

Atemkondensat: Eine neue Matrix zur Erfassung entzündlicher Veränderungen der Atemwege/Lunge^{*}

Aktuelle Aspekte aus der Umwelt- und Arbeitsmedizin

EBC: A New Matrix for Assessment of Airway and Lung Inflammation
Current Aspects of Environmental and Occupational Medicine

Autoren

F. Hoffmeyer, M. Raulf-Heimsoth, R. Merget, T. Brüning

Institut

BGFA – Forschungsinstitut für Arbeitsmedizin der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung,
Institut der Ruhr-Universität Bochum

eingereicht 26. 11. 2008
akzeptiert nach Revision
20. 1. 2009

Bibliografie

DOI 10.1055/s-0029-1214981
Pneumologie 2009; 63:
426–432 © Georg Thieme
Verlag KG Stuttgart · New York
ISSN 0934-8387

Korrespondenzadresse

Dr. med. Frank Hoffmeyer
BGFA
Bürkle-de-la-Camp-Platz 1
44789 Bochum
hoffmeyer@bgfa.de

Zusammenfassung



Viele umwelt- und berufsbedingte Schadstoffe gelangen durch die Atemwege in den menschlichen Organismus und können entzündliche Prozesse induzieren. Dabei sind Entzündungsreaktionen grundlegende pathophysiologische Prozesse in der Genese von Atemwegserkrankungen wie dem Asthma oder der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung. Der Einsatz nicht-invasiver Methoden zur Bestimmung der zugrunde liegenden Inflammation kann bei der Diagnosefindung, Beurteilung der Erkrankungsschwere sowie von therapeutischen Interventionen hilfreich sein. Von diesen Methoden ist die Messung des Stickstoffmonoxid-Gehaltes in der ausgeatmeten Luft am besten validiert. Sie wird zunehmend auch bei klinischen Fragestellungen zur Asthmaerkrankung eingesetzt. Das Atemkondensat (EBC) entspricht der flüssigen Phase der ausgeatmeten Luft, welche ebenfalls nicht-invasiv durch Kühlung gewonnen wird. Das EBC ist, vergleichbar mit Blut oder Urin, dabei selbst kein Marker, sondern eine Matrix, in der vielfältige Substanzen enthalten sind. Änderungen des Säure-Basen-Haushalts, oxidativer Stress oder Entzündungsreaktionen können durch verschiedene Biomarker im EBC erfasst werden. Weiterhin sind methodische Limitationen anzuführen; die Interpretation der Ergebnisse wird dadurch beeinträchtigt, dass sich die Sammelsysteme in ihrer Effizienz unterscheiden und die eingesetzten analytischen Verfahren im Bereich ihrer Nachweisgrenzen arbeiten. Trotz ermutigender Ergebnisse steht die unzureichende Standardisierung aktuell einem breiten klinischen Einsatz entgegen. EBC könnte gerade im Bereich der Präventivmedizin eine diagnostische Bereicherung darstellen, da lokale entzündliche Veränderungen häufig funktionellen

^{*} In Anlehnung an: Hoffmeyer F, Raulf-Heimsoth M, Brüning T. Exhaled breath condensate and airway inflammation. Curr Opin Allergy Clin Immunol 2009; 9: 16–22.

Abstract



For many environmental and occupational pollutants the respiratory system represents the route of entry. Inflammation is a fundamental process in the pathophysiological cascade leading to respiratory diseases such as asthma or chronic obstructive pulmonary disease. Non-invasive inflammatory monitoring may assist in the diagnosis as well as assessments of severity and response to treatment. Of these, exhaled nitric oxide is the best validated constituent and is used for assessing airway inflammation in clinical practice, particularly in patients with asthma. Exhaled breath condensate (EBC) is the liquid phase of the exhaled breath sampled by cooling. EBC, like blood or urine, is not a marker itself but a matrix in which a wide variety of substances have already been detected. EBC biomarkers reflect acid stress, oxidative stress, or inflammation. There are still many methodological limitations and the interpretation of findings is hampered by the fact that the most widely used devices differ significantly in their collection efficiency for markers of interest and the analytical technology employed is often near the limit of detection. In spite of promising data, standardisation of the already existing procedures is required for the implementation of EBC in clinical practice. EBC might be of particular interest in preventive medicine since adverse inflammatory processes often precede changes in lung function. Concerning the adverse effects of air pollution, there is a special focus on markers reflecting oxidative stress since air pollutants have the ability to drive free radical reactions. This overview focuses on recent data on EBC obtained from articles concerning applications of exhaled breath analysis in environmental and occupational medical research.

Veränderungen vorausgehen. Im Zusammenhang mit der Untersuchung von gesundheitlichen Beeinträchtigungen durch Luftverschmutzung liegt ein Schwerpunkt auf Markern des oxidativen Stresses, da Partikel in der Lage sind, die Bildung freier Radikale zu begünstigen. Diese Übersicht stellt aktuelle Forschungsergebnisse zum Einsatz des EBC im Rahmen umwelt- und arbeitsmedizinischer Fragestellungen dar.

Einleitung

Die Atemwege stellen eine wichtige Eintrittspforte für viele umwelt- und berufsbedingte Schadstoffe dar. Die durch äußere Faktoren getriggerte Entzündung ist ein wichtiger gemeinsamer Schritt in der pathophysiologischen Kaskade, die zu den Atemwegserkrankungen Asthma bronchiale und chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (COPD) führt [1]. Dennoch unterscheiden sich Asthma und COPD in der Pathophysiologie beträchtlich, insbesondere bezüglich der dominierenden Entzündungszellen und Mediatoren [2]. Gegenwärtig werden induziertes Sputum, Bronchiallavage oder im Rahmen einer Bronchoskopie gewonnene Lungenbiopsien für die direkte Untersuchung von Atemwegsentzündungen herangezogen. Diese Techniken sind allerdings mehr oder weniger invasiv bzw. für den Patienten unangenehm. Im Gegensatz dazu ist die Gewinnung von Atemkondensat (exhaled breath condensate, EBC) eine vollkommen nicht-invasive Methode, die darüber hinaus den Vorteil hat, den zugrunde liegenden Krankheitsprozess durch die Probengewinnung nicht zu beeinflussen. EBC ist daher eine ideale Matrix für wiederholte Untersuchungen von Biomarkern. Damit werden die Beurteilung des zeitlichen Verlaufs einer entzündlichen Reaktion und die Untersuchung von pathophysiologischen Prozessen möglich. Einsatzbereiche dieser Methode sind ferner Interventionsstudien oder Langzeitstudien.

