. Beim RTube™ war der Unterschied zur Ruheatmung statistisch signifikant ( $p < 0,0001$ ). . . . .	44
3.2.	Forcierte Atmung bewirkte eine 1,78fache Steigerung des ventilierten Atemvolumens ( $p < 0,0001$ ). . . . .	45
3.3.	Bei Ruheatmung zeigten der RTube™ und ECoScreen Turbo vergleichbare pH-Werte. . . . .	47
3.4.	Bei forcierter Atmung zeigten der RTube™ und ECoScreen Turbo vergleichbare pH-Werte. . . . .	48
3.5.	Die untersuchten Atemmuster zeigten bei Verwendung des ECoScreen Turbos im Hinblick auf den Zielparameter EBC pH keine signifikanten Veränderungen. . . . .	49
3.6.	Die untersuchten Atemmuster zeigten bei Verwendung des RTube™s im Hinblick auf den Zielparameter EBC pH keine signifikanten Veränderungen. . . . .	50
3.7.	Bei Ruheatmung wurde die Leitfähigkeit der beiden Geräten nicht statistisch signifikant verändert. . . . .	51
3.8.	Bei forcierter Atmung wurde die Leitfähigkeit bei beiden Geräten nicht statistisch signifikant verändert. . . . .	52
3.9.	Durch unterschiedliche Atemmuster wurde die Leitfähigkeit bei Anwendung des RTube™ nicht signifikant verändert. . .	52

3.10. Durch unterschiedliche Atemmuster wurde die Leitfähigkeit bei Anwendung des ECoScreen Turbo nicht signifikant verändert. . . . .	53
3.11. Bei Ruheatmung (R) und forcierter Atmung (F) wurde kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen dem RTube™ und dem ECoScreen Turbo festgestellt. Nach forcierter Atmung war im EBC eine höhere Gesamtproteinkonzentrationen nachweisbar. Bei Anwendung des ECoScreen Turbo war dieser Unterschied statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ) . . . . .	54
3.12. Bei der Normierung der Gesamtproteinkonzentration bezüglich des ventilierten Volumens ergaben sich bei ruhiger Atmung (R) höhere normalisierte Gesamtproteinkonzentrationen als bei forcierter Atmung (F) ( $p < 0,05$ ) . . . . .	55
3.13. Forcierte Atmung erhöhte sowohl beim ECoScreen Turbo als auch bei Anwendung des RTube™ signifikant die Gesamtproteinmenge im EBC (ECoScreen Turbo: $p < 0,005$ ; RTube™: $p < 0,05$ ). Das Gerät selbst hatte keinen Einfluss auf die Gesamtproteinmenge. . . . .	57
3.14. Nach Normierung der Gesamtproteinmenge bezüglich des ventilierten Atemvolumens fand sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen forcierter Atmung und Ruheatmung. . . . .	58

- 
- 3.15. Darstellung der AAT Messungen (unbeschichtete Sammelgefäße) auf unterschiedliche Arten: Durch forcierte Atmung können bei Anwendung des ECoScreen Turbo statistisch signifikant höhere AAT Konzentrationen ( $p = 0,0078$ ) sowie absolute AAT Mengen ( $p = 0,0078$ ) im EBC gemessen werden. Dies gilt auch für die pro Ausatemvolumen normierten AAT Konzentrationen ( $p = 0,039$ ) und absoluten Mengen ( $p = 0,027$ ) im EBC. Bei Verwendung des RTube™ werden bei forciertem Atemmanöver verglichen mit der forcierten Atmung geringere Konzentrationen/Mengen von AAT im EBC gemessen. Die Unterschiede waren dabei aber nicht statistisch signifikant. . . . . 63
- 3.16. Darstellung der AAT Messungen (beschichtete Sammelgefäße) auf unterschiedliche Arten: Es zeigte sich, dass durch forcierte Atmung eine signifikant höhere AAT Konzentration ( $p < 0,005$ ), absolute AAT Menge ( $p < 0,005$ ) sowie normierte AAT Menge ( $p < 0,05$ ) erreicht wird. Nach Normierung der AAT Konzentration bezüglich des ventilierten Atemvolumens zeigte sich nach forciertes Atmung ein Trend zu höheren Proteinkonzentrationen. . . . . 64
- 4.1. Unterschiedliche Faktoren beeinflussen die gemessene Konzentration nichtvolatiler Substanzen im EBC. . . . . 82



