

Gehauchte Diagnosen? Zum Potenzial von Atemkondensatuntersuchungen

C. Gessner
S. Hammerschmidt
H. Kuhn
H. Wirtz

Expired Diagnosis?—The Potential of Exhaled Breath Analysis

Zusammenfassung

Die Analyse des Atemkondensates stellt eine innovative Möglichkeit der Informationsgewinnung aus der Lunge dar. Sie ermöglicht, oxidativen Stress und Entzündung in den Atemwegen abzuschätzen bzw. zu charakterisieren. Ein Einsatz beim Asthma, der COPD oder in der Mukoviszidose ist ebenso vorstellbar wie eine Nutzung zur Definition einer organspezifischen Inflammation beim Beatmeten oder in der Langzeitüberwachung von Patienten nach Lungentransplantation. Neben bloßer Inflammation sind auch andere Parameter wie der Nachweis der Mutation des Tumorsuppressorgens p53 bei Patienten mit einem nichtkleinzelligen Lungenkarzinom gelungen oder der Nachweis einer erhöhten Nitritfreisetzung bezogen auf das Tidalvolumen – als Hinweis auf eine vermehrte mechanische Belastung der Lunge während der Beatmung. Die Möglichkeiten der Analyse des Atemkondensates gehen daher über die indiskriminative Diagnose „Entzündung“ weit hinaus. Dennoch muss eine sorgfältige Validierung jedes einzelnen Parameters in der Zukunft die klinische Relevanz genauer definieren. Besonders der Vergleich mit der BAL wird immer gefordert und stellt gleichzeitig aufgrund der bekannten Schwierigkeiten der Standardisierung der BAL keinen Goldstandard dar. Unsere Übersicht zu dem Thema fasst den Wissenstand zur Atemkondensatentstehung und -sammung zusammen, gibt eine Darstellung der bisher publizierten Arbeiten zur Diagnostik aus dem Atemkondensat und zeigt zugleich auch die vielen offenen Fragen und Probleme auf, die derzeit noch Gegenstand von Diskussion und Forschung sind.

Abstract

Analysis of breath condensate is an innovative approach to biochemical information from the lung. It provides a new tool to estimate and characterize the burden of oxidative and inflammatory processes in the airways/lung. Clinical applications in asthma, COPD and CF can be envisioned as well as determining organ specific inflammation in mechanically ventilated patients or monitoring patients with transplanted lungs. However, besides inflammation other important areas have begun to be evaluated such as the demonstration of p53 mutations in NSCLC patients or an increased ratio of EBC nitrite to tidal volume in mechanically stressed lungs. Of course a careful validation of each and every parameter is paramount to the use in clinical applications. The comparison to BAL is oftentimes called for but at the same time is not the comparison to a gold standard because of the well known problems of BAL. The scope of this review is a summary of facts and theories concerning exhaled breath condensate generation, collection and analysis but at the same time the representation of the many aspects that remain to be resolved.

Institutsangaben

Medizinische Klinik und Poliklinik I, Universitätsklinikum Leipzig (Direktor: Prof. Dr. med. J. Schauer)

Widmung

Herrn Prof. Dr. med. Joachim Schauer zum 65. Geburtstag gewidmet.

Korrespondenzadresse

Dr. Christian Gessner · Medizinische Klinik und Poliklinik I · Universitätsklinikum Leipzig · Johannisallee 32 · 04103 Leipzig · E-mail: gesc@medizin.uni-leipzig.de

Eingereicht: 5. Februar 2004 · **Nach Revision angenommen:** 8. März 2004

Bibliografie

Pneumologie 2004; 58: 230–237 © Georg Thieme Verlag Stuttgart · New York · ISSN 0934-8387 · DOI 10.1055/s-2004-818411

Zu den neueren Entwicklungen in der Pneumologie gehören nicht-invasive Methoden der Informationsgewinnung aus den Atemwegen und dem Lungenparenchym. Zu diesen Methoden zählen das induzierte Sputum und das Atemkondensat sowie die Online-Messung von flüchtigen Substanzen in der Expirationsluft [1]. Diese Methoden stellen den Beginn einer Entwicklung dar, deren Ziel es ist, auf einfache Weise weitergehende Informationen über die Lunge zu erhalten und damit invasivere Diagnostik sparsam, ökonomisch und zielgerichtet einzusetzen. Gleichzeitig soll damit aber auch eine Screeningdiagnostik ermöglicht werden, die auf einen wesentlich größeren Kreis von potenziell Erkrankten ausgedehnt werden kann, als dies bisher für Erkrankungen der Lunge möglich war, von der rein funktionellen Möglichkeit der Atemflussanalyse einmal abgesehen.

Technisch einfacher noch als die Gewinnung von Sputum nach vorheriger Inhalation von 3%iger Kochsalzlösung ist die Messung von Substanzen, die entweder gasförmig oder eingeschlossen in aerosolisierte Tröpfchen in der Ausatemluft enthalten sind. Dabei entstehen keinerlei Auswirkungen auf das Bronchialsystem, zumal diese Messungen am ruhig atmenden Patienten stattfinden können.

Zu den Mediatoren, die online (also ohne vorherige Sammlung und spätere Messung) bestimmbar sind, gehören Stickstoffmonoxid (NO) und Kohlenmonoxid (CO). Gegenwärtig gibt es vor allem Daten zum Stickstoffmonoxid [2,3]. In verschiedenen Untersuchungen wurde ein Zusammenhang zwischen der NO-Konzentration in der Ausatemluft und dem Asthma bronchiale gefunden [4–8]. Mehrere Arbeiten haben sich mit der Standardisierung der Methode befasst [9] und festgelegt, dass die Ausatmung bei der Online-NO-Messung gegen einen fixen Widerstand stattfinden muss, wodurch sich das Gaumensegel verschließt und eine Kontamination des aus der Lunge stammenden Gases durch Nasenluft mit hoher Stickstoffmonoxid-Konzentration vermieden wird.

Das Exhalat enthält neben gasförmigen Bestandteilen auch eine Aerosolfraktion und vor allem Wasserdampf. Anteile dieser letzten beiden Bestandteile der Ausatemluft stellen den Hauptanteil des so genannten Atemkondensates (AK entspricht exhaled breath condensate: EBC) dar. In der Aerosolfraktion sind auch größere Moleküle wie Protein und DNA enthalten. Diesem Umstand verdankt das Atemkondensat seine potenzielle Bedeutung als Methode für Screening und Diagnostik von Lungenerkrankungen. Nachfolgende Übersicht soll darstellen, welche Möglichkeiten und Grenzen der Methode derzeit gegeben sind.

