Aus der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe (Campus Mitte)
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Atemanalyse als Screeningmethode für das Mammakarzinom

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Cornelia Freitag-Höner
aus Berlin

Gutachter: **1. Prof. Dr. med. A. Schneider**

2. Prof. Dr. med. R. Bollmann

3. Prof. Dr. med. U. Ulrich

Datum der Promotion: 18. November 2011

Meinen Eltern
Dr. Marianne Freitag,
Dr. MR Manfred Freitag
gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung ***1***

1.1 Mammakarzinom 1

1.1.1 Definition, Inzidenz und Ätiologie 1

1.1.2 Diagnostik 2

1.2 Atemanalyse in der Medizin 4

1.2.1 Atemzusammensetzung 4

1.2.2 Anwendung 5

1.3 Volatile Organic Compounds 6

1.3.1 Definition 6

1.3.2 Volatile Organic Compounds – Quellen und Emissionsverhalten 7

1.3.3 Volatile Organic Compounds und Mammakarzinom 7

1.3.4 Aktueller Forschungsbedarf 8

1.4 Ziel der Arbeit 9

2 Patientinnen, Material und Methoden ***10***

2.1 Patientinnen und Probandinnen 10

2.1.1 Patientinnen 10

2.1.2 Gesunde 10

2.2 Studiendesign 11

2.2.1 Durchführung der Studie 11

2.2.2 Versuchsaufbauskizze 12

2.2.3 Probenahme 13

2.2.4 Thermodesorption, Gaschromatographie, Massenspektrometrie 15

2.2.5 Analyseparameter 18

2.2.6 Verwendete Chemikalien 20

2.3 Verbrauchsmaterialien, Geräte, Instrumente 22

2.4 Analytische Auswertung 22

2.5 Statistische Auswertung 24

3 Ergebnisse ***25***

3.1 Patientinnen und Probandinnen 25

3.2 Auswertung der Daten 30

3.2.1 Qualitative Analyse 31

3.2.1.1 Alkane 31

3.2.1.2 Alkene 33

3.2.1.3 Ungesättigte Kohlenwasserstoffe 34

3.2.1.4 Aromatische Kohlenwasserstoffe 34
3.2.1.5 Halogenkohlenwasserstoffe 35
3.2.1.6 Terpene 35
3.2.1.7 Siloxane 36
3.2.1.8 Ester einwertiger Alkohole 36
3.2.1.9 Ketone 36
3.2.1.10 Alkohole und Aldehyde 36
3.2.2 Quantitative Analyse 37
3.2.2.1 Alkan 3-Methylhexan 39
3.2.2.2 Alken Decen 41
3.2.2.3 Terpen Caryophyllen 43
3.2.2.4 Aromat Naphthalin 45
3.2.2.5 Halogenkohlenwasserstoff Trichlorethylen 47

4 Diskussion 50

4.1 Diskussion der Ergebnisse 50
4.1.1 Organisch flüchtige Substanzen als Marker maligner Prozesse 51
4.1.2 Bildungsprozess von biogenen flüchtigen organischen Substanzen 58

4.2 Diskussion der Methode 60
4.2.1 Akkumulation der Analyten 60
4.2.2 Quantitative und Qualitative Analyse der VOCs 61

4.3 Fazit und Ausblick 61

5 Zusammenfassung 63

6 Literaturverzeichnis 65

7 Tabellenverzeichnis 71

8 Abbildungsverzeichnis 73

9 Ergänzendes Datenmaterial 75

9.1 Qualitative Analyse 75

9.2 Quantitative Analyse 84

Abkürzungsverzeichnis

AG	Aktiengesellschaft
ALAB	Analyselabor
AMDIS	Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System
ATM-Gen	Ataxia Telangiektasia Mutated-Gen
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
BMI	Body-Mass-Index
BRCA 1-Gene	Breast Cancer 1-Gene
BRCA 2-Gene	Breast Cancer 2-Gene
BRD	Bundesrepublik Deutschland
bzw.	beziehungsweise
c	cyclo
C	Kohlenstoff
ca.	circa
CA 15-3	Cancer-Antigen 15-3
CAS	Chemical Abstracts Service
CEA	Carcino-Embryonales Antigen
cm	centimeter
CYT-P450	Cytochrom P450-Isoenzym
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease
DCIS	Duktales Carcinoma In Situ
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNPH	Dinitrophenylhydrazin
EC	European Commission
ECD	Electron Capture Detector
ER	Östrogenrezeptor
FID	Flammenionisationsdetektor
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
G	Grading
GC	Gaschromatographie
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
h	Stunde (hora)