# **A. Anhang**

## **Tabellen**

Tabelle A.1.: Probandencharakteristik

	n	m/w	Alter [Jahre]	BMI [ $\text{kg m}^{-2}$ ]
Gesamt	43	22/21	25,56 $\pm$ 4,22 (18 - 44)	22,63 $\pm$ 3,02 (17,78 - 31,00)
Versuchsreihe I (Volumen, pH, Leitfähigkeit)	10	4/6	24,8 $\pm$ 2,78 (23 - 30)	21,52 $\pm$ 0,72 (18 - 26)
Versuchsreihe II (Gesamtprotein)	10	7/3	25,8 $\pm$ 2,10 (24 - 29)	22,0 $\pm$ 4,01 (17,8 - 27,8)
Versuchsreihe III (CCP, SP-A)	12	5/7	26,08 $\pm$ 3,63 (20 - 31)	21,71 $\pm$ 2,34 (17,78 - 24,64)
Versuchsreihe IV (AAT, unbeschichtete Sammelgefäße)	10	6/4	28,8 $\pm$ 5,83 (24 - 44)	24,0 $\pm$ 4,40 (18 - 28)
Versuchsreihe V (AAT, beschichtete Sammelgefäße)	12	5/7	23,7 $\pm$ 2,93 (18 - 25)	22,0 $\pm$ 1,83 (18,8 - 24,9)

**Tabelle A.2.:** Liste der verwendeten Materialien (alphabetisch)

Material	Firma	Stadt	Land
CL-X Posure TM Film Clear Blue X-Ray Film	Thermo Scientific	Rockford	USA
Einweg-Sammelsystem für ECoScreen Turbo	VIASYS Cardinal Health	Hoechberg	Deutschland
Eppendorf Protein LoBind Tubes	Eppendorf AG	Hamburg	Deutschland
Eppendorfreaktionsgefäß	Eppendorf AG	Hamburg	Deutschland
F96 Maxi Sorp Immuno-Platten	Nunc AG	Wiesbaden	Deutschland
Pro Gel-P-Tris Tricin 10-20% 1,0 mm	Anamed Electrophorese GmbH	Gross-Bieberau	Deutschland
Trans-Blot Transfer-Medium Pure Nitrocellulose Membrane (0,2 µm)	Bio-Rad	München	Deutschland
Whatman 3MM Chr Paper	Whatman GmbH	Baden-Baden	Deutschland

**Tabelle A.3.:** Liste der verwendeten Chemikalien (alphabetisch)

Chemikalie oder Reagenz	Firma	Stadt	Land
AGFA Entwickler G 150 1 Liter Konzentrat	Bendergruppe	Baden-Baden	Deutschland
AGFA Fixierer G 354 1 Liter Konzentrat	Bendergruppe	Baden-Baden	Deutschland
Anti-Human Alpha-1 Antitrypsin (Rabbit Polyclonal Antibody)	Sigma Aldrich	Taufkirchen	Deutschland
Anti-Human Alpha-1 Antitrypsin, Horseradish Peroxidase conjugated (Goat Polyclonal Antibody)	Sigma Aldrich	Taufkirchen	Deutschland
Argon 99,9%	Linde Gas	Pullach	Deutschland
Blocking reagent for ELISA	Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science	Mannheim	Deutschland
Bovines Serum Albumin	Sigma Aldrich	Taufkirchen	Deutschland
Chemielumineszenzkit (SuperSignal West Femto Maximum)	Pierce	Rockford	USA
Clara Cell Protein Human (Rabbit Polyclonal Antibody)	BioVendor	Heidelberg	Deutschland
Ethanol absolut	Carl Roth	Karlsruhe	Deutschland
Dulbecco's PBS (1x) without Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>	PAA Laboratories GmbH	Pasching	Österreich
Glycin PUFFERAN $\geq$ 99%, p.a.	Carl Roth	Karlsruhe	Deutschland
Human CC Protein ELISA	BioVendor	Heidelberg	Deutschland
Human Surfactant Protein A ELISA	BioVendor	Heidelberg	Deutschland
Milchpulver, Blotting grade, pulv.	Carl Roth	Karlsruhe	Deutschland
Pierce: Stabilized Goat-Anti-Rabbit HRP-Conjugated	Thermo Fisher Scientific	Rockford	USA
Roti-load 1 reduzierend, 4x konz. Protein-Gelladepuffer.	Carl Roth	Karlsruhe	Deutschland