Gewinnung und Analytik des Atemkondensates

Entstehung und Zusammensetzung

Kondensation beinhaltet den Vorgang einer Umwandlung z. B. von Wasserdampf in die dichtere physikalische Phase des Wassers unter Abkühlung oder Druckerhöhung. Der in der Expirationsluft enthaltene Wasseranteil schlägt sich an kühleren Oberflächen ab. Die Sammlung von kondensiertem Wasserdampf ist aber nicht der interessierende Vorgang bei der Gewinnung des

Atemkondensates. Die während der Kondensation in kalter Umgebung zunehmende Größe der Aerosoltröpfchen befördert vermutlich auch deren Kontakt mit der Wandung der Kühlfalle und durch Adhäsion/Anfrieren auch deren dauerhaften Verbleib. Das Atemkondensat enthält neben Wasser eine Vielzahl chemischer und biochemischer Komponenten. Ihre Anwesenheit im Atemkondensat wird vermutlich durch eine Reihe von Prozessen beeinflusst: Gase aus der Ausatemluft können sich nachträglich in der Kondensatflüssigkeit lösen (z. B. Ammoniak), Stoffe mit einem Siedepunkt niedriger als Wasser ebenso wie das Wasser verdampfen. Diese Erklärungen gelten jedoch nicht für nicht-lösliche Bestandteile wie Proteine oder DNA, die ebenfalls im Atemkondensat nachweisbar sind. Als Erklärung für deren Vorhandensein wird die Bildung eines Aerosols aus der auf der Epithelschicht der Atemwege und Alveolen (epithelial lining fluid: ELF) befindlichen extrazellulären Flüssigkeit angenommen, die in purer Form aus der Lunge herausgetragen wird. Weil diese Aerosoltröpfchen – wie oben dargestellt – als Kristallisationskerne dienen, tritt eine im Prinzip variable, aber ganz wesentlich von der technischen Art der Durchführung der Atemkondensatsammlung abhängige Verdünnung ein. Die genauen Mechanismen der Aerosolentstehung sind bisher nicht bekannt. Die Menge der freigesetzten Aerosolpartikel liegt bei ca. 0,1–4 Partikel/cm³ und weist einen mittleren Durchmesser von 0,3 µm auf [10]. Verringert sich der Kondenswasseranteil, so kommt es bei gleichbleibendem Aerosolanteil zu einer höheren Konzentration der eigentlich interessierenden ELF-Bestandteile. Dies macht deutlich, warum die Verwendung eines einheitlichen Sammelsystems für eine gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse entscheidend ist. Dieser Effekt mag zu den in der Literatur beschriebenen teilweise stark divergierenden Ergebnissen für ein und denselben Marker beitragen [11].

Vorrichtungen zur Gewinnung von Atemkondensat

Während anfänglich zumeist selbstentwickelte Sammelgeräte zum Einsatz kamen, bei denen ein Kunststoffschlauch durch ein Eisbad geführt wurde, stehen jetzt kommerzielle Geräte zur Verfügung: CRYOCOND® (MediUm-SENSOR, Berlin), ECoSreen™ (ViaSys, Höchberg) sowie RTube™ (Respiratory Research, Charlottesville). Beim CRYOCOND® Gerät, das mittlerweile nicht mehr hergestellt wird, wurde auf eine im Durchmesser 3 cm messende, mit Folie überspannte Metallplatte geatmet, die durch ein piezoelektrisches Element gekühlt wurde. Ein Problem dieser Anordnung bestand darin, dass ein Teil des Aerosols von der Membran wieder reflektiert wurde und verloren ging, wodurch die Materialausbeute zu gering ausfiel. Im ECoSreen™ wird die Ausatemluft in einem 10 cm langen, austauschbaren und mit Teflon beschichtetem Sammelrohr durch ein umgebendes Kühlsystem auf –20 °C abgekühlt. Das Sammelrohr verfügt dabei über einen inneren (den Luftstrom zuführenden), und einen äußeren (den Luftstrom abführenden) Bereich. Die Umkehr des Luftstromes findet im Bodenbereich der Sammeleinheit statt [12]. Das RTube™ hingegen besteht aus einer Plastikröhre, um die ein im Gefrierschrank vorgekühltes Aluminiumrohr gesteckt wird. Über ein Mundstück kann direkt in dieses Rohr ausgeatmet werden. Das ermöglicht die Anwendung überall, auch im häuslichen Milieu. Dabei muss allerdings in Kauf genommen werden, dass eine langsame Erwärmung während des Sammelns stattfindet und so auch keine vollkommen konstante Beziehung zwi-

schen Aerosolniederschlag und Kondensatgewinnung gegeben ist.

Einflussfaktoren auf die Atemkondensatentstehung, Materialmenge und Nachweisverfahren

Zu den potenziellen Einflussfaktoren auf die Aerosolentstehung zählen das Tidalvolumen, Druckunterschiede und Flussschwindigkeiten in den kleinen Atemwegen/Alveolen sowie die Geschwindigkeit der Ausatmung. Allerdings liegen zu diesen Aspekten kaum Daten vor. Sicher ist nur, dass das Atemkondensat auch nicht-flüchtige Komponenten aus den unteren Atemwegen enthält [13,14]. Eine weitere Variable ist die Kondensatmenge. Sie kann – wie bereits dargestellt – durch das Sammelsystem wesentlich beeinflusst werden. Hauptanliegen ist eine möglichst effiziente Gewinnung der Aerosolfraktion. Nachdem der Nachweis eines linearen Zusammenhangs zwischen geatmetem Volumen und der gesammelten Atemkondensatmenge erbracht wurde [15], kann durch Erhöhung des Atemvolumens mehr Material gewonnen und dem analytischen Bedarf angepasst werden. Dabei wird auch über einen längeren Sammelzeitraum die Konzentration der im Atemkondensat enthaltenen Bestandteile nicht beeinflusst [15]. Da sich für einige Marker die Konzentration an der Nachweisgrenze bewegt und eine Messung nur möglich ist, wenn die Proben zuvor konzentriert werden (z.B. für den Nachweis von Interleukinen oder für eine Proteinelektrophorese), kann durch vermehrte Atmung ausreichend Untersuchungsmaterial gewonnen werden.

Eine immer wieder vermutete Verunreinigung durch Beimengungen aus dem Mund, vor allem durch Speichel, kann natürlich Ergebnisse stark verfälschen. Ein wichtiger Kontrollmarker im Atemkondensat ist daher die Amylaseaktivität. Sie dient dem Ausschluss einer relevanten Verunreinigung durch Speichel und stellt somit einen Faktor zur Qualitätskontrolle dar. Mit den meist verwendeten Nachweismethoden auf enzymkinetischer Basis kann eine relevante Verunreinigung ausgeschlossen werden, allerdings lassen sich mit noch sensibleren Methoden (western blot) geringe Mengen an Amylase auch bei intubierten Patienten im Atemkondensat nachweisen. Die Konzentrationen liegen hier jedoch zehntausendmal niedriger als die im Speichel nachweisbaren [14,16,17]. Aber auch Entzündungszellen in der Lunge bilden Amylase [18]. Die Amylase in der bronchialen Spülflüssigkeit wurde sogar als ein möglicher Marker für Lungenkarzinome vorgeschlagen [19].

Reproduzierbarkeit der Methode

Bezogen auf das ausgeatmete Volumen ist die Menge des Atemkondensates bei gleicher Technik der Gewinnung konstant. Dieser Zusammenhang scheint unabhängig von der Größe des Tidalvolumens zu sein. Das überrascht nicht, denn die ausgeatmete Luft ist nahezu mit Wasserdampf gesättigt, und Wasser bildet mit 99% den Hauptbestandteil des Atemkondensates [15,20]. Die aus der Literatur erkennbare Schwankungsbreite einzelner Mediatoren im Atemkondensat ist unterschiedlich: relativ gute Vergleichbarkeit lässt sich für Adenosin, Aldehyd, Glutathion, 8-Isoprostan, Leukotriene, PGE₂ und den pH-Wert erkennen [17,21–25]. Über eine große Variabilität der Konzentrationen wurde hingegen bei den Zytokinen berichtet [24,26–31]. Der Grund für diese Variabilität ist nicht geklärt, aber zwei Dinge tragen möglicherweise bei: (1) Schwankungen in der Verdünnung

der Marker im Atemkondensat, die z.B. durch unterschiedliche Sammelsysteme entstehen und (2) die geringe Konzentration der jeweiligen Substanzen, die dadurch im untersten Messbereich der Assays liegt.

Standardisierung der Methode

Im Gegensatz zur BAL besteht bei der Gewinnung des Atemkondensates ein entscheidender Vorteil neben der nicht vorhandenen Invasivität in der fehlenden Verdünnung durch eine Spüllösung. Dieser Vorteil wird teilweise wieder aufgehoben durch eine unbekannte Verdünnung durch kondensiertes Wasser aus den Atemwegen und der Lunge. Bei gleicher oder vergleichbarer Gewinnung dürfte sich allerdings die Variabilität, die durch diesen Faktor in das System eingeführt wird, in relativ engen Grenzen halten. Dafür gibt es erste Anhaltspunkte. Die Ermittlung des Verdünnungsfaktors ist daher auch als Methode der Standardisierung [14] geeignet. Der Verdünnungsfaktor kann ermittelt werden, indem die Konzentrationen von Natrium und Chlorid im Atemkondensat bestimmt werden und zusätzlich angenommen wird, dass sie in der ELF in plasmagleicher Konzentration vorhanden sind [14,32]. Alternativ kann der Harnstoff oder die Proteinkonzentration als „interner Standard“ dienen; allerdings ist die Messung von Harnstoff in vielen Assays dadurch erschwert, dass Ammoniak „mitgemessen“ wird. Ammoniak stellt insofern ein größeres Problem dar, weil auch gasförmiger Ammoniak sich sofort im Kondensatwasser anreichert. Bisher gibt es keinen allgemein akzeptierten Goldstandard, aber Na⁺ und Cl⁻ sind vermutlich besser als jede Technik, die für die BAL eingesetzt wird. Dabei lässt sich allerdings bisher die wichtige Frage nach der Gleichheit der Konzentrationen der beiden Ionen in der ELF und im Plasma nicht eindeutig beantworten. Theoretisch optimal ist ein Marker, der – gleichmäßig in der ELF wie im Plasma konzentriert – in stabiler Form vorliegt und in der Lunge bzw. den Atemwegen weder produziert, sezerniert oder degradiert wird. Obwohl also die Verdünnung durch Kondenswasser einen großen Einfluss auf die Konzentration der im Atemkondensat befindlichen Substanzen hat, ist es nicht wahrscheinlich, dass die bisher beschriebenen krankheitsspezifischen Unterschiede verschiedener Substanzen allein mit derartigen Unterschieden zu erklären sind.

Vergleich Atemkondensat und BAL/Bronchialflüssigkeit

Zum Vergleich der Konzentrationen unterschiedlicher Substanzen in der bronchoalveolären Lavage und dem Atemkondensat existieren kaum Daten. Ein direkter Vergleich mit dem Atemkondensat müsste allerdings individuell für einzelne Substanzen erfolgen. In einer Arbeit, die die Nitritkonzentration bei beatmeten Patienten mit akutem Lungenschaden untersuchte, wurde ein Vergleich zwischen BAL und Atemkondensat in einer Teilmenge der Patienten durchgeführt, bei der beide diagnostischen Prozeduren in Folge eingesetzt wurden. Dabei konnte allerdings eine recht gute Korrelation ($r=0,79$, $p<0,05$, $n=10$) der Konzentrationen von Nitrit im Atemkondensat und in der BAL festgestellt werden [33]. Ein systematischer Vergleich von BAL und Atemkondensat ist notwendig, allerdings muss bei der Interpretation beachtet werden, dass die BAL mit ihrer vermutlich in hohem Maße variablen Verdünnung eines unterschiedlich großen ELF-Anteils als Goldstandard nicht sehr geeignet scheint.

Marker und Mediatoren im Atemkondensat

Eine Vielzahl von Substanzen wurde bisher im Atemkondensat nachgewiesen. Ein Schwerpunkt lag dabei bei Markern für oxidativen Stress und/oder Entzündung. Diese Substanzen sollen im Folgenden vorgestellt werden:

H₂O₂

Die Freisetzung von H₂O₂ erfolgt durch Umwandlung von O₂⁻ in H₂O₂ mittels der Superoxiddismutase. Sowohl neutrophile als auch eosinophile Granulozyten, Makrophagen und Epithelzellen sind in der Lage, H₂O₂ freizusetzen [34]. H₂O₂ ist aufgrund seiner großen Reaktionsfreudigkeit sehr instabil; daher muss die Messung umgehend nach seiner Gewinnung erfolgen. Alternativ kann das Atemkondensat sofort eingefroren werden. Die Genauigkeit der Messung ist nicht sehr hoch: 60–80% [35–37]. Grund hierfür ist hohe Streuung der Messwerte, deren Ursache die Instabilität von H₂O₂ ist. Haupteinflussgrößen sind dabei die Sammelmethode und das Probenhandling. Durch den Einsatz von Biosensoren zur H₂O₂-Messung scheinen sich jedoch Reproduzierbarkeit und Empfindlichkeit verbessern zu lassen [38]. Es wurde sowohl von einer Altersabhängigkeit als auch von einem zirkadianen Rhythmus für das exhalierete H₂O₂ berichtet. Erhöhte Werte im Vergleich zu gesunden Probanden wurden gefunden beim Asthma bronchiale [39–42], bei gesunden Rauchern [43], bei der COPD [37,40,44–47], bei Bronchiektasen [48,49], bei zystischer Fibrose [50,51] und beim ARDS [52,53]. Die erhöhten H₂O₂-Werte, die bei mittelschwerem Asthma zu finden sind, korrelieren mit den eosinophilen Granulozyten im induzierten Sputum [42]. H₂O₂ ist möglicherweise für eine Verlaufs- und Therapiekontrolle bei Asthma geeignet, denn erhöhte Konzentrationen sind unter einer Therapie mit inhalativen Kortikosteroiden rückläufig [39,41]. Sowohl bei gesunden Rauchern als auch bei COPD-Patienten wurden erhöhte H₂O₂-Werte gefunden, wobei zwischen den beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede bestanden [44,45,54]. Bei der Exazerbation einer COPD fanden sich ebenfalls höhere Werte als bei stabiler Erkrankung [44], sodass erhöhte H₂O₂-Werte eine Krankheitsaktivität widerspiegeln. Inhalative Steroide zeigten im Gegensatz zum Asthma bei der COPD keinen Effekt auf die H₂O₂-Werte [44,55], eine Langzeitanwendung von N-Acetylcystein als potenzielles Antioxidanz dagegen schon [46]. Keinen Effekt auf die Höhe des H₂O₂ im Exhalat hatte eine Antibiotikatherapie bei Patienten mit zystischer Fibrose [51]. Andererseits zeigte eine Therapie mit Kortikosteroiden beim ARDS einen – wenn auch geringen – Abfall der erhöhten H₂O₂-Werte [52].

In neueren Arbeiten steht die Entwicklung und Validierung von Messmethoden mit besserer Reproduzierbarkeit und schnellerer Verfügbarkeit im Vordergrund [47,56,57].

NO und abgeleitete Verbindungen

Nitrit, das entsteht, wenn NO in wässriger Umgebung freigesetzt wird, kann spektrophotometrisch (Griess-Reaktion), fluorimetrisch (2,3-Diaminonaphthalene-Reaktion) oder mittels Chemolumineszenz nachgewiesen werden.

Erhöhte Konzentrationen von Nitrit bzw. NO₂⁻ und NO₃⁻ im Vergleich zu gesunden Probanden wurden bei Asthma, zystischer Fibrose, Bronchiektasen und Rauchern gefunden [58–65]. In der

Situation der akuten Exazerbation eines Asthma bronchiale lagen ebenfalls höhere Werte im Vergleich zur stabilen Situation vor, sodass Nitrit als ein Marker für akutes Asthma vorgeschlagen wurde [64]. Unter Therapie mit inhalativen Steroiden zeigte sich ein Abfall der Nitrit-Werte bei Asthmatikern [63]. Bei zystischer Fibrose fanden sich im Gegensatz zu erniedrigten NO-Werten ebenfalls erhöhte Nitrit-Konzentrationen [58]. Vergleichbar dazu wurden ebenfalls bei gesunden Rauchern Unterschiede zwischen NO- und Nitrit-Konzentrationen gefunden [60]. Dieses gegensätzliche Verhalten zwischen NO und Nitrit ist noch nicht vollständig geklärt, weshalb weitere Untersuchungen zum Verständnis der biochemischen Vorgänge in den Atemwegen notwendig sind. So korrelierten die Nitritkonzentration und das Tidalvolumen, jedoch nicht die Nitrit-Konzentration mit Markern der lokalen Entzündung im Atemkondensat bei beatmeten Patienten mit ARDS. Die erhöhte Nitrit-Konzentration wurde in diesem Fall als Ausdruck einer vermehrten mechanischen Belastung angesehen [33].

Eine Reaktion von NO mit Superoxid-Anionen in den Atemwegen führt zur Bildung von Peroxynitrit, das nach Reaktion mit Tyrosin zu Nitrotyrosin wird. Erhöhte Nitrotyrosin-Konzentrationen wurden bei mildem Asthma [66] sowie zystischer Fibrose festgestellt, wobei die Höhe des Nitrotyrosins bei zystischer Fibrose mit der Erkrankungsschwere korrelierte [67]. Rothe und Tacke berichteten dagegen über deutlich niedrigere Konzentrationen beim Nachweis von Nitrotyrosin mittels der empfindlicheren Methode der HPLS/Massenspektrometrie und postulierten eine mögliche Kreuzreaktivität bei anderen Nachweismethoden [68].

Nitrosothiole entstehen aus der Reaktion von NO mit Thiolen wie z. B. Glutathion und waren im Vergleich zu gesunden Probanden bei entzündlichen Atemwegserkrankungen wie Asthma bronchiale und zystischer Fibrose ebenfalls erhöht zu finden [69].

Adenosin

Adenosin entsteht beim Abbau von ATP. Es wird aber auch im Rahmen entzündlicher Veränderungen in den Atemwegen bei Asthma produziert [70]. Erhöhte Serumkonzentrationen wurden bei allergischer und bei anstrengungsinduzierter Bronchialobstruktion gefunden [71,72]. Auch im Atemkondensat waren bei stabilem Asthma erhöhte Adenosinwerte nachweisbar, die bei Zunahme der Erkrankungsschwere ebenfalls stiegen [16,17]. Darüber hinaus korrelierte Adenosin mit exhalierendem NO bei Asthmapatienten [17].

Prostanoide und Leukotriene

PGE₂ und TxB₂ sind im Atemkondensat nachweisbar [16,25,73–77]. Es bestehen jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen gesunden Probanden und Asthmapatienten für PGE₂, PGD₂ und TxB₂. Lediglich bei COPD-Patienten wurden erhöhte PGE₂-Werte im Atemkondensat gefunden [74,78].

Auch Leukotriene lassen sich im Atemkondensat nachweisen. Erhöhte Werte an LTB₄ wurden im Atemkondensat von Kälbern nach experimentell durchgeführter Infektion des Respirationstraktes festgestellt. Bei Asthma liegen unterschiedliche Ergebnisse vor. So fanden Becher u. Mitarb. erhöhte LTB₄- und LTE₄-Werte bei Asthmatikern [79], Csoma und Kollegen hingegen sahen bei Kindern mit Asthma keinen Unterschied in der LTB₄-Konzentra-

tion, wohl aber bei Cysteinyl-Leukotrienen (cys-LT: LTC₄, LTD₄, LTE₄) [76], die im Atemkondensat bei einer Exazerbation des Asthmas erhöht waren und nach Therapie mit inhalativen Steroiden (ICS) wieder regredient [80]. LTB₄, nicht aber LTE₄, wurde bei COPD-Patienten erhöht gefunden [74]. Für LTB₄, LTD₄ und LTE₄ konnten die mittels Immunoassay ermittelten Ergebnisse mit der empfindlicheren Methode der Massenspektrometrie bestätigt werden [81].

8-Isoprostan

8-Isoprostan entsteht aus Arachidonsäure durch nicht-enzymatische Reaktion mit Oxidanzien und kann daher als ein Marker für oxidativen Stress betrachtet werden [82]. Bei Asthma bronchiale [73,83], COPD [84], interstitiellen Lungenerkrankungen [85], zystischer Fibrose [86], ARDS [87] und obstruktiver Schlafapnoe [88] wurden erhöhte 8-Isoprostan-Konzentrationen berichtet. Die bei einer Exazerbation eines Asthma bronchiale initial erhöht gefundenen 8-Isoprostanwerte mit den Lungenfunktionsparametern zeigten nach einer Therapie mit oral verabreichten Steroiden zwar einen signifikanten Abfall, waren aber immer noch erhöht im Vergleich zu gesunden Probanden [80,83].

Andere Indikatoren für oxidativen Stress

Produkte der Lipidperoxidation wurden ebenfalls im Atemkondensat nachgewiesen [40,54,89,90]. Die Messung von Thiobarbitat-reaktiven Substanzen ist zwar einfach, aber auch eine unspezifische Methode zur Beurteilung der Lipidperoxidation. Der colorimetrische Assay zum Nachweis Thiobarbitat-reaktiver Substanzen besitzt leider nur eine geringe Spezifität. Erhöhte Konzentrationen von Thiobarbitat-reaktiven Substanzen wurden hier bei Asthmatikern und COPD-Patienten gefunden [40,54].

Aldehyde (z.B. Malondialdehyd) sind Produkte der Lipidperoxidation, die oxidativen Stress anzeigen. Ein erniedrigtes Glutathion weist zusätzlich auf eine reduzierte antioxidative Kapazität hin [91]. Beide Mediatoren – Aldehyde und Glutathion – lassen sich im Atemkondensat nachweisen [21,22]. Bei akutem Asthma fanden sich erhöhte Aldehyd- und erniedrigte Glutathion-Werte, die sich nach ICS-Therapie denen von gesunden Probanden annäherten [22]. Aber auch bei der COPD wurden erhöhte Aldehyd-Konzentrationen gefunden [21]. Die Messung der Aldehyde erfolgte mittels Flüssigkeitschromatographie, verbunden mit Massenspektrometrie, die des Glutathions mit HPLC und Fluoreszenznachweis.

pH

Die Messung des pH-Wertes im Atemkondensat ist eine einfache, mit einer pH-Elektrode durchführbare Methode [92]. Bei der Messung des Atemkondensat-pH unmittelbar nach der Atemkondensatgewinnung zeigen sich zu Anfang schwankende Werte, anschließend kommt es zu einem langsamen Anstieg des pH-Wertes, der mit dem Abdampfen des CO₂ einhergeht. Um konstante Werte zu erreichen, wurde von Hunt u. Mitarb. eine Entgasung mittels eines Edelgases wie z.B. Argon durchgeführt [92]. Bei gesunden Probanden wurden damit pH-Werte um 7,7 gemessen (mit einer Spanne von 7,4–8,8) [92]. Deutlich erniedrigte Atemkondensat-pH-Werte fanden sich bei akutem Asthma [59,92], zystischer Fibrose [93], COPD [59], Bronchiektasen [59] und akuter Lungenschädigung (ARDS) [24]. Bei Patienten mit akuter Exazerbation eines Asthma bronchiale wurde da-

rüber hinaus eine Normalisierung des pH im Atemkondensat nach erfolgreicher Therapie mit ICS beobachtet [92]. Außerdem wurden Korrelationen zu eosinophilen bzw. neutrophilen Granulozyten aus dem induzierten Sputum gefunden, was die Rolle des pH-Wertes im Atemkondensat als Marker für inflammatorische Prozesse unterstreicht [59]. Unterstützt wird dies durch Korrelationen der pro-inflammatorischen Interleukine IL-6 und IL-8 im Atemkondensat mit dem Atemkondensat-pH bei Patienten mit akuter Lungenschädigung [24].

Hinsichtlich der Variabilität innerhalb eines Tages bzw. einer Woche ergab sich bei der Messung des Atemkondensat-pH ein Wert von 3,5% bzw. 4,5% [94]. Ferner wurde festgestellt, dass der Atemkondensat-pH nicht durch Hyperventilation, die Sammelzeit, die Lagerung (bis zu 2 Jahren), eine Sammlung durch Nase bzw. Mund oder eine Atemwegsobstruktion nach Metacholin beeinflusst wird [94].

Ammoniak (NH₃/NH₄⁻)

Ammoniak entsteht durch die Spaltung des Harnstoffs durch die Urease sowie durch Glutaminase-Aktivität. Die Konzentration des Ammoniaks, einer sehr gut löslichen Substanz, die in gelöster Form als Ammonium vorliegt, hat dabei Einfluss auf den pH in der ELF. Eine verminderte Ammoniakkonzentration in Verbindung mit einem verminderten pH wurde bei akutem Asthma gefunden [95]. Auch in der Kühlfalle kann sich gasförmiger Ammoniak nachträglich im Atemkondensat anreichern. Beim spontan Atmenden ist auch eine Beimischung von Ammoniak aus dem Nasen-Rachen-Raum möglich. Die Mechanismen der Azidifizierung des Atemkondensates beim Asthma und anderen Lungenerkrankungen sind daher alles andere als geklärt [14,16].

Zytokine

Bei der Bestimmung von Zytokinen im Atemkondensat stoßen die üblichen Nachweismethoden, in der Regel ELISA-Assays, oft an ihre Sensitivitätsgrenzen. Es ist daher nicht selten erforderlich, die Proben zu lyophilisieren und in geringerem Volumen erneut zu lösen. Dabei konnten verschiedene Zytokine im Atemkondensat nachgewiesen werden: IL-6, IL-8, IL-4, IL-1 β, TNF-α, IL-10 [24,27,30,31,88,96,97]. Bei IL-8 und IL-6 gelang der Nachweis nur bei einem Teil der untersuchten Patienten [24,96]. Erhöhte Konzentrationen für IL-4 und verminderte Konzentrationen von Interferon-γ wurden beim akuten Asthma bei Kindern beschrieben [30]. Eine Therapie mit ICS führte zu einem Anstieg von Interferon-γ und zu einem signifikanten Abfall von IL-4 im Atemkondensat. IL-6 war bei Patienten mit einem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom [27], einer obstruktiven Schlafapnoe [88] sowie nach Zigarettenkonsum [29] erhöht. Bei beatmeten Patienten mit akuter Lungenschädigung fanden sich im Atemkondensat erhöhte IL-6- und IL-8-Konzentrationen, die mit dem Ausmaß der Azidifizierung korrelierten [24].

DNA, Proteine

Eines der attraktivsten klinischen Anwendungsgebiete des Atemkondensates wäre das nicht-invasive Screening für ein Lungenkarzinom. Hier besteht sowohl die dringende Notwendigkeit für eine verbesserte Methodik als auch höchste klinische Relevanz. Erste Schritte auf dem Weg zu einer solchen Entwicklung, nämlich der gezielte Nachweis der DNA einzelner Gene im Atemkondensat, wurden bereits gemacht. So konnten in unseren Un-

tersuchungen z.B. bei gesunden Probanden und bei Patienten mit Lungenkarzinomen das β -Aktin Gen in 65,7% der Fälle und bei den Tumorpatienten in 36,4% der Fälle sogar eine somatische Mutation des wichtigen Tumor-Suppressorgens p53 in der im Atemkondensat enthaltenen DNA nachgewiesen werden [33].

Vitronectin und Endothelin im Atemkondensat wurden bei fibrosierenden Lungenerkrankungen erhöht gefunden und als Marker für die Verlaufskontrolle zur Beurteilung der Krankheitsaktivität bei Lungenfibrose vorgeschlagen [98]. Sogar das Vorhandensein des Hepatozyten-Wachstumsfaktors konnte im Atemkondensat gezeigt werden. Hier wurden bei Patienten mit einer Pneumonie im Vergleich zu gesunden Probanden erhöhte Konzentrationen gefunden [99].

Zusammenfassung/Ausblick

Die Analyse des Atemkondensates eröffnet Möglichkeiten des nicht-invasiven Monitorings von Zuständen, die mit oxidativem Stress und Entzündung in den Atemwegen einhergehen. Diese Möglichkeiten können schon jetzt genutzt werden. Ein Einsatz zur Kontrolle der Inflammation beim Asthma, bei der COPD oder in der Mukoviszidose ist ebenso möglich wie die Abschätzung des Ausmaßes der Entzündung in der Lunge bei akutem Lungenversagen beim Beatmeten und zur Überwachung bei Patienten nach Lungentransplantationen. Die klinische Relevanz dieser Anwendungen muss sich in den kommenden Jahren noch genauer herausstellen. Zum jetzigen Zeitpunkt stehen die Validierung der verschiedenen Marker im Atemkondensat sowie die Einordnung ihrer Bedeutung im Vergleich zu etablierten invasiven Methoden (z. B. BAL) und anerkannten klinischen Scores im Vordergrund. Über diese Standards hinausgehende Aussagen über Krankheitsaktivität sind derzeit aus dem Atemkondensat noch nicht möglich. Mit Hilfe der vielen derzeit durchgeführten Untersuchungen, die mittlerweile größere Patientengruppen umfassen, wird jedoch die Voraussetzung für eine Einordnung der neuen Methoden in das Spektrum der bekannten diagnostischen Möglichkeiten geschaffen.

Schwerpunkte weiterer Forschung müssen die Aerosolentstehung in den Atemwegen und die Analyse der Verdünnung des Aerosols im Atemkondensat sein. Über die Klärung der Mechanismen der Aerosolbeimengung ergäbe sich die Möglichkeit, mehr Material der interessanten Fraktion des Atemkondensates zu gewinnen, die Sammelmethode zu optimieren und eine verbesserte Standardisierung der Methode zu ermöglichen. Dabei müssen die verschiedenen Mediatoren entsprechend ihrer Entstehung und Beimengung zum Atemkondensat einzeln berücksichtigt und im Rahmen von Studien mit größeren Fallzahlen validiert werden. Darüber hinaus sind mehr Informationen zum Vergleich zwischen BAL und Atemkondensat nötig.

Für die Forschung bietet das Atemkondensat eine spannende Erweiterung der Möglichkeiten, biochemische und molekularbiologische Informationen aus der Lunge ohne invasive Methodik zu gewinnen. Die Charakterisierung der darin in verschiedenen Situationen messbaren Proteine muss mit sehr sensitiven Methoden erfolgen. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt liegt die Limitierung zum einen in der zur Verfügung stehenden Materialmenge

an Atemkondensat, zum anderen in den Kosten für sehr sensitive Messverfahren, die eine weiterführende Analyse z. B. von Proteinspektren erlauben. Die bisher für die BAL eingesetzten ELISA-Tests sind in vielen Fällen nicht ausreichend oder benötigen fast das gesamte zur Verfügung stehende Material. Neue Technologien wie bead-array-Testansätze könnten hier Verbesserungen ermöglichen.

Geht die Entwicklung auf diesem Sektor in annähernd gleicher Geschwindigkeit wie bisher weiter, so wird nach unserer Ansicht das Atemkondensat (oder eine vergleichbare, verbesserte Analyse der expirierten Aerosolfraktion) in wenigen Jahren zu einem unverzichtbaren und nicht wieder aus unserem Spektrum von Möglichkeiten wegzudenkenden Werkzeug pneumologischer Diagnostik gehören.

Literatur

- 1 Kharitonov SA, Barnes PJ. Exhaled markers of pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163 (7): 1693 – 1722
- 2 Ricciardolo FL. Multiple roles of nitric oxide in the airways. *Thorax* 2003; 58 (2): 175 – 182
- 3 Paredi P, Kharitonov SA, Barnes PJ. Analysis of expired air for oxidation products. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166 (12 Pt 2): S31 – 37
- 4 Silkoff PE, Martin D, Pak J et al. Exhaled nitric oxide correlated with induced sputum findings in COPD. *Chest* 2001; 119 (4): 1049 – 1055
- 5 Blease K, Kunkel SL, Hogaboam CM. Acute inhibition of nitric oxide exacerbates airway hyperresponsiveness, eosinophilia and C-C chemokine generation in a murine model of fungal asthma. *Inflamm Res* 2000; 49 (6): 297 – 304
- 6 Feder LS, Stelts D, Chapman RW et al. Role of nitric oxide on eosinophilic lung inflammation in allergic mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; 17 (4): 436 – 442
- 7 Strunk RC, Szefler SJ, Phillips BR et al. Relationship of exhaled nitric oxide to clinical and inflammatory markers of persistent asthma in children. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112 (5): 883 – 892
- 8 Nogami H, Shoji S, Nishima S. Exhaled nitric oxide as a simple assessment of airway hyperresponsiveness in bronchial asthma and chronic cough patients. *J Asthma* 2003; 40 (6): 653 – 659
- 9 Recommendations for standardized procedures for the on-line and off-line measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide in adults and children-1999. This official statement of the American Thoracic Society was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160 (6): 2104 – 2117
- 10 Fairchild CI, Stampfer JF. Particle concentration in exhaled breath. *Am Ind Hyg Assoc J* 1987; 48 (11): 948 – 949
- 11 Jorres RA, Holz O. [Non-invasive inflammation monitoring]. *Pneumologie* 2001; 55 (9): 406 – 408
- 12 Becher G, Beck E, Rothe M et al. Sammlung von nichtgasförmigen Bestandteilen des Ausatemluft durch Ausfrieren. *Medizintechnik* 1997; 117: 89 – 95
- 13 Griese M, Noss J, Bredow C von. Protein pattern of exhaled breath condensate and saliva. *Proteomics* 2002; 2 (6): 690 – 696
- 14 Effros RM, Hoagland KW, Bosbous M et al. Dilution of respiratory solutes in exhaled condensates. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165 (5): 663 – 669
- 15 Gessner C, Kuhn H, Seyfarth HJ et al. Factors influencing breath condensate volume. *Pneumologie* 2001; 55 (9): 414 – 419
- 16 Vass G, Huszar E, Barat E et al. Comparison of nasal and oral inhalation during exhaled breath condensate collection. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167 (6): 850 – 855
- 17 Huszar E, Vass G, Vizi E et al. Adenosine in exhaled breath condensate in healthy volunteers and in patients with asthma. *Eur Respir J* 2002; 20 (6): 1393 – 1398
- 18 Begin R, Drapeau G, Boileau R et al. Enzyme activities of lung lavage in asbestosis. *Clin Biochem* 1986; 19 (4): 240 – 243
- 19 Rao S. Amylase in bronchial washings as an aid to early diagnosis of bronchogenic carcinoma. *J Assoc Physicians India* 1995; 43 (6): 400

- 20 Kietzmann D, Kahl R, Muller M et al. Hydrogen peroxide in expired breath condensate of patients with acute respiratory failure and with ARDS. *Intensive Care Med* 1993; 19 (2): 78–81
- 21 Corradi M, Rubinstein I, Andreoli R et al. Aldehydes in exhaled breath condensate of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167 (10): 1380–1386
- 22 Corradi M, Folesani G, Andreoli R et al. Aldehydes and glutathione in exhaled breath condensate of children with asthma exacerbation. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167 (3): 395–399
- 23 Montuschi P, Ragazzoni E, Valente S et al. Ciabattoni. Validation of leukotriene B4 measurements in exhaled breath condensate. *Inflamm Res* 2003; 52 (2): 69–73
- 24 Gessner C, Hammerschmidt S, Kuhn H et al. Exhaled breath condensate acidification in acute lung injury. *Respir Med* 2003; 97 (11): 1188–1194
- 25 Montuschi P, Ragazzoni E, Valente S et al. Validation of 8-isoprostane and prostaglandin E2 measurements in exhaled breath condensate. *Inflamm Res* 2003; 52 (12): 502–507
- 26 Bucchioni E, Kharitonov SA, Allegra L et al. High levels of interleukin-6 in the exhaled breath condensate of patients with COPD. *Respir Med* 2003; 97 (12): 1299–1302
- 27 Carpagnano GE, Resta O, Foschino-Barbaro MP et al. Interleukin-6 is increased in breath condensate of patients with non-small cell lung cancer. *Int J Biol Markers* 2002; 17 (2): 141–145
- 28 Carpagnano GE, Barnes PJ, Geddes DM et al. Increased leukotriene B4 and interleukin-6 in exhaled breath condensate in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167 (8): 1109–1112
- 29 Carpagnano GE, Kharitonov SA, Foschino-Barbaro MP et al. Increased inflammatory markers in the exhaled breath condensate of cigarette smokers. *Eur Respir J* 2003; 21 (4): 589–593
- 30 Shahid SK, Kharitonov SA, Wilson NM et al. Increased interleukin-4 and decreased interferon- γ in exhaled breath condensate of children with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165 (9): 1290–1293
- 31 Scheideler L, Manke HG, Schwulera U et al. Detection of nonvolatile macromolecules in breath. A possible diagnostic tool? *Am Rev Respir Dis* 1993; 148 (3): 778–784
- 32 Effros RM, Biller J, Foss B et al. A simple method for estimating respiratory solute dilution in exhaled breath condensates. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168 (12): 1500–1505
- 33 Gessner C, Hammerschmidt S, Kuhn H et al. Exhaled breath condensate nitrite and its relation to tidal volume in acute lung injury. *Chest* 2003; 124 (3): 1046–1052
- 34 Conner GE, Salathe M, Forteza R. Lactoperoxidase and hydrogen peroxide metabolism in the airway. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166 (12 Pt 2): S57–61
- 35 Horvath I, MacNee W, Kelly FJ et al. “Haemoxigenase-1 induction and exhaled markers of oxidative stress in lung diseases”, summary of the ERS Research Seminar in Budapest, Hungary, September, 1999. *Eur Respir J* 2001; 18 (2): 420–430
- 36 Schleiss MB, Holz O, Behnke M et al. The concentration of hydrogen peroxide in exhaled air depends on expiratory flow rate. *Eur Respir J* 2000; 16 (6): 1115–1118
- 37 Beurden WJ van, Dekhuijzen PN, Harff GA et al. Variability of exhaled hydrogen peroxide in stable COPD patients and matched healthy controls. *Respiration* 2002; 69 (3): 211–216
- 38 Lehmann C, Rothe M, Becher B. A new method for rapid measurement of hydrogen peroxide in exhaled breath condensate. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165 : 53 (Abstract)
- 39 Dohlman AW, Black HR, Royall JA. Expired breath hydrogen peroxide is a marker of acute airway inflammation in pediatric patients with asthma. *Am Rev Respir Dis* 1993; 148 (4 Pt 1): 955–960
- 40 Antczak A, Nowak D, Shariati B et al. Increased hydrogen peroxide and thiobarbituric acid-reactive products in expired breath condensate of asthmatic patients. *Eur Respir J* 1997; 10 (6): 1235–1241
- 41 Antczak A, Kurmanowska Z, Kasielski M et al. Inhaled glucocorticosteroids decrease hydrogen peroxide level in expired air condensate in asthmatic patients. *Respir Med* 2000; 94 (5): 416–421
- 42 Horvath I, Donnelly LE, Kiss A et al. Combined use of exhaled hydrogen peroxide and nitric oxide in monitoring asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158 (4): 1042–1046
- 43 Nowak D, Antczak A, Krol M et al. Increased content of hydrogen peroxide in the expired breath of cigarette smokers. *Eur Respir J* 1996; 9 (4): 652–657
- 44 Dekhuijzen PN, Aben KK, Dekker I et al. Increased exhalation of hydrogen peroxide in patients with stable and unstable chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154 (3 Pt 1): 813–816
- 45 Nowak D, Kasielski M, Pietras T et al. Cigarette smoking does not increase hydrogen peroxide levels in expired breath condensate of patients with stable COPD. *Monaldi Arch Chest Dis* 1998; 53 (3): 268–273
- 46 Kasielski M, Nowak D. Long-term administration of N-acetylcysteine decreases hydrogen peroxide exhalation in subjects with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med* 2001; 95 (6): 448–456
- 47 De Benedetto F, Aceto A, Dragani B et al. Validation of a new technique to assess exhaled hydrogen peroxide: results from normals and COPD patients. *Monaldi Arch Chest Dis* 2000; 55 (3): 185–188
- 48 Loukides S, Horvath I, Wodehouse T et al. Elevated levels of expired breath hydrogen peroxide in bronchiectasis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158 (3): 991–994
- 49 Loukides S, Bouros D, Papatheodorou G et al. Exhaled H₂O₂ in steady-state bronchiectasis: relationship with cellular composition in induced sputum, spirometry, and extent and severity of disease. *Chest* 2002; 121 (1): 81–87
- 50 Worlitzsch D, Herberth G, Ulrich M et al. Catalase, myeloperoxidase and hydrogen peroxide in cystic fibrosis. *Eur Respir J* 1998; 11 (2): 377–383
- 51 Jobsis Q, Raatgeep HC, Schellekens SL et al. Hydrogen peroxide and nitric oxide in exhaled air of children with cystic fibrosis during antibiotic treatment. *Eur Respir J* 2000; 16 (1): 95–100
- 52 Baldwin SR, Simon RH, Grum CM et al. Oxidant activity in expired breath of patients with adult respiratory distress syndrome. *Lancet* 1986; 1 (8471): 11–14
- 53 Heard SO, Longtine K, Toth I et al. The influence of liposome-encapsulated prostaglandin E1 on hydrogen peroxide concentrations in the exhaled breath of patients with the acute respiratory distress syndrome. *Anesth Analg* 1999; 89 (2): 353–357
- 54 Nowak D, Kasielski M, Antczak A et al. Increased content of thiobarbituric acid-reactive substances and hydrogen peroxide in the expired breath condensate of patients with stable chronic obstructive pulmonary disease: no significant effect of cigarette smoking. *Respir Med* 1999; 93 (6): 389–396
- 55 Ferreira IM, Hazari MS, Gutierrez Cet al. Exhaled nitric oxide and hydrogen peroxide in patients with chronic obstructive pulmonary disease: effects of inhaled beclomethasone. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164 (6): 1012–1015
- 56 Beurden WJ van, Harff GA, Dekhuijzen PN et al. An efficient and reproducible method for measuring hydrogen peroxide in exhaled breath condensate. *Respir Med* 2002; 96 (3): 197–203
- 57 Zappacosta B, Persichilli S, Mormile F et al. A fast chemiluminescent method for H₂O₂ measurement in exhaled breath condensate. *Clin Chim Acta* 2001; 310 (2): 187–191
- 58 Ho LP, Innes JA, Greening AP. Nitrite levels in breath condensate of patients with cystic fibrosis is elevated in contrast to exhaled nitric oxide. *Thorax* 1998; 53 (8): 680–684
- 59 Kostikas K, Papatheodorou G, Ganas K et al. pH in Expired Breath Condensate of Patients with Inflammatory Airway Diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165 (10): 1364–1370
- 60 Corradi M, Pesci A, Casana R et al. Nitrate in exhaled breath condensate of patients with different airway diseases. *Nitric Oxide* 2003; 8 (1): 26–30
- 61 Cunningham S, McColm JR, Ho LP et al. Measurement of inflammatory markers in the breath condensate of children with cystic fibrosis. *Eur Respir J* 2000; 15 (5): 955–957
- 62 Formanek W, Inci D, Lauener RP et al. Elevated nitrite in breath condensates of children with respiratory disease. *Eur Respir J* 2002; 19 (3): 487–491
- 63 Kharitonov SA, Donnelly LE, Montuschi P et al. Dose-dependent onset and cessation of action of inhaled budesonide on exhaled nitric oxide and symptoms in mild asthma. *Thorax* 2002; 57 (10): 889–896
- 64 Hunt J, Byrns RE, Ignarro LJ et al. Condensed expirate nitrite as a home marker for acute asthma [letter]. *Lancet* 1995; 346 (8984): 1235–1236
- 65 Ganas K, Loukides S, Papatheodorou G et al. Total nitrite/nitrate in expired breath condensate of patients with asthma. *Respir Med* 2001; 95 (8): 649–654
- 66 Hanazawa T, Kharitonov SA, Barnes PJ. Increased nitrotyrosine in exhaled breath condensate of patients with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162 (4 Pt 1): 1273–1276

- ⁶⁷ Balint B, Kharitonov SA, Hanazawa T et al. Increased nitrotyrosine in exhaled breath condensate in cystic fibrosis. *Eur Respir J* 2001; 17 (6): 1201 – 1207
- ⁶⁸ Rothe M, Becher G, Kragl U et al. Bestimmung von Tyrosin und Nitrotyrosin im Atemkondensat von CF-Patienten. *Pneumologie* 2003; 57: S52 (Abstract)
- ⁶⁹ Corradi M, Montuschi P, Donnelly LE et al. Increased nitrosothiols in exhaled breath condensate in inflammatory airway diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163 (4): 854 – 858
- ⁷⁰ Driver AG, Kukoly CA, Ali S et al. Adenosine in bronchoalveolar lavage fluid in asthma. *Am Rev Respir Dis* 1993; 148 (1): 91 – 97
- ⁷¹ Mann JS, Holgate ST, Renwick AG et al. Airway effects of purine nucleosides and nucleotides and release with bronchial provocation in asthma. *J Appl Physiol* 1986; 61 (5): 1667 – 1676
- ⁷² Vizi E, Huszar E, Csoma Z et al. Plasma adenosine concentration increases during exercise: a possible contributing factor in exercise-induced bronchoconstriction in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109 (3): 446 – 448
- ⁷³ Antczak A, Montuschi P, Kharitonov S et al. Increased exhaled cysteinyl-leukotrienes and 8-isoprostane in aspirin-induced asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166 (3): 301 – 306
- ⁷⁴ Montuschi P, Kharitonov SA, Ciabattoni G et al. Exhaled leukotrienes and prostaglandins in COPD. *Thorax* 2003; 58 (7): 585 – 588
- ⁷⁵ Reinhold P, Becher G, Rothe M. Evaluation of the measurement of leukotriene B4 concentrations in exhaled condensate as a noninvasive method for assessing mediators of inflammation in the lungs of calves. *Am J Vet Res* 2000; 61 (7): 742 – 749
- ⁷⁶ Csoma Z, Kharitonov SA, Balint B et al. Increased leukotrienes in exhaled breath condensate in childhood asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166 (10): 1345 – 1349
- ⁷⁷ Neubauer B, Struck N, Mutzbauer TS et al. Leukotriene-B4 concentrations in exhaled breath condensate and lung function after thirty minutes of breathing technically dried compressed air. *Int Marit Health* 2002; 53 (1 – 4): 93 – 101
- ⁷⁸ Montuschi P, Barnes PJ. Exhaled leukotrienes and prostaglandins in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109 (4): 615 – 620
- ⁷⁹ Becher G, Winsel K, Beck E et al. Leukotriene B4 in breathing condensate of patients with bronchopulmonary diseases and of normal patients. *Appl Cardiopulmon Pathophysiol* 1995; 5: 215 – 219
- ⁸⁰ Baraldi E, Carraio S, Alinovi R et al. Cysteinyl leukotrienes and 8-isoprostane in exhaled breath condensate of children with asthma exacerbations. *Thorax* 2003; 58 (6): 505 – 509
- ⁸¹ Cap P, Pehal F, Petru V et al. Leukotrienes in breath condensate in patients with asthma and COPD. *Alergie* 2002; 1: 15 – 20
- ⁸² Janssen LJ. Isoprostanes: an overview and putative roles in pulmonary pathophysiology. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; 280 (6): L1067 – 1082
- ⁸³ Baraldi E, Ghio L, Piovan V et al. Increased exhaled 8-isoprostane in childhood asthma. *Chest* 2003; 124 (1): 25 – 31
- ⁸⁴ Montuschi P, Collins JV, Ciabattoni G et al. Exhaled 8-isoprostane as an in vivo biomarker of lung oxidative stress in patients with COPD and healthy smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162 (3 Pt 1): 1175 – 1177
- ⁸⁵ Montuschi P, Ciabattoni G, Paredi P et al. 8-Isoprostane as a biomarker of oxidative stress in interstitial lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158 (5 Pt 1): 1524 – 1527
- ⁸⁶ Montuschi P, Kharitonov SA, Ciabattoni G et al. Exhaled 8-isoprostane as a new non-invasive biomarker of oxidative stress in cystic fibrosis. *Thorax* 2000; 55 (3): 205 – 209 [Record as supplied by publisher]
- ⁸⁷ Carpenter CT, Price PV, Christman BW. Exhaled breath condensate isoprostanes are elevated in patients with acute lung injury or ARDS. *Chest* 1998; 114 (6): 1653 – 1659
- ⁸⁸ Carpagnano GE, Kharitonov SA, Resta O et al. Increased 8-isoprostane and interleukin-6 in breath condensate of obstructive sleep apnea patients. *Chest* 2002; 122 (4): 1162 – 1167
- ⁸⁹ Nowak D, Kalucka S, Bialasiewicz P et al. Exhalation of H₂O₂ and thiobarbituric acid reactive substances (TBARs) by healthy subjects. *Free Radic Biol Med* 2001; 30 (2): 178 – 186
- ⁹⁰ Larstad M, Ljungkvist G, Olin AC et al. Determination of malondialdehyde in breath condensate by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002; 766 (1): 107 – 114
- ⁹¹ Mates M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology* 2000; 153 (1–3): 83 – 104
- ⁹² Hunt JF, Fang K, Malik R et al. Endogenous airway acidification. Implications for asthma pathophysiology [see comments]. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161 (3 Pt 1): 694 – 699
- ⁹³ Tate S, MacGregor G, Davis Met al. Airways in cystic fibrosis are acidified: detection by exhaled breath condensate. *Thorax* 2002; 57 (11): 926 – 929
- ⁹⁴ Vaughan J, Ngamtrakulpanit L, Pajewski T et al. Exhaled breath condensate pH is a robust and reproducible assay of airway chemistry. *Eur Respir J* 2003; in press
- ⁹⁵ Hunt JF, Erwin E, Palmer L et al. Expression and activity of pH-regulatory glutaminase in the human airway epithelium. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165 (1): 101 – 107
- ⁹⁶ Ho LP, Faccenda J, Innes JA et al. Expired hydrogen peroxide in breath condensate of cystic fibrosis patients. *Eur Respir J* 1999; 13 (1): 103 – 106
- ⁹⁷ McRae K, De Perrot M, Fischer S et al. Detection of IL-10 in the exhaled breath condensate, plasma and tissue during ischemia-reperfusion injury in experimental lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2001; 20 (2): 184
- ⁹⁸ Carpagnano GE, Kharitonov SA, Wells AU et al. Increased vitronectin and endothelin-1 in the breath condensate of patients with fibrosing lung disease. *Respiration* 2003; 70 (2): 154 – 160
- ⁹⁹ Nayeri F, Millinger E, Nilsson I et al. Exhaled breath condensate and serum levels of hepatocyte growth factor in pneumonia. *Respir Med* 2002; 96 (2): 115 – 119