

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

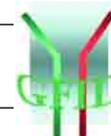
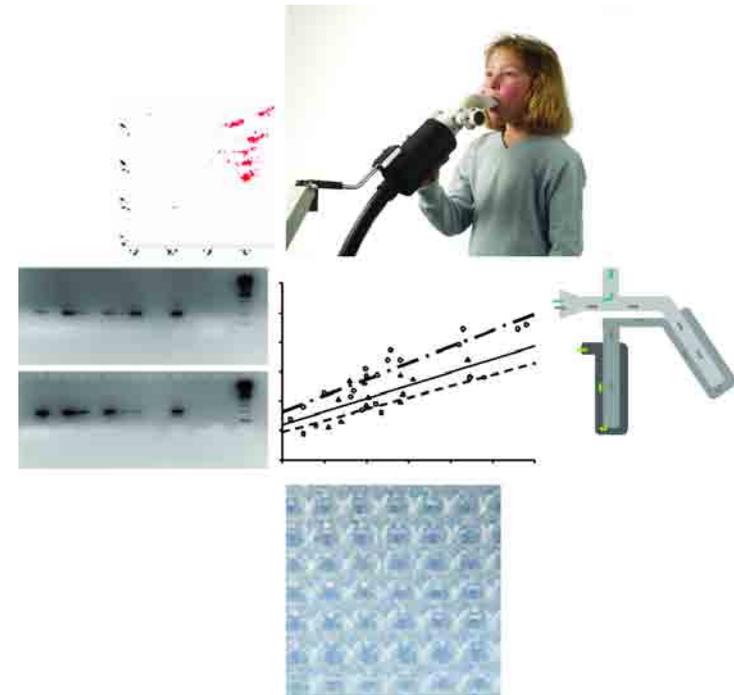
In der vorliegenden Arbeit werden sowohl methodische Aspekte der Atemkondensatentstehung als auch verschiedene Marker auf ihre Bedeutung bei unterschiedlichen Lungenerkrankungen untersucht. Schwerpunkte dabei sind die Charakterisierung des aktuellen Entzündungsgeschehens bei akutem Lungenversagen oder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

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



Christian Geßner

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



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

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

An
der Medizinischen Fakultät
des Universitätsklinikums Leipzig
angefertigte

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

vorgelegt von

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

Bibliographische Beschreibung

Dr. Geßner, Christian

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

Universität Leipzig, Habilitation.

130 S., 455 Lit., 17 Tab., 17 Abb.

Referat:

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

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

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

Inhaltsverzeichnis

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

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

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

Kapitel 1

Einführung

1.1 Die bronchoalveoläre Lavage als invasive diagnostische Methode

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

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

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

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

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

Tabelle 1.1: Aussagewert von BAL-Ergebnissen bei verschiedenen Erkrankungen

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

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

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

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

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

1.2 Nicht-invasive Diagnostik in der Pneumologie

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

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

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