H_2	Wasserstoff
HER2	Human Epidermal Growth Receptor 2
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HP	Hewlett-Packard
HPLC-MS	High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry
HPLC-UV	High Pressure Liquid Chromatography - Ultraviolet Detection.
i.d.R.	in der Regel
KAS	Kaltaufgabesystem
KG	Kommanditgesellschaft
KG	Körpergewicht
kg/m^2	Kilogramm pro Quadratmeter
K-S-Test	Kolmogorov-Smirnov-Test
l	Liter
L	Lymphgefäßinvasion
LCIS	Lobuläres Carcinoma in Situ
m	Meter
min	Minute
mm	Millimeter
MS	Massenspektrometrie
MSD	massenspektrometrischer Detektor
MTC	Messtechnik
$\mu g/m^3$	Mikrogramm/Kubikmeter
ml	Milliliter
ml/min	Milliliter/Minute
mtc	Micro Tech Components
mV	Millivolt
m/z	Masse-zu-Ladung Verhältnis
n	number (Abkürzung für Fallzahl)
n	normal (zum Beispiel: n-Hexan/ normal Hexan)
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
NADP-Oxidase	Nicotinamide-Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase
NYHA	New York Heart Association
NIST	National Institute of Standards and Technology

O_3	Ozon
OP	Operation
p-Wert	Prädiktiver Wert
PR	Progesteronrezeptor
psi	Pound-Force per Square Inch
pM	postoperative Metastasen
pN	postoperative Lymphknoten
pT	postoperative Tumorgröße
p-53 Gen	Phosphorprotein-53
ROC-curve	Reveiver Operating Characteristic-Curve
POM	Particulate Organic Matter
R	Resektionsrand
ROS	reactive oxygen species
PTEN-Gen	Phosphatase and tensin homologue
sec.	Sekunde
SIM	Selected Ion Monitoring
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
SD	Standardabweichung
SVOC	Semi Volatile Organic Compounds
TDS	Thermodesorptionsspektroskopie
TDSA	Technical Directive Status Accounting System
TFA	Technische Fabrik für Armaturen
TVOC	Total Volatile Organic Compounds
u.a.	unter anderem
USA	United States of America
V	Gefäßinvasion (vasa)
VOC(s)	Volatile Organic Compound(s)
VVOC(s)	Very Volatile Organic Compound(s)
WHO	World Health Organization
XAD	Experimental and Developmental
z.T.	zum Teil

1 Einleitung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Analyse von Volatile Organic Compounds (VOCs), die im Atem von Mammakarzinompatientinnen messbar sind, und deren Einsatz im klinischen Alltag.

1.1 Mammakarzinom

1.1.1 Definition, Inzidenz und Ätiologie

Das Mammakarzinom umfasst diejenigen bösartigen Tumore, die von den Epithelien der Milchgänge oder der lobulären Drüsenendstücke ausgehen. Zu den häufigsten invasiven Malignomen gehören das invasiv duktale und das invasiv lobuläre Mammakarzinom, die, betrachtet man alle Mammakarzinome, jeweils mit einer Häufigkeit von etwa 65-80% und 10-14% auftreten (Tavassoli 1992). Zu den selteneren Formen gehören der Häufigkeit nach das tubuläre (2-9%), das medulläre (3%), das muzinöse (2%) und das papilläre (1%) Karzinom (Berg, Hutter 1995; Rosen 1999). Es gibt noch weitere invasive Karzinome, die aber sehr selten vorkommen und deren Häufigkeit zusammen unter ein Prozent beträgt. In diese Gruppe fallen zum Beispiel das adenoid-zystische Karzinom, das sekretorische Karzinom, das apokrine Karzinom und das zystisch-hypersekretorische Karzinom mit Invasion. Metastasen von nichtmammären Tumoren können ebenfalls in der Brust vorkommen. Bei dem Primärtumor kann es sich beispielsweise um ein Lungenkarzinom, ein malignes Melanom oder die Manifestation eines Lymphoms handeln (Rosen 1999).