EBC ist die durch Kühlung gewonnene flüssige Phase der ausgeatmeten Luft. Sie wird zusammen mit der gasförmigen Phase exsudiert, die flüchtige Substanzen wie Stickoxid, Kohlenmonoxid und Kohlenwasserstoff enthält. Das ausgeatmete Stickoxid (FeNO) ist der bestvalidierte Gasbestandteil [3] und wird in der Klinik insbesondere bei Asthmapatienten zur Diagnose von Atemwegsentzündungen eingesetzt [4]. EBC besteht größtenteils aus Wasserdampf. Daneben können sich flüchtige Substanzen, aber auch nicht-flüchtige Bestandteile wie z.B. Proteine, die in Tröpfchen transportiert werden, im Rahmen der Probengewinnung im Kondensat auflösen.

Es wurde bereits eine große Anzahl an Substanzen im EBC entdeckt, von denen die meisten schon aus induziertem Sputum oder BAL-Untersuchungen bekannt sind [5]. EBC für sich genommen ist kein Biomarker; es stellt, vergleichbar einer Blut-, Urin- oder BAL-Probe, eine Matrix dar. Da EBC keine zellulären Bestandteile enthält, stützt sich die Erfassung auf Substanzen bzw. Stoffwechselprodukte, die von Zellen in der Lunge oder den Atemwegen freigesetzt werden.

Die oxidative Belastung ist funktioneller Bestandteil der Pathophysiologie des entzündlichen Prozesses und steht in enger Beziehung zum NO-Stoffwechsel sowie der nitrosativen Belastung [Übersicht in 6]. Verbreitete Indikatoren in der Untersuchung von Atemwegserkrankungen sind u.a. Wasserstoffperoxid (H_2O_2), NO-Produkte [7], Prostanoid, Leukotriene [8], Isoprostan [9] und der pH-Wert [10] (► Tab. 1).

Andere im EBC festgestellte Komponenten sind u.a. Proteine, DNA, Keratin, Elektrolyte, Spurenelemente und Metalle. Die Identifizierung dieser Bestandteile ist abhängig von der ange-

Tab. 1 Auswahl von Biomarkern im EBC, welche für die Diagnostik, die Erfassung des Schweregrads oder die Verlaufsbeurteilung einer Erkrankung der Atemwege bzw. Lunge genutzt werden.

Prozess	Biomarker im EBC	Nachweismethode
Entzündung	<i>Leukotriene (LT)</i> – LTB ₄ – Cys-LT (LTC ₄ , LTD ₄ , LTE ₄)	EIA, GC/MS, LC/MS EIA, GC/MS
	<i>Prostaglandine (PG)</i> – PGE ₂ – PGF _{2α}	EIA, GC/MS EIA
	<i>Cytokine</i> – IL-1β – IL-4 – IL-6 – IL-8 – TNFα – IFN-γ	EIA, Multiplex Bead Array ELISA, Protein-Array, Durchflusszytometrie EIA, Multiplex Bead Array ELISA, Protein-Array, Multiplex Bead Array ELISA, Protein-Array, Multiplex Bead Array EIA, Durchflusszytometrie
	<i>Wasserstoffionen-Konzentration (pH)</i>	pH-Meter, Blutgas-Messgerät – unmittelbar nach EBC-Sammlung – nach Argon-Behandlung – nach CO ₂ -Standardisierung
Oxidativer Stress	Hydrogenperoxid	Fluorimetrie, Kolorimetrie, Lumineszenzanalyse
	<i>Marker der Lipid-peroxidation</i> – 8-Isoprostan – Malondialdehyd	EIA, GC/MS EIA, HPLC, GC/MS
Nitrosativer Stress	Nitrit	Fluorimetrie, Kolorimetrie, Lumineszenzanalyse
	Nitrat	Fluorimetrie, Kolorimetrie, Lumineszenzanalyse, Ionen-Chromatographie
	Nitrotyrosin	EIA, HPLC, GC/MS, LC/MS
	Nitrosothiole	Fluorimetrie, Kolorimetrie

Abkürzungen: IL, Interleukin; TNF-α, Tumor Nekrosefaktor-α; IFN, Interferon; EIA, Enzyme Immuno Assay; ELISA, Enzyme Linked Immunosorbent Assay; GC/MS, Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung; LC/MS, Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung; HPLC, Hochleistungsflüssigkeitschromatographie.

wandten Analyseverfahren und ist limitiert durch die methodische Nachweisgrenze. Empfehlungen zur EBC-Gewinnung und mögliche Fehlerquellen der Technik sind im ATS/ERS Task Force-Bericht zusammengefasst [11].

Abhängigkeit der EBC-Beschaffenheit von der Gewinnungsmethode

Die Zusammensetzung des Kondensats hängt u. a. wesentlich von der jeweiligen apparativen Ausstattung und der Kühltemperatur ab [12]. Heutzutage stehen neben einer Reihe von Eigenanfertigungen auch verschiedene kommerziell erhältliche Sammelgeräte zur Verfügung [13]. Jüngere Studien zeigen, dass der Nachweis von häufig verwendeten Biomarkern durch die Materialeigenschaften der verwendeten Kondensations- und Sammeloberflächen beeinflusst werden. Die Reproduzierbarkeit des Biomarker-Nachweises im EBC von gesunden erwachsenen Probanden wurde jedoch nicht durch die Art des Kondensierungsgerätes beeinflusst [14]. Die Referenzwerte dieser Marker mit den jeweils an-

gewandten Methoden sind in einer hervorragenden Zusammenfassung aufgelistet [15]. In Studien mit EBC als Matrix fand sich keine Methode der Probengewinnung, die für alle zur Untersuchung anstehenden Bestandteile optimal ist. Daher sollte bei der Auswertung berücksichtigt werden, dass die jeweils angewandten Methoden häufig einen Kompromiss darstellen [16]. Gleiches gilt auch bezüglich Sensitivität und Spezifität der eingesetzten analytischen Verfahren mit Bezug auf Verfügbarkeit, Kosten und Personaleinsatz [17].