---

**Tabelle A.4.:** Liste der verwendeten Chemikalien (Fortsetzung)

Chemikalie oder Reagenz	Firma	Stadt	Land
SDS-ultra pure, $\geq 99\%$ , für die Elektrophorese	Carl Roth	Karlsruhe	Deutschland
SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard	Life Technologies	Darmstadt	Deutschland
Surfactant Protein A Human (Rabbit Polyclonal Antibody)	BioVendor	Heidelberg	Deutschland
TMB (Tetramethylbenzidine)	calbiochem. Merck Biosciences GmbH	Schwalbach/Ts.	Deutschland
Tricine, PUFFERAN, $\geq 99\%$ N-Tris-(hydroxymethyl)-methyl-glycin	Carl Roth	Karlsruhe	Deutschland
Tris PUFFERAN, $\geq 99\%$ , p.a. Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Carl Roth	Karlsruhe	Deutschland
Tween 20	Carl Roth	Karlsruhe	Deutschland

**Tabelle A.5.:** Liste der verwendeten Geräte (alphabetisch)

Gerät	Firma	Stadt	Land
EasyPhor PAGE Kammern	Biozym Scientific	Hessisch Oldendorf	Deutschland
ECoScreen Turbo, EcoVent	VIASYS Cardinal Health	Hoechberg	Deutschland
ELISA Reader Tecan Infinite 200 PRO	Tecan Deutschland GmbH	Crailsheim	Deutschland
ELISA Reader Tecan Ultra 384	Tecan Deutschland GmbH	Crailsheim	Deutschland
GILSON Pipetman P 20, P 100, P 200, P 1000	Gilson SAS	Villiers-le-Bel	Frankreich
Glaspipette	Hirschmann	Eberstadt	Deutschland
Leitfähigkeitsmessgerät LF 530	WTW GmbH	Weilheim	Deutschland
Novablot Multiphor II	Amersham Bioscience	Uppsala	Schweden
Power Station 300 Plus Labnet	Labnet International, Inc.	Edison, NJ	USA
RM5 Assistent 348 Vortex Genie 2	Scientific Industries, Inc.	New York	USA
Rotilabo-Blockthermostat Modell H 250	Carl Roth	Karlsruhe	Deutschland
Röntgenkassette Dr. Goos suprema Special/ Rapid 200	Dr. Goos-Suprema GmbH	Heidelberg	Deutschland
RTube Exhaled Breath Condensator Collector	Respiratory Research Inc.	Charlottesville, VA	USA
Schüttel-und Mischgerät Promax 1020	Heidolph Instruments	Schwabach	Deutschland
Speed Vac Concentrator	Bachofer Laboratoriumsgeräte	Reutlingen	Deutschland
WinLab Data Line pH-Meter	Windaus Labortechnik	Halberstadt	Deutschland
Zentrifuge Biofuge 13 Heraeus Sepatech	Thermo Electron LED GmbH	Langenselbold	Deutschland

**Tabelle A.6.: Literaturvergleich Gesamteinproteinkonzentration**

Author	Daten	Gerät	Konzentration [µg/ml]	Analysemethode
Goldoni et al. (2013)	N = 39 T = 15 min	ECoScreen Turbo	Median 0,7	Micro BCA™ Protein Assay Kit, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
Vyas et al. (2012)	N = 20 T = 10 min	Konstruktion nach Liu und Thomas (2006)	4 °C : 4,03 ± 2,41 20 °C : 2,79 ± 0,98	Quanti Pro™ BCA Assay Kit
Hüttmann et al. (2011)	N = 10 T = 10 min	RTube ECoScreen	1,470 ± 1,227 1,725 ± 0,695	Quanti Pro™ BCA Assay Kit, Sigma Aldrich, Germany
Czebe et al. (2008)	N = 12 T = 10 min	RTube ECoScreen Anacon	2,65 ± 1,88 3,89 ± 2,03 1,88 ± 1,99	Bradford Reagent, Sigma-Aldrich, B-6919, USA
Gessner et al. (2008)	N = 10 T = 30 min	ECoScreen	Median 8,3	Micro BCA Protein Assay, Pierce, Rockford, IL, USA
Bloemen et al. (2007)	N = 21 T = 15 min	RTube	0,42 bis 3,22	Nano Orange Protein Quantitation Kit
McCafferty et al. (2004)	N = 10 T = 6 min	ECoScreen I	6,0 ± 3,4	Micro BCA Protein Assay, Pierce, Rockford, IL, USA
Garcey et al. (2004)	N = 9 T = 20 min	Konstruktion nach Ho et al. (1998)	5,7 ± 2,5	Bradford Methode, kommerzielles Gerät (Pierce, Rockford, IL, USA)
Dwyer (2004)	N = 31 T = 15 min	Eigenkonstruktion	2,3 ± 0,3	bicinchoninic dye-binding technique (#23235, Pierce Chemical Co.)
Gessner et al. (2001)	N = 22 T = 10 min	ECoScreen	11,9 ± 8,9	Micro BCA Protein Assay, Pierce, Rockford, IL, USA
Scheideler et al. (1993)	N = 10	Eigenkonstruktion	0,76 bis 107,7	Bradford Methode





## - Probandeneinwilligung -

Name:

Geburtsdatum:

Adresse:

Telefonnummer

wurde von Herrn/Frau \_\_\_\_\_ über Ziel und Ablauf der Studie informiert:  
Name Aufklärender

### Pilotstudie zum Vergleich von zwei Geräten und zwei Atemmustern bei der Gewinnung von exhaliertem Atemwegkondensat.

Ich wurde über die obige Studie aufgeklärt. Ich habe den Inhalt der Aufklärung verstanden und zur Kenntnis genommen, dass ich bei weiteren Fragen jederzeit den Studienleiter Dr. A.R. Koczulla<sup>1</sup> ansprechen kann. Mir ist bekannt, dass ich die Untersuchung jederzeit, ohne Nennung von Gründen und ohne persönliche Nachteile, beenden kann. Ich werde dies dem Studienleiter sofort mitteilen.

Hiermit erkläre ich meine Einwilligung zur freiwilligen Teilnahme an der Untersuchung.

\_\_\_\_\_  
Ort, Datum

\_\_\_\_\_  
Unterschrift Proband

\_\_\_\_\_  
Ort, Datum

\_\_\_\_\_  
Unterschrift Aufklärender

<sup>1</sup> Klinik für Innere Medizin, Schwerpunkt Pneumologie der Philipps-Universität Marburg, Baldingerstraße, 35033 Marburg, Tel. +49 (0) 6421- 5864956

## Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Claus Vogelmeier für die Möglichkeit, diese Arbeit in den Einrichtungen seines Instituts zu verwirklichen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Andreas Rembert Koczulla für die Bereitstellung des Dissertationsthemas sowie für die kompetente und konstruktive wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit. Herr Prof. Dr. Andreas Rembert Koczulla ermöglichte mir außerdem die Teilnahme an wissenschaftlichen Kongressen. Dafür möchte ich mich herzlich bei ihm bedanken. Herrn Dr. med. Timm Greulich danke ich für die kompetente Unterstützung bei der statistischen Auswertung meiner Daten.

Christian Herr, Christian John sowie Janine Koepke danke ich für die geduldige Einweisung in der Durchführung der Western Blot und ELISA Untersuchungen sowie für die hilfreichen Ratschläge und Anregungen während der Versuchsdurchführung.

Ich möchte mich herzlich bei Annette Püchner, Thomas Damm und Viktor Kotke für deren stets freundliche Hilfsbereitschaft bei allen organisatorischen Fragen bedanken.

Sarah Noeske und Akira Hattesoehl danke ich für ihre wertvollen Tipps und Anregungen.

Meinem Ehemann Christoph Schober danke ich für seine motivierende Begleitung während meiner gesamten Studien- und Promotionszeit sowie für seine geduldige Hilfe bei allen technischen Schwierigkeiten während des Niederschreibens der Dissertation.

Ganz besonders möchte ich meinen Eltern dafür danken, dass sie mir dieses Studium ermöglicht haben. Ich danke ihnen von Herzen für ihr Verständnis, ihre Geduld sowie ihre aufmunternden Worte während meiner gesamten Studien- und Promotionszeit.

## **Verzeichnis meiner akademischen Lehrerinnen und Lehrer**

Meine akademischen Lehrerinnen und Lehrer waren die Damen und Herren in Marburg:

Bartsch, Bauer, Baum, Becker A., Becker K., Becker S., Behr, Berger, Bien, Bolm, Cetin, Czubayko, Daut, Dettmeyer, Dietrich, Dodel, Ellenrieder, Engenhardt-Cabillic, Feuser, Fuchs- Winkelmann, Görg C., Gress, Grosse, Grundmann, Grzeschik, Hertl, Heverhagen, Hofmann, Holland, Hoyer, Jerrentrup A., Kann, Kill, Klingmüller, Klose, König, Kolb-Niemann, Koolmann, Kircher, Kühnert, Lill, Lohoff, Lüers, Maier, Maisch, Maisner, Moosdorf, Moll, Mueller, Müller, Neubauer, Neumüller, Nimsky, Ocker, Oertel, Oliver, Opitz, Pagenstecher, Renz, del Rey, Richter, Riera, Röhm, Ruchholz, Schade, Schäfer, Schmidt, Schneider, Seifart, Seitz, Sekundo, Steiniger, Stempel, Tackenberg, Vogelmeier, Wagner, Waldegger, Weihe, Werner, Westermann, Wilhelm, Wulf, Zemlin, Zovko.