Das Mammakarzinom ist die häufigste Karzinomdiagnose der Frau. Etwa 25% aller an Krebs erkrankten Frauen der Bundesrepublik Deutschland sind von dieser Karzinomart betroffen. Nach Schätzungen des Robert-Koch-Institutes treten jährlich rund 46.000 Neuerkrankungen in Deutschland auf. Ungefähr jede zehnte Frau erkrankt bis zum 70. Lebensjahr an Brustkrebs, wobei der Krebs am häufigsten nach dem 50. Lebensjahr festgestellt wird (RKI 2003). Aber auch junge Frauen können betroffen sein: Eine von fünf Frauen ist bei der Diagnose unter 50-jährig (Beckmann et al. 2001).

Durch intensive Forschungsarbeit ist man seit Jahren bemüht, die Prognose des Brustkrebses zu verbessern. Dennoch versterben in Deutschland jährlich rund 18.000 Frauen an diesem Tumorleiden (RKI 2003).

Der größte Anteil der Mammakarzinome ist wahrscheinlich sporadischer Genese, d.h. unabhängig vererbter genetischer Mutationen. Bei nur ca. 5 bis 10% der Fälle lässt sich ein eindeutig genetischer Zusammenhang finden. Hierbei spielen neben dem p53-Gen, dem ATM-Gen und dem PTEN-Gen vor allem die Mutation des BRCA 1 oder BRCA 2 Suppressorgens auf dem Chromosom 17q21 beziehungsweise 13q12-13 eine Rolle (Harnann et al. 1998; Hoskins et al. 1995; Lynch et al. 1995). Zu den weiteren Risikofaktoren für das Mammakarzinom zählen Alter bei Menarche, Menopause und Geburt des ersten Kindes; während eine frühe Gravidität und Menopause das Mammakarzinomrisiko senken, ist die frühe Menarche mit einer Risikosteigerung verbunden. Weiterhin stellen Nulliparität, endokrine und Lifestyle-Faktoren (u.a. Ernährung, Bewegungsarmut, Adipositas, Nikotinabusus und Umweltfaktoren), sowie eine hohe bzw. zunehmende Parenchymdichte in der Mammographie und frühere pathologische Veränderungen der Brust Risikodeterminanten dar (Hankey et al. 1983, Mettlin 1992, Colditz 1993, Sondik 1994, Harris et al. 1992, Colloborative Group 2002a). Kontrovers wird hingegen der Einsatz hormonaler Kontrazeptiva und der Hormonsubstitution in der Peri/Postmenopause diskutiert (Chlebowski 2000; Chen et al. 2002).
Der Zeitpunkt der Diagnosestellung ist entscheidend für den Verlauf, d.h. die Größe des Tumors und der Befall axillärer Lymphknoten zum Diagnosezeitpunkt sind von entscheidender prognostischer Bedeutung (Carter et al. 1989). Diese Fakten unterstreichen die Notwendigkeit einer Früherkennungsmethode mit bestmöglicher Detektion für maligne Strukturveränderungen des Mammagewebes auch in den Frühstadien. Der Schwerpunkt zur Bekämpfung des Mammakarzinoms liegt deshalb, neben der Verbesserung der Therapie, im diagnostischen Bereich. Wird das Karzinom zu einem frühen Zeitpunkt erkannt, sind die therapeutischen Optionen weniger invasiv und die Mortalitätsraten geringer. Die Diagnose Mammakarzinom bedeutet für eine Frau in den USA den Verlust von durchschnittlich 19 Lebensjahren (Seer 2003).

1.1.2 Diagnostik

Eine primäre Prävention bei Brustkrebs ist durch eine gesundheitsbewusste Lebensweise, kalorienarmes Essen, Sport und Verzicht auf Alkohol nur im begrenzten Ausmaß möglich (Mettlin 1992). Von großer Bedeutung ist daher die sekundäre Prävention, zu der sowohl die Erhebung einer Anamnese, die Inspektion und Palpation der Mammae, der axillären sowie supraaxillären Lymphknoten gehören, als auch die Verwendung von Tumormarkern und bildgebenden diagnostischen Methoden zur Abklärung klinisch auf-