Bedeutung von Entzündungsmarkern im EBC beim Nachweis umweltbedingter Einflüsse

Durch funktionelle Reserven des Herz-Kreislauf-Systems werden Beschwerden häufig erst manifest, wenn ein gewisser Schweregrad der Erkrankung vorliegt. Auch Lungenfunktionsuntersuchungen sind bei Frühstadien einer Atemwegserkrankung meist nicht aussagekräftig. Hier kann die Messung von Biomarkern im EBC hilfreich sein, da sie entzündliche Veränderungen ggf. bereits im asymptomatischen Stadium erfasst und dadurch adverse Wirkungen durch Schadstoffe in der Umwelt oder am Arbeitsplatz belegt. Insbesondere Marker der oxidativen Belastung stehen im Vordergrund des Interesses, da Luftschadstoffe bekanntermaßen Reaktionen freier Radikale fördern können.

In einer Langzeitstudie konnte bei Asthmatikern ein Zusammenhang zwischen klinischen Symptomen und erhöhten Holzrauchschadstoffen in der Luft beobachtet werden. Mittels EBC-pH oder H_2O_2 konnte ein Einfluss auf die Atemwegsentszündung oder die oxidative Belastung nicht nachgewiesen werden, obwohl eine signifikant höhere Exposition durch erhöhte 1-Hydroxypyren-Konzentrationen im Urin an Tagen mit erhöhter Luftverschmutzung aufgezeigt wurde [18]. Während der Haupt-Smogsaison war der pH-Wert im EBC bei Leistungssportlern nach sportlicher Betätigung im Freien unverändert. Allerdings lagen die pH-Werte im Vergleich zu Kontrollgruppen bzw. früher publizierten Daten bereits bei der Ausgangsmessung niedriger. Dies deutet darauf hin, dass wiederholte sportliche Betätigung ein Grund für die Übersäuerung der Atemwege sein kann [19]. Eine mäßige Betätigung auf einem Laufband in einem Innenraum kann zu einer persistierenden Erhöhung des pH-Wertes bei gesunden jugendlichen Probanden führen [20]. Im Zusammenhang mit arbeitsmedizinischen Untersuchungen gewinnt dieses Ergebnis möglicherweise an Bedeutung, da Arbeit im Normalfall mit mehr oder weniger starker körperlicher Aktivität verbunden ist. Die betreffenden Biomarker sollten demnach bei der Analyse beruflich bedingter Entzündungsprozesse unter Berücksichtigung des potenziellen Störfaktors „körperliche Betätigung“ untersucht werden. Auch Umwelteinflüsse (z.B. Temperatur und relative Luftfeuchtigkeit) können den EBC-pH-Wert beeinflussen [21]. Nach Ankunft einer kalten und feuchten Wetterfront sank der EBC-pH-Wert beträchtlich, während eine warme, trockene Front zu einem Anstieg führte. Dies mag möglicherweise damit zusammenhängen, dass Infektionen des Respirationstraktes bei kaltem Wetter häufiger auftreten.

Ozon (O_3) ist ein hochreaktives Gas, das zur oxidativen Belastung beiträgt. Malondialdehyd (MDA) wird durch die Reaktion von Sauerstoffradikalen mit mehrfach ungesättigten Fettsäureresten von Phospholipiden gebildet und stellt somit einen Marker des oxidativen Stresses dar. In einer Beobachtungsstudie von 107 Kindern mit Asthma, die in Mexiko City wohnen, fand sich ein eindeutiger Zusammenhang der MDA-Konzentration im EBC mit

dem Grad der Luftverschmutzung (bezogen auf $\text{PM}_{2,5}$, Ozon und NO_2) [22]. Weiter fand sich eine signifikante Korrelation der MDA-Konzentration mit der Lungenfunktion und den erhöhten IL-8-Konzentrationen in der Nasenspülflüssigkeit. Die Wertigkeit von EBC als Matrix für die Untersuchung von verkehrsbedingten Schadstoff-Auswirkungen bestätigte sich durch Messungen des pH-Werts im EBC. Der pH-Wert zeigte dabei eine signifikante inverse Korrelation zur MDA-Konzentration. Das Einatmen von Ultrafein- und Feinstaubpartikeln während körperlicher Betätigung im Freien senkte das EBC-Nitrit und das alveoläre NO in Übereinstimmung mit der beobachteten Beeinträchtigung der Lungenfunktion [23]. Die Tatsache, dass parallel dazu ein hoher MDA-Anstieg beobachtet wurde, lässt auf eine durch Peroxynitrit ausgelöste Lipidperoxidation schließen. Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass MDA ein geeigneter Marker der oxidativen/nitrosativen Belastung unter klinischen Bedingungen ist, obwohl MDA nur ca. 1 % der Lipidperoxide ausmacht.

Die Kinetik spezifischer Biomarker in Bezug zur Lungenfunktion und Atemwegsneutrophilie als Reaktion auf eine inhalative Exposition gegenüber Ozon wurde umfassend untersucht [24]. Je nach Veränderung der Lungenfunktion nach Einatmen von 0,35 ppm O_3 wurden Freiwillige in zwei Gruppen eingeteilt (sensitiv und nicht-sensitiv). Beide Gruppen zeigten einen ähnlichen Höchstwert der NO-Metaboliten vier Stunden nach kontrollierter O_3 -Inhalation, was auf eine wirksame O_3 -Exposition schließen lässt. Nach Inhalation von O_3 zeigte allerdings nur die sensitive Gruppe eine erhöhte Arachidonsäurekonzentration, gemessen an den LTB_4 - und 8-Isoprostano-Konzentrationen. Die erhöhte LTB_4 -Konzentration während des Untersuchungszeitraums zeigt, dass die enzymatische Metabolisierung via Lipoxygenase den Hauptweg darstellt, während dem Cyclooxygenase-1-Weg oder den nicht-enzymatischen Reaktionen mit freien Radikalen eine untergeordnete Rolle zukommt. Obwohl der Entzündungsmarker IL-8 in dieser Studie nicht nachgewiesen werden konnte, erwies er sich als brauchbar in einem größeren Kollektiv von 207 nicht rauchenden Arbeitnehmern, die über respiratorische Symptome klagten, die vermutlich mit Wasserschäden in einem Bürogebäude zusammenhingen [25]. Nur für IL-8 ergab sich ein Zusammenhang mit den Symptomen und dem ärztlich diagnostizierten Asthma. NO und Nitrit im EBC waren in dieser Studie zur Evaluierung bzw. Objektivierung gesundheitlicher Beeinträchtigungen nicht hilfreich.