fälliger Befunde. Die beim Mammakarzinom verwendbaren Tumormarker, CA 15-3 und CEA, weisen eine nur geringe Sensitivität und Spezifität auf. Aus diesem Grund sind sie nicht zur Früherkennung sondern nur zur Verlaufskontrolle und Rezidivfrüherkennung nutzbar. Zu den eingesetzten bildgebenden Verfahren zählen derzeit die Mammographie, Mammasonographie und Magnetresonanztomographie als sich ergänzende Maßnahmen bei entsprechender Indikation. Als wichtigstes bildgebendes Verfahren zur Primärdiagnostik dient die Mammographie, meist in Verbindung mit der Mammasonographie und Axillasonographie (Adler, Wahl 1995). Sie ist gegenwärtig das einzige Screeningverfahren, bei dem eine Senkung der Brustkrebsmortalität nachweisbar ist. Nach aktualisierten Daten eines Cochrane-Reviews führt das Mammographie-Screening von Frauen zwischen 50 und 69 Jahren zu einer Abnahme der Brustkrebssterblichkeit um 15% (Goetzsche, Nielsen 2006). Bei optimalen technischen Vorraussetzungen liefert die Mammographie Ergebnisse mit einer Sensitivität von 54% - 58% bei Frauen unter 40 Jahren und von 81% - 94% bei Frauen über 65 Jahren (Kerlikowske et al. 1996; Rosenberg et al. 1998; Dtsch Ärztebl 2004). Aus diesem Grund ist seit Beginn des Jahres 2004 in einigen Teilen Deutschlands ein flächendeckendes Mammographie-Screeningprogramm für Frauen im Alter von 50 – < 70 Jahren mit Untersuchungen in 2-jährigen Abständen eingeführt worden. Danach wird jede Frau im Alter von 50 bis 69 Jahren alle 2 Jahre zur Teilnahme eingeladen. Beteiligt sind rund 10 Millionen Bundesbürgerinnen. Die Kosten für ein flächendeckendes Mammographie-Screening sind in Höhe eines dreistelligen Millionenbetrags (in Diskussion sind 70 - 130€ pro Mammographie) geschätzt.

Bei einem Screening sind es „gesunde“ Frauen, bei denen eine Untersuchung vorgenommen wird. Folglich kommt es vor allem auf eine hohe Sensitivität und Spezifität des Screeningtests an. Für das Screening ist die Mammographie – wenn sie von qualifiziertem und erfahrenem Personal unter Verwendung qualitativ hochwertiger Geräte ausgeführt wird - gegenwärtig die effektivste Methode. Dennoch liegt die falschpositive Rate mit 6% bei der ersten Screeningrunde über den erhofften 2-4%. Relevant sind die sogenannten falschnegativen Befunde bzw. die Intervallkarzinome (Dtsch Ärztebl 2007). Das sind jene Mammakarzinomfälle, die sich klinisch manifestieren, weil die durch das Mammographiescreening nicht diagnostiziert werden. Alternative, kostengünstigere, patientenfreundliche und noninvasive Screeningverfahren zu etablieren, ist Ziel intensiver Forschung. Unsere Studie soll daher ein neues Screening-Verfahren zur Diagnosestellung evaluieren.

1.2 Atemanalyse in der Medizin

1.2.1 Atemzusammensetzung

Die chemische Zusammensetzung des Atems spiegelt Gasaustausch-Vorgänge in der Lunge aber auch endogene Stoffwechselvorgänge wieder. Jeder exspiratorische Atemzug enthält Stickstoff (78%), Sauerstoff (15-18%), Kohlendioxid (4-6%), Edelgase (<1%) und Wasserdampf. Nur ein äußerst geringer Anteil von 0,000001% besteht aus einem Gemisch diagnostisch interessanter endogener oder exogener Inhaltsstoffe (Phillips et al. 1999). Die Differenzierung letzterer mittels laborchemischer Analysen ist von hohem wissenschaftlichem Interesse. Weit mehr als 500 der in Spuren vorkommenden Verbindungen sind bisher beschrieben worden (Miekisch et al. 2004). Eine Ansatzmöglichkeit, die Prognose maligner Erkrankungen zu verbessern, liegt darin, die Ausatemluft als diagnostisches Kriterium zu betrachten. Die Atemanalyse als Diagnosehilfe heißt demnach: Aus der Vielzahl der in der Atemluft vorhandenen Moleküle müssen diejenigen identifiziert werden, die durch eine Erkrankung erzeugt wurden bzw. die Rückschlüsse auf verschiedene Prozesse im Organismus ermöglichen (Pleil, Lindstrom 1997). Zur Zeit ist ihre Bestimmung und routinemäßige Messung noch weit entfernt vom klinischen Alltag, da bisher nur einige wenige Substanzen wissenschaftlich untersucht wurden: Hierzu zählt zum Beispiel Dimethylsulfid (DMS), das als eine stabile Schwefelverbindung mit hepatischer Elimination in Zusammenhang mit Lebererkrankungen gebracht wird (Tangermann et al. 1983). Aceton (Propylketon), das im Exhalat von Diabetikern nachgewiesen wird und Auskunft über den Hydratationszustand und Energiehaushalt einer Person gibt (Tassopoulos et al. 1969). Isopren, als Entzündungsmarker der Cholesterol-Synthese (Schubert, Müller, Benzing, Geiger 1998; Rieder et al. 2001). Dimethyl- und Trimethylamin bei Urämie, Mercaptan und Fettsäuren bei Leberzirrhose (Manolis 1983). Ethan und Pentan, die bei der Peroxidation von Membranlipiden freigesetzt werden und in der Atemluft von Asthmatikern, Rauchern, AIDS Kranken, Intensivpatienten sowie nach Bestrahlung erhöht messbar sind (Phillips et al. 2004; Weitz 1991). Und auch Malondialdehyd (MDA), das sich im Atemkondensat von Menschen mit bronchialem Asthma oder der zystischen Fibrose findet und auf durch oxidativen Stress bedingte entzündliche Vorgänge hindeutet (Ozaras et al. 2000; Brown 1994; Antczak et al. 1997; Kalayci et al. 2000; Horváth et al. 1998), zählt zu diesen Substanzen. Dem gegenüber sind eine Vielzahl nachgewiesener exhalierter flüchtiger organischer Substanzen bisher nicht systematisch auf ihre Eignung als klinische Biomarker untersucht worden. Zu ih-

nen gehören u.a. kurzkettige Alkane, die eine zelluläre Dysfunktion bzw. den Zelltod nach sich ziehen (Kneepkens, Ferreira, Lepage, Roy 1992). Aber auch aromatische Kohlenwasserstoffe, die zum Beispiel in der Frühdiagnostik von Lungenkarzinomen eine wichtige Rolle zu spielen scheinen (Phillipps et al. 1999).

1.2.2 Anwendung

Praktische Anwendung findet die Untersuchung der Atemgase in der human- und veterinärmedizinischen Anästhesiologie (Narkoseüberwachung), der Sportmedizin, der experimentellen Tumordiagnostik (z.B. Lungen-, Mammatumoren), der Schlafforschung sowie in der Inneren Medizin (Blutalkoholbestimmung, Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Leber- und Nierenerkrankungen, Diagnostik von Magen-, Darmgeschwüren, Kohlenhydrat-Malabsorption, bakterielle Fehlbesiedelung, Transplantatabstoßung). Als diagnostischer Standard wird die Atemanalyse bereits in einigen dieser Disziplinen im klinischen Alltag verwendet: Hier zu nennen sind der 13C-Harnstoff-Test zum Nachweis einer Helicobacter pylori Besiedlung oder der H_2-Atemtest bei Verdacht auf eine Galaktose- oder Laktoseintoleranz. Aber auch der Ethanolgehalt in der Ausatemluft zur Blutalkoholkonzentrationsbestimmung und der typische Acetongeruch bei Kindern mit akuter Exazerbation eines Diabetes mellitus sind inzwischen wichtige diagnostische Kriterien. Interessante Pilotstudien existieren insbesondere zu Atemgasveränderungen bei Abstoßungsrektionen (Weitz 1991, Phillips et al. 2004), Schizophrenie (Phillips et al. 1993; Phillips et al. 1995), Asthma (Dragonieri, Schot, Mertens et al. 2007), zystischer Fibrose (Barker et al. 2006), rheumatoider Arthritis (Humad, Zarling, Clapper, Skosey 1988), Präeklampsie (Moretti et al. 2004), Hirntumoren (Schmutzhard et al. 2008), Lungenkarzinomen (Iniesta, de Castro Carpeño, Carrasco 2007; Poly, Carboqnani, Corradi et al. 2005) und Lungentuberkulose (Phillips et al. 2007; Chen et al. 2007).