Bedeutung von Entzündungsmarkern im EBC beim Nachweis berufsbedingter Einflüsse

Etwa 15 % aller obstruktiven Atemwegserkrankungen sind auf berufliche Einwirkungen zurückführbar. Die Noxen können in Form von Gasen, Dämpfen, Stäuben oder Rauchen vorkommen, wobei pathophysiologisch allergische von chemisch-irritativen und toxisch wirkenden Arbeitsstoffen zu unterscheiden sind. Untersuchungen weisen darauf hin, dass hinsichtlich der Verursachung einer COPD Stäube von größerer Relevanz sein können als Gase oder Dämpfe.

Entzündungsmarker im EBC bei COPD-Patienten

Die COPD ist eine Erkrankung mit vorwiegend neutrophiler Entzündung und häufig bei Rauchern. In der Regel wird eine COPD erst diagnostiziert, wenn die Lungenfunktionsparameter bereits

deutliche Einschränkungen zeigen. Bei Personen mit COPD sind Veränderungen verschiedener Biomarker, die sowohl oxidative als auch nitrosative Belastung reflektieren, beschrieben. Allerdings ist bei Studien zur COPD der Tabakkonsum ein wichtiger Confounder. Daher stellt sich die Frage, ob die beobachteten Veränderungen allein mit den Rauchgewohnheiten in Zusammenhang stehen oder ob sie auch zur Beschreibung der tabakinduzierten Lungenschäden herangezogen werden können. Bei COPD-Patienten fanden sich im Vergleich zu Kontrollgruppen erhöhte FeNO-Konzentrationen; innerhalb der COPD-Gruppe jedoch ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Nichtrauchern, ehemaligen Rauchern und aktuellen Rauchern. Im Gegensatz dazu fanden sich in den nach Raucher-Status stratifizierten Untergruppen signifikante Unterschiede der NOx-Konzentrationen im EBC [30]. NOx scheint demnach bei der Beobachtung Tabakrauch-assoziiierter Atemwegserkrankungen bei COPD-Patienten der geeignetere Marker zu sein.

Im EBC von stabilen COPD-Patienten findet sich eine erhöhte neutrophile und niedrigere eosinophile chemotaktische Aktivität im Vergleich zu Kontrollgruppen, wobei die neutrophile chemotaktische Aktivität in weiteren Untersuchungen zumindest teilweise auf erhöhte IL-8-Konzentrationen zurückgeführt werden konnte [31]. Ein Charakteristikum der Neutrophilen-Aktivierung ist ihr respiratorischer Burst, bei dem die Myeloperoxidase (MPO) die Umwandlung von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Chloridionen in Hypochlorsäure (HOCl) katalysiert. Die Bedeutung des oxidativen Stresses in der Pathophysiologie der COPD wurde durch den Nachweis von Lipidperoxidationsprodukten bestätigt. Von diesen wird insbesondere 8-Isoprostan häufig als Marker eingesetzt; seine klinische Bedeutung ist jedoch weitgehend ungeklärt.

Eine Beziehung zwischen 8-Isoprostan und einer Beeinträchtigung der Lungenfunktion oder einer neutrophilen Entzündung im induzierten Sputum konnte bei Patienten mit stabiler COPD unterschiedlichen Schweregrades nicht belegt werden [32]. Jedoch fand sich eine deutliche Korrelation zwischen 8-Isoprostan und emphysematischen Veränderungen im HRCT sowie eine signifikante Assoziation zwischen Dyspnoegrad und 8-Isoprostan. In einer jüngeren Studie war bei COPD-Patienten, die mindestens dem Schweregrad 2 nach der GOLD-Klassifikation angehörten, ein Bezug zwischen EBC-Nitrit und lungenfunktionsanalytisch nachgewiesener Lungenüberblähung herzustellen. Im Gegensatz dazu fand sich keine Korrelation des Nitritgehaltes im EBC mit dem Ausmaß der Atemwegsobstruktion oder mit proinflammatorischen Zytokinen [33].

Entzündungsmarker im EBC bei Patienten mit Asthma



Die Ermittlung des klinischen Stellenwerts der EBC-Analyse beim Asthma bronchiale ist Inhalt aktueller Untersuchungen [34,35]. Frühere Studien zeigten im EBC von Asthmatikern einen im Vergleich zu gesunden Probanden erniedrigten pH-Wert, der durch eine antiinflammatorische Therapie zu modulieren war. Ein signifikant niedrigerer pH-Wert im EBC und erhöhte 8-Isoprostan-Konzentrationen im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen konnten in einer weiteren Arbeit bestätigt werden. Bei diesen Patienten mit geringgradig ausgeprägtem Asthma waren jedoch beide Marker nicht mit der Lungenfunktion korreliert [36].

Die diagnostische Wertigkeit des pH-Wertes im EBC wurde kürzlich in einer Studie bei symptomatischen Grundwehrdienstleistenden mit Verdacht auf das Vorliegen einer asthmatischen Er-

krankung analysiert [37]. Die Patienten zeigten Asthma-ähnliche Symptome und vor der Bestätigung der Diagnose durch ausgewiesene Spezialisten wurde der pH-Wert im EBC als Screening-Werkzeug evaluiert. Zwar fanden sich signifikante Unterschiede zwischen den Patienten mit und ohne Asthmadignose, jedoch zeigte sich ein beträchtliches Überschneiden der pH-Werte beider Gruppen. Ein verlässlicher Grenzwert ließ sich nicht ermitteln. In einer anderen epidemiologischen Studie zeigte der EBC-pH-Wert keine Unterschiede bei Kindern, die von den Eltern als unauffällig oder mit Asthma-verdächtigen Symptomen eingestuft wurden [38].

Verschiedene Marker wurden in einem Panel hinsichtlich der Wertigkeit bezüglich der Asthmadignostik, der Einschätzung des Schweregrades und der Asthmakontrolle bei Kindern untersucht [39]. In einer Studie, die sämtliche im EBC bestimmten Marker multivariat analysierte, erwies sich nur IL-4 als signifikanter Indikator für das Vorliegen einer asthmatischen Erkrankung. Die Kontrolle des Asthmas wurde am besten durch NO, 8-Isoprostan, IFN- γ und IL-4 widerspiegelt, wohingegen NO, 8-Isoprostan, Nitrat und Nitrit die besten Indikatoren bezüglich der Einschätzung des Schweregrades der Erkrankung waren. In dieser Studie erwies sich H_2O_2 nicht als geeigneter Marker.

In einer Untersuchung erwachsener Asthmatiker im Alter von 18 bis 64 Jahren wurde hingegen eine inverse Beziehung zwischen der H_2O_2 -Konzentration im EBC und der FEV₁ ermittelt [40]. Für die beiden Asthmasubgruppen, d.h. Personen mit intermittierendem bzw. persistierendem Asthma, fanden sich jeweils eine inverse Korrelation zwischen der H_2O_2 -Konzentration und dem pH-Wert im EBC. Die H_2O_2 -Konzentration und der pH-Wert im Atemkondensat bestätigten sich dabei als gute nicht-invasive Prognosemarker für ein Asthma unterschiedlichen Schweregrades (persistierend oder intermittierend). Auch jüngere Ergebnisse legen eine Assoziation von erhöhtem oxidativen Stress mit einer akuten Asthma-Exazerbation nahe [41].

FeNO hat sich in der Asthma-Diagnostik bereits etabliert. Allerdings fand sich auch eine Beziehung zwischen Atopie und erhöhtem FeNO ohne gleichzeitiges Vorliegen eines asthmatischen Krankheitsbildes [42]. Die Bedeutung des Atopie-Status beim diagnostischen Einsatz von FeNO wurde bereits ausführlich diskutiert [43]. Darüber hinaus wird NO durch die anti-inflammatorische Therapie beeinflusst und kann daher nicht als diagnostischer Marker bei Kindern unter topischer Steroid-Therapie eingesetzt werden. Unter diesen Umständen könnten Marker im EBC von besonderem Nutzen sein. Zum Beispiel waren bei Asthmatikern Cysteinyl-Leukotriene (cys-LTs) im EBC signifikant erhöht, unabhängig von einer anti-inflammatorischen Therapie oder einer Sensibilisierung [44]. Eine Reihe weiterer Studien belegt erhöhte Leukotrienkonzentrationen im EBC bei Asthmatikern [Übersicht in 45].

Entzündungsmarker im EBC nach Allergeninhalation



Der spezifische Provokationstest mit einem Allergen gilt häufig als „Goldstandard“ in der Diagnose berufsbedingter asthmatischer Erkrankungen und hat seinen Platz insbesondere bei der gutachterlichen Zusammenhangsfrage. Sein Nutzen ist begrenzt durch die Tatsache, dass für eine valide Aussage wiederholte Lungenfunktionstests über mehrere Stunden notwendig sind, um auch eine verzögerte Antwort zu dokumentieren. Die Interpretation wird erschwert bzw. ist unmöglich, wenn die Patienten einer ständigen antiobstruktiven Therapie bedürfen oder Provoka-

Tab. 2 Aktuelle Studien aus der Umwelt- und Arbeitsmedizin zum Einsatz von EBC-Markern.

Studie	Exposition	Kollektiv (Alter)	Anzahl	EBC-Marker	Anmerkungen
Epton MJ 2008 [18]	Holzrauch	Studenten (12 – 18 J.) – ohne Asthma – mit Asthma	67 26	pH, H ₂ O ₂ unverändert pH, H ₂ O ₂ unverändert	
Kullmann 2008 [21]	So., kalte, feuchte Luft So., warme, trock. Luft	Gesunde	12	pH abnehmend pH zunehmend	
Romieu 2008 [22]	Ozon, Feinstaub	Kinder mit Asthma (Mittel 9,5 J.)	107	MDA erhöht	MDA korreliert mit FEV ₁ , Expositionshöhe sowie IL-8 in NAL
Rundell 2008 [23]	Ultrafein- und Feinstaub, körp. Belastung	Gesunde (Mittel 20,5 J.)	12	Nitrit abnehmend MDA zunehmend	Abnahme des alveolären NO
Alfaro 2007 [24]	Ozon 0,35 ppm, körp. Belastung	Gesunde (18 – 30 J.)	8	LTB ₄ , 8-Isoprostan zune- mend bei Ozon-Sensitiven	Ozon-Sensitiv = Abnahme FEV ₁ > 20 %
Akpinar-Elci 2008 [25]	Wasserschaden	Nichtraucher (Mittel 47 J.)	207	IL-8 höher bei sympto- matischen Personen	IL-8 korreliert nicht mit FeNO
Fireman 2008 [27]	Schweißrauche Al/Fe Ca/Cr/Fe/Pb/Ni	asymptomatische Schweißer vs. Kontrollen (Mittel 36 J.) (Mittel 50 J.)	30 16	H ₂ O ₂ höher, pH gleich H ₂ O ₂ höher, pH erniedrigt	
Cagliari 2006 [28]	Chrom	Chrom-Arbeiter (Mittel 37,7 J.) vor/nach Schicht	24	H ₂ O ₂ zunehmend MDA zunehmend	H ₂ O ₂ , MDA korrelieren mit Cr-Konzentrationen im EBC
Klusackova 2008 [46]	Spezifische Allergen- provokation	Asthmatiker, heterogen (Mittel 44 J.)	47	LTB ₄ , cys-LTs, 8-Isoprostan kein einheitliches Reaktionsmuster	
Ono 2008 [47]	Spezifische Allergen- provokation	Asthmatiker, homogen D. pteronyssinus (18 – 55 J.)	31	Cys-LTs, PGD ₂ erhöht bei Patienten mit asthma- tischer Frühreaktion	

Abkürzungen: EBC: exhaled breath condensate, FeNO: ausgeatmetes Stickoxid, FEV₁: Forciertes Einsekundenvolumen, H₂O₂: Wasserstoffperoxid, IL-8: Interleukin-8, LT: Leukotrien, MDA: Malondialdehyd, NAL: Nasallavage, PG: Prostaglandin, So.: Sommer.

tionstests aufgrund fortgeschrittener Atemwegsobstruktionen nicht durchgeführt werden können. Patienten mit Verdacht auf eine berufsbedingte Atemwegserkrankung zeigten bei Durchführung einer arbeitsplatzbezogenen Provokation eine hohe interindividuelle Bandbreite der Konzentrationen von LTB₄, cys-LTs und 8-Isoprostan im EBC. Ein einheitliches Reaktionsmuster konnte nicht abgeleitet werden [46], jedoch erfolgten diese Provokationen mit unterschiedlichen Allergenen. Bei Untersuchungen mit einem homogenen Patientenkollektiv mit gesichertem Asthma gegenüber *Dermatophagoides pteronyssinus* zeigte sich nach Allergenprovokation bei den reaktiven Patienten eine isolierte frühe asthmatische Reaktion (early asthmatic response – EAR) [47]. Bei Patienten mit EAR waren nach Allergeninhalation sowohl die cysLTs als auch das PGD₂ im EBC deutlich erhöht. Diese erhöhten Werte für cysLTs und PGD₂ korrelierten miteinander und mit dem Ausmaß des FEV₁-Abfalls. Bei Patienten mit Allergen-induzierter EAR könnte EBC daher als Matrix für die Evaluation einer Mastzell-getriggerten Mediatorfreisetzung dienen.

Metallnachweis im EBC zur Erfassung beruflicher Expositionen

In Bezug auf die Physiologie des Respirationstraktes kann davon ausgegangen werden, dass in der Einatemluft enthaltene Substanzen sich ggf. auch im EBC niederschlagen. In diesem Kontext konnte mittels Analyse von Cytokeratinmustern bestätigt werden, dass der größte Gewichtsanteil von Proteinen im Atemkondensat aus Abschilferungen der Haut (Stratum corneum) stammt und mit der eingeatmeten Luft aufgenommen wird [26]. Insbe-

sondere bei Schweißarbeiten können auch Metalle in die Atemwege gelangen. Die Metallanalyse im EBC kann auch für die Beurteilung der Metalldosis im Vergleich zu Referenzwerten herangezogen werden und so das Ausmaß der Exposition verdeutlichen. Bei asymptomatischen Schweißern konnte durch Wasserstoffperoxid- und pH-Messung im EBC eine Entzündung im Bereich der Atemwege dokumentiert werden. Die Entzündungsreaktion wurde durch die verwendeten Materialien und Schweißtechniken und die daraus resultierenden Metallrauche und Gase moduliert [27]. Auch die Partikelbelastung und der Nachweis von Entzündungszellen im induzierten Sputum waren abhängig von Art und Länge des Schweißens. Eine gute Korrelation zwischen Chrom-Werten und Biomarkern der oxidativen Belastung (H₂O₂, MDA) fand sich ebenfalls im EBC von asymptomatischen Arbeitern mit Chrom-Exposition [28]. Auch bei COPD-Patienten fanden sich im Vergleich zu nicht rauchenden, gesunden Kontrollgruppen erhöhte Werte toxischer Metalle (Blei, Cadmium, Aluminium), während Eisen und Kupfer erniedrigt waren [29].

Schlussfolgerungen und Bewertung

Mit der nicht-invasiven Gewinnung von EBC steht eine neue Matrix zur Analyse inflammatorischer Prozesse bei Atemwegserkrankungen zur Verfügung. Die Analyse des EBC kann Hinweise für die Säurebelastung, den oxidativen Stress und lokale Entzündungsreaktionen geben. Die Interpretation der Ergebnisse wird allerdings durch eine eingeschränkte Standardisierung der verwendeten Methoden limitiert. So haben u.a. die verschiedenen Sammelgeräte, -techniken, Lagerungsbedingungen sowie Analy-

Dieses Dokument wurde zum persönlichen Gebrauch heruntergeladen. Vervielfältigung nur mit Zustimmung des Verlages.

severfahren Einfluss auf die Reproduzierbarkeit des Biomarker-nachweises im EBC. Fragen zur Standardisierung stehen weiterhin im Fokus aktueller Forschung. Es ist zu begrüßen, dass abgrenzbare methodische Einflussfaktoren in neueren Publikationen detailliert dokumentiert werden. Hierdurch wird die Interpretation individueller Ergebnisse bzw. der Abgleich mit anderen Studien erleichtert [15]. Die Wertigkeit des EBC-pH als einfacher integrativer Marker der Atemwegsentszündung ist gut belegt und das Vorliegen einer Lipidperoxidation kann durch den Nachweis von Substanzen wie Malondialdehyd oder 8-Isoprostan bestätigt werden. Für den pH-Wert gibt es mittlerweile hinreichend etablierte Normwerte [48].

An die Analysemethoden sind hohe Anforderungen zu stellen. Bei konventionellen Analysen sind nachgewiesene Bestandteile im EBC, wie z.B. verschiedenste Zytokine, häufig unterhalb oder nahe der Nachweisgrenze. Hier ist sicher immer wieder ein Kompromiss zwischen technisch Machbarem und vom Zeitaufwand oder unter Kostengesichtspunkten her realistischen Ansätzen zu suchen. Eine Probenanalyse mit negativem Nachweis eines Biomarkers kann dennoch im Sinne eines Screenings nützlich sein, da dieses Resultat zumindest eine Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze belegt.

EBC wird durch komplexe physikalische Vorgänge gebildet, die auf der Ebene des Untersuchten beispielsweise durch die Anatomie des Bronchialsystems, Atemtiefe oder Atemfrequenz moduliert werden können. Die Komplexität des Krankheitsbildes COPD wird durch die Lungenüberblähung als möglichen Confounder bei der Auswertung von Entzündungsmarkern im EBC unterstrichen. Ein weiterer klinischer Faktor ist der Atopie-Status bei der Untersuchung von Asthmapatienten.

Mit Verfügbarkeit neuer diagnostischer Tools für die Messung der Atemwegsentszündung stellt sich für den Kliniker die Frage nach der Wertigkeit für die Diagnostik, das Verlaufsmontoring sowie die Beurteilung therapeutischer Interventionen [49,50]. In diesem Rahmen sind neben Fragen zur Verfügbarkeit auch entsprechende Kosten-Nutzen-Betrachtungen anzuführen [51]. Die Analyse des Atemkondensats ist in der Umwelt- und Arbeitsmedizin aktuell noch wissenschaftlichen Fragestellungen vorbehalten. Einsatzgebiet ist in erster Linie die Erfassung von oxidativem Stress bzw. entzündlichen Veränderungen in den Atemwegen (► Tab. 2).

Dem EBC könnte besonders in der Prävention eine wichtige Rolle zukommen, da durch umwelt- oder berufsbedingte Schadstoffe ausgelöste entzündliche Prozesse häufig schon vor fassbaren Veränderungen der Lungenfunktion auftreten. Entzündliche Veränderungen können neben infektiösen Noxen durch verschiedenste mechanische, irritative, toxische oder allergische Einwirkungen getriggert werden. Eine spezifische Differenzierung im Sinne einer Diagnosestellung durch Nachweis bzw. Konzentrationsänderung eines einzigen Markers im Atemkondensat ist nicht zu erwarten. Jedoch ergibt sich durch die Analyse verschiedener Marker aus einer EBC-Probe die Möglichkeit zur Erfassung von Markerprofilen, die spezifische Expositionen bzw. Erkrankungen reflektieren. Der Stellenwert für Diagnostik, Verlaufsmontoring oder Therapiekontrolle lässt sich aktuell noch nicht bewerten. Die Erfassung von Biomarkern im EBC wäre aufgrund der fehlenden Invasivität in erster Linie eine wertvolle Ergänzung des Repertoires beim Screening auf berufsbedingte Einwirkungen. Für entsprechende arbeitsmedizinische Feldstudien sind preisgünstige und in der Anwendung einfache Geräte sowie eine praktikable Probenlogistik essenziell, um den breiteren Einsatz dieser innovativen Technik zu fördern.

Literatur

- 1 Sabroe I, Parker LC, Dockrell DH et al. Targeting the Networks that Underpin Contiguous Immunity in Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175: 306–311
- 2 Barnes PJ. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 183–192
- 3 ATS/ERS. Recommendations for Standardized Procedures for the On-line and Offline Measurement of Exhaled Lower Respiratory Nitric Oxide and Nasal Nitric Oxide. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171: 912–930
- 4 Turner S. Exhaled nitric oxide in the diagnosis and management of asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2008; 8: 70–76
- 5 Jackson AS, Sandrini A, Campbell C et al. Comparison of Biomarkers in Exhaled Breath Condensate and Bronchoalveolar Lavage. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175: 222–227
- 6 ATS Workshop Proceedings: Exhaled Nitric Oxide and Nitric Oxide Oxidative Metabolism in Exhaled Breath Condensate. *Proc Am Thorac Soc* 2006; 3: 131–145
- 7 Liu J, Conrad DH, Chow S et al. Collection devices influence the constituents of exhaled breath condensate. *Eur Respir J* 2007; 30: 807–808
- 8 Czebe K, Barta I, Antus B et al. Influence of condensing equipment and temperature on exhaled breath condensate pH, total protein and leukotriene concentrations. *Respir Med* 2008; 102: 720–725
- 9 Rosias PP, Robroeks CM, Niemarkt HJ et al. Breath condenser coatings affect measurement of biomarkers in exhaled breath condensate. *Eur Respir J* 2006; 28: 1036–1041
- 10 Prieto L, Ferrer A, Palop J et al. Differences in exhaled breath condensate pH measurements between samples obtained with two commercial devices. *Respir Med* 2007; 101: 1715–1720
- 11 Horvath I, Hunt J, Barnes PJ et al. Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. *Eur Respir J* 2005; 26: 523–548
- 12 Goldoni M, Cagliari A, Andreoli R et al. Influence of condensation temperature on selected exhaled breath parameters. *BMC Pulm Med* 2005; 5: 10
- 13 Montuschi P. Review: Analysis of exhaled breath condensate in respiratory medicine: methodological aspects and potential clinical applications. *Therapeutic Advances in Respiratory Disease* 2007; 1: 5–23
- 14 Rosias PP, Robroeks CM, Kester A et al. Biomarker reproducibility in exhaled breath condensate collected with different condensers. *Eur Respir J* 2008; 31: 934–942
- 15 Koutsokera A, Loukides S, Gourgoulis KI et al. Biomarkers in the exhaled breath condensate of healthy adults: mapping the path towards reference values. *Curr Med Chem* 2008; 15: 620–630
- 16 Hoffmeyer F, Harth V, Merget R et al. Exhaled breath condensate analysis: evaluation of a methodological setting for epidemiological field studies. *J Physiol Pharmacol* 2007; 58: 289–298
- 17 Bayley DL, Abusriwil H, Ahmad A et al. Validation of Assays for Inflammatory Mediators in Exhaled Breath Condensate. *Eur Respir J* 2008; 31: 943–948
- 18 Epton MJ, Dawson RD, Brooks WM et al. The effect of ambient air pollution on respiratory health of school children: a panel study. *Environ Health* 2008; 7: 16
- 19 Ferdinands JM, Crawford CA, Greenwald R et al. Breath acidification in adolescent runners exposed to atmospheric pollution: a prospective, repeated measures observational study. *Environ Health* 2008; 7: 10
- 20 Riediker M, Danuser B. Exhaled breath condensate pH is increased after moderate exercise. *J Aerosol Med* 2007; 20: 13–18
- 21 Kullmann T, Barta I, Antus B et al. Environmental temperature and relative humidity influence exhaled breath condensate pH. *Eur Respir J* 2008; 31: 474–475
- 22 Romieu I, Barraza-Villarreal A, Escamilla-Nunez C et al. Exhaled breath malondialdehyde as a marker of effect of exposure to air pollution in children with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121: 903–909
- 23 Rundell KW, Slee JB, Caviston R, Hollenbach AM. Decreased lung function after inhalation of ultrafine and fine particulate matter during exercise is related to decreased total nitrate in exhaled breath condensate. *Inhal Toxicol* 2008; 20: 1–9
- 24 Alfaro MF, Walby WF, Adams WC, Schelegle ES. Breath condensate levels of 8-isoprostane and leukotriene B₄ after ozone inhalation are greater in sensitive versus nonsensitive subjects. *Exp Lung Res* 2007; 33: 115–133
- 25 Akpinar-Elci M, Siegel PD, Cox-Ganser JM et al. Respiratory inflammatory responses among occupants of a water-damaged office building. *Indoor Air* 2008; 18: 125–130

- 26 Hoffmann HJ, Tabaksblat LM, Enghild JJ, Dahl R. Human skin keratins are the major proteins in exhaled breath condensate. *Eur Respir J* 2008; 31: 380–384
- 27 Fireman E, Lerman Y, Stark M *et al.* Detection of occult lung impairment in welders by induced sputum particles and breath oxidation. *Am J Ind Med* 2008; 51: 503–511
- 28 Caglieri A, Goldoni M, Acampa O *et al.* The effect of inhaled chromium on different exhaled breath condensate biomarkers among chrome-plating workers. *Environ Health Perspect* 2006; 114: 542–546
- 29 Mutti A, Corradi M, Goldoni M *et al.* Exhaled metallic elements and serum pneumoproteins in asymptomatic smokers and patients with COPD or asthma. *Chest* 2006; 129: 1288–1297
- 30 Liu J, Sandrini A, Thurston MC *et al.* Nitric oxide and exhaled breath nitrite/nitrates in chronic obstructive pulmonary disease patients. *Respiration* 2007; 74: 617–623
- 31 Corhay JL, Hemelaers L, Henket M *et al.* Granulocyte Chemotactic Activity in Exhaled Breath Condensate of Healthy Subjects and Patients With COPD. *Chest* 2007; 131: 1672–1677
- 32 Makris D, Paraskakis E, Korakas P *et al.* Exhaled breath condensate 8-isoprostane, clinical parameters, radiological indices and airway inflammation in COPD. *Respiration* 2008; 75: 138–144
- 33 Gessner C, Hammerschmidt S, Kuhn H *et al.* Breath condensate nitrite correlates with hyperinflation in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med* 2007; 101: 2271–2278
- 34 Ko FW, Leung TF, Hui DS. Are exhaled breath condensates useful in monitoring asthma? *Curr Allergy Asthma Rep* 2007; 7: 65–71
- 35 Kostikas K, Koutsokera A, Papiris S *et al.* Exhaled breath condensate in patients with asthma: implications for application in clinical practice. *Clin Exp Allergy* 2008; 8: 557–565
- 36 Zhao JJ, Shimizu Y, Dobashi K *et al.* The relationship between oxidative stress and acid stress in adult patients with mild asthma. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2008; 18: 41–45
- 37 Coop C, Hagan LL, Dice JP. Exhaled breath condensate pH in the evaluation of asthma. *Allergy Asthma Proc* 2008; 29: 51–54
- 38 Nicolaou NC, Lowe LA, Murray CS *et al.* Exhaled Breath Condensate pH and Childhood Asthma: Unselected Birth Cohort Study. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174: 254–259
- 39 Robroeks CM, van de Kant KD, Jobsis Q *et al.* Exhaled nitric oxide and biomarkers in exhaled breath condensate indicate the presence, severity and control of childhood asthma. *Clin Exp Allergy* 2007; 37: 1303–1311
- 40 Al Obaidy AH, Al Samarai AG. Exhaled breath condensate pH and hydrogen peroxide as non-invasive markers for asthma. *Saudi Med J* 2007; 28: 1860–1863
- 41 Suzuki S, Matsukura S, Takeuchi H *et al.* Increase in reactive oxygen metabolite level in acute exacerbations of asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 2008; 146 [Suppl 1]: 67–72
- 42 Prasad A, Langford B, Stradling JR *et al.* Exhaled nitric oxide as a screening tool for asthma in school children. *Respir Med* 2006; 100: 167–173
- 43 Franklin PJ, Stick SM, Le Souef PN *et al.* Measuring exhaled nitric oxide levels in adults: the importance of atopy and airway responsiveness. *Chest* 2004; 126: 1540–1545
- 44 Kielbasa B, Moeller A, Sanak M *et al.* Eicosanoids in exhaled breath condensates in the assessment of childhood asthma. *Pediatr Allergy Immunol* 2008; 19: 660–669
- 45 Failla M, Crimi N, Vancheri C. Exhaled bronchial cysteinyl leukotrienes in allergic patients. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2007; 7: 25–31
- 46 Klusackova P, Lebedova J, Kacer P *et al.* Leukotrienes and 8-isoprostane in exhaled breath condensate in bronchoprovocation tests with occupational allergens. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2008; 78: 281–292
- 47 Ono E, Mita H, Taniguchi M *et al.* Increase in inflammatory mediator concentrations in exhaled breath condensate after allergen inhalation. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 122: 768–773
- 48 Paget-Brown AO, Ngamtrakulpanit L, Smith A *et al.* Normative data for pH of exhaled breath condensate. *Chest* 2006; 129: 426–430
- 49 Holz O, Buhl R, Hausen T *et al.* Messung der Atemwegsentszündung in der pneumologischen Praxis – Anwendung und Interpretation. *Pneumologie* 2007; 61: 194–201
- 50 Smith AD, Cowan JO, Brassett KP *et al.* Use of exhaled nitric oxide measurements to guide treatment in chronic asthma. *N Engl J Med* 2005; 352: 2163–2173
- 51 Holz O, Jorres RA. Nichtinvasive Verfahren zum Nachweis der Atemwegsentszündung im Vergleich Kosten – Nutzen – Wertigkeit. *Pneumologie* 2004; 58: 510–515