Die chemische Zusammensetzung des Atems, insbesondere die weitere Identifizierung der organisch flüchtigen Verbindungen, die für bestimmte Krankheiten charakteristisch sind und mit chemisch-analytischen Verfahren erfasst werden können, ist von aktuellem Forschungsinteresse.

1.3 Volatile Organic Compounds

1.3.1 Definition

Leichtflüchtige Kohlenwasserstoffe (in der englischsprachigen Fachliteratur meist als VOCs (Volatile Organic Compounds) oder auch als NMHC (Non-Methane Hydrocarbonc Compounds) bezeichnet, sind organisch chemische Verbindungen anthropogenen oder biogenen Ursprungs. Nach der WHO-Definition (WHO 1989) werden die flüchtigen Organica nach ihrem Siedepunkt bzw. der daraus resultierenden Flüchtigkeit eingeteilt:

Tabelle 1: Klassifizierung von flüchtigen organischen Verbindungen (modifiziert nach: World Health Organisation 1989)

Verbindungen	Abkürzung	Siedepunktsbereich [°Celsius]
leichtflüchtige organische Verbindungen (engl. very volatile organic compounds)	VVOC	<0° bis 50°C
flüchtige organische Verbindungen (engl. volatile organic compounds)	VOC	50° bis 250°
mittel- bis schwer flüchtige organische Verbindungen (engl. semi volatile organic compounds)	SVOC	250° bis 380°
Partikuläre organische Verbindungen (engl. particulate organic matter)	POM	>380°

Die sich weitgehend deckende Definition der European Collaborative Action (EC 1997) nutzt die Retentionsreihenfolgen der organischen Verbindungen auf einer unpolaren GC-Säule zur Klassifizierung in VVOC, VOC und SVOC. Der VOC-Bereich umfasst nach dieser Definition alle Verbindungen, die zwischen C6 (Hexan) und C16 (Hexadekan) eluieren. Unter VOCs wird demnach eine ganze Gruppe von Substanzen zusammengefasst, deren Vertreter zum Teil sehr unterschiedliche physikalische, chemische und toxikologische Eigenschaften besitzen. Messbar sind diese Substanzen mit moderner, hochempfindlicher Laboranalytik, z.B. mittels Gaschromatographie (GC) und Massenspektrometrie (MS). Die VOC-Konzentrationen werden in mg/m³ oder µg/m³ angegeben, das sind Tausendstel bzw. Millionstel Gramm pro Kubikmeter Luft.

1.3.2 Volatile Organic Compounds – Quellen und Emissionsverhalten

Anthropogene VOCs treten sowohl in der Außenluft in Form von Autoabgasen und industriellen Emissionen, als auch in Innenräumen sehr verbreitet auf. Sie sind u.a. in Baumaterialien, Inneneinrichtungsgegenständen und Haushaltsprodukten enthalten und werden auch in Form von Sprays und Duftölen in Räume eingebracht (Wallace 1987; Levin 1989) Zu den biogenen VOC-Quellen gehören z.B. die von allen Lebewesen (Mensch, Tier, Pflanzen, Mikroorganismen) produzierten körpereigenen Geruchsstoffe und Stoffwechselprodukte, die in die Umwelt emittiert werden. Bei Mikroorganismen steht nicht die Emission selbst, sondern ihre Stoffwechselprodukte, die auch mikrobielle VOCs (MVOC) genannt werden, im Vordergrund. Sie können u.a. sichtbare Schimmelschäden in Innenräumen und damit gesundheitliche Schäden verursachen (Schleibinger et al. 2005; Wilkens 2002).

1.3.3 Volatile Organic Compounds und Mammakarzinom

Grundlage unserer Studie ist die Theorie, dass Tumore andere Stoffwechselprodukte freisetzen als gesunde Zellen. Sie enthalten u.a. Benzol sowie Spuren alkalischer Derivate, die im gesunden Gewebe nicht nachweisbar sind (Paoletti 1995). Trainierten Labradoren wurden Atemproben von Patienten mit bioptisch gesicherten Lungen- bzw. Mammakarzinomen präsentiert. Das Ergebnis: Die Hunde erkannten Menschen mit Lungenkrebs in 99% der Fälle und Menschen mit Brustkrebs in 88% der Fälle (Mc Culloch et al. 2006). Die hohe Sensitivität der Vierbeiner, Lungen- bzw. Brustkrebs aus dem Atem der Erkrankten erschnüffeln zu können, war Anlass für die These, dass flüchtige organische Kohlenwasserstoffsubstanzen (VOCs) wichtige Biomarker von entzündlichen und oxidativen Prozessen biogenen Ursprungs sind und im Atem detektiert werden können. Oxidativer Stress kann eintreten, falls zu viele Sauerstoffradikale in den Mitochondrien der Tumorzellen produziert werden und in das Cytoplasma entweichen. Dort können Radikale DNA und wichtige Proteine oxidieren, aber auch ungesättigte Fettsäuren in Membranen, die in Alkane und methylierte Alkane umgebaut werden (Esterbauer et al. 1991; Marnett 2000; Phillips et al. 2000). Letztere werden hauptsächlich über die Lunge eliminiert oder durch die gesteigerte Aktivität des Cyp P450-Enzyms der Lunge metabolisiert (Phillips et al. 2003; Risby, Sehnert 1999). Die Eliminierung von kurzkettigen Alkanen über die Ausatemluft ermöglicht somit indirekt die Messung oxidativen Stresses und von Entzündungsreaktionen im Organismus. Über die entsprechen-

de Konzentrationsänderung dieser Substanzen kann eine Aussage über den Grad der Schädigung abgeleitet werden (Miekisch, Schubert, Noeldge-Schomburg 2004).
Die Ausatemluft scheint mit ihren nachweisbaren Atemmarkern auch als Diagnostikum für das Mammakarzinom geeignet zu sein. Die Qualität der Atemanalyse soll dabei auf einem Niveau liegen, das die Detektion kleinster Läsionen gewährleistet, da eine genaue Ermittlung von Herdlokalisation und -größe für eine erfolgreiche Therapieplanung unerlässlich ist.

1.3.4 Aktueller Forschungsbedarf

Dass chemische Analysen der Exhalationsluft auf flüchtige organische Substanzen ein hohes Potential in der Diagnose und Verlaufskontrolle maligner Erkrankungen besitzen, bestätigen bereits Pionierstudien von Pauling (Pauling et al. 1971), Larrson (Jansson, Larsson 1969), Krotozynski (Krotozynski et al. 1977) und insbesondere von Phillips (Danneker, Shaskan, Phillips 1982) und seinen Mitarbeitern. Vor mehr als 30 Jahren entdeckte Pauling et al., dass in der menschlichen Ausatemluft neben Stickstoffmonoxid und Kohlendioxid mehrere hundert flüchtige organische Stoffe nachweisbar sind (Pauling et al. 1971). Larrson und Jansson fokussierten auf die Entwicklung einer geeigneten Sammelmethode für die Exspirationsluft. Die Methode, Sammelbeutel zur Sammlung der Atemproben einzusetzen, wurde nicht nur von Larrson und Jansson (1969) genutzt, sondern auch von Krotozynski et al. und weiteren Forschungsgruppen wie Hotz et al. (1987). Die Stoffwechselwege, bei denen diese Komponenten entstehen, wurden u.a. zum Interesse von Phillips et al. und sind bis heute nicht ausreichend geklärt. Während Pauling, Larrson und Jansson, Krotozynski etc. das Phänomen als solches interessierte, kamen Phillips und seine Kollegen zu der Schlussfolgerung, dass die in der Atemluft enthaltenen Substanzen als eine Art gasförmiger Fingerabdruck („Fingerprint“) zu bewerten sind, die etwas über den Zellstoffwechsel bzw. über eine spezifische Organveränderung einer Person aussagen. Erhöhte Konzentrationen einiger Komponenten scheinen mit bestimmten Erkrankungen zu korrelieren.
In den letzten 15 Jahren verstärkte sich das Interesse an der Erforschung der Atemluft bzw. ihrer Bestandteile. Dabei ist das gemeinsame Ziel aller Forschungsbemühungen, die humane Atemluft für medizinische und toxikologische Anwendungen zu nutzen, um somit einen Beitrag zur nicht-invasiven Diagnostik zu liefern.
Eine standardisierte VOC-Beprobung wurde noch nicht etabliert. Demnach bestehen Unklarheiten zur Probengewinnung, Analytik und zur Pathogenese der in der Atemluft

messbaren Substanzen. Durch die stark differierenden Versuchsaufbauten und die verwendeten unterschiedlichen Messsysteme (Kharitonov, Barnes 2001; Riely, Cohen, Lieberman 1974) sind bisherige Studienergebnisse limitierend zu bewerten.

1.4 Ziel der Arbeit

Um die Ergebnisse der sekundären Prävention bei Mammakarzinompatientinnen zu verbessern, wird an der Implementierung von Früherkennungsmaßnahmen mit hoher Sensitivität und Spezifität gearbeitet.

Ein gutes Screeningverfahren erkennt die Erkrankung bei möglichst vielen Betroffenen im Frühstadium. Die Atemanalyse hat sich bei internistischen Fragestellungen als wertvolles diagnostisches tool bewährt. In Studien anderer Arbeitsgruppen wurde der Einsatz zur Detektion von Krebserkrankungen untersucht. Es liegen wenige Studien mit geringer Fallzahl und bisher nicht reproduzierbaren Ergebnissen vor. Ziel unserer Studie ist es, die Atemanalyse bei Mammakarzinompatientinnen im klinischen Alltagssetting zu erproben. Außerdem soll die Praktikabilität der gekoppelten Methode der GC/MS untersucht werden, sowie die Reproduzierbarkeit der bisher in der Literatur beschriebenen Ergebnisse.

Schließlich soll die Frage beantwortet werden, ob es spezifische Marker im Atem von Mammakarzinompatientinnen gibt, die sich im Atem Gesunder nicht finden.

Diese Arbeit soll Stellung nehmen zum Nutzen der Atemanalyse als Screeningmethode zur Früherkennung von Mammakarzinomen.

2 Patientinnen, Material und Methoden

2.1 Patientinnen und Probandinnen

Für diese prospektive Studie, die zwischen Januar 2007 und Juli 2007 an der Frauenklinik der Charité Campus-Mitte in Berlin durchgeführt wurde, wurde zu Beginn ein Antrag zur Erteilung eines Votums an die Ethikkommission gestellt (Antragsnummer: EA4/012/07). Das Vorhaben wurde bei der Ethikkommission vorgestellt und nach Prüfung und Beratung bewilligt. Die Studie besteht aus dem Kollektiv der Patientinnen (Gruppe 1) und aus dem Kollektiv der Gesunden (Gruppe 2).

2.1.1 Patientinnen

Im Kollektiv der Patientinnen wurden 10 (n=10) Frauen im Alter von 50-70 Jahren aus der prästationären Sprechstunde des Mammazentrums der Charité eingeschlossen. Bei allen Frauen bestand die histologisch gesicherte Diagnose „Primäres Mammakarzinom“.

Einschlusskriterien waren histologisch gesicherte Mammakarzinome, ein Karnofsky-Index =/> 80, die durchgeführte Patientenaufklärung, die Fähigkeit (sprachlich, körperlich und geistig) das Wesen der Studie zu verstehen und an der Studie teilzunehmen, die Bereitschaft zur Studienteilnahme, sowie eine ausgefüllte und unterschriebene schriftliche Einverständniserklärung. Ausschlusskriterien waren vorangegangene maligne Erkrankungen, Nikotinabusus, schwere internistische Begleiterkrankungen (Myokardinfarkt, Kardiomyopathie, Herzinsuffizienz NYHA III/IV, schwere COPD, Niereninsuffizienz, nicht eingestellter Diabetes mellitus), eine HIV-Infektion bzw. AIDS-Erkrankung, sowie Drogenabhängigkeit.

2.1.2 Gesunde

Die Patientinnen wurden mit 10 (n=10) gesunden Frauen als Kontrollgruppe per Aufruf eingeschlossen. Alle Patientinnen hatten eine unauffällige Mammographie innerhalb der letzten sechs Monate. Zu den Einschlusskriterien gehörten die durchgeführte Probandinnenaufklärung, die Fähigkeit, (sprachlich, körperlich und geistig) das Wesen der Studie zu verstehen und an der Studie teilzunehmen, die Bereitschaft zur Studienteilnahme, sowie eine ausgefüllte und unterschriebene schriftliche Einverständniserklärung. Zu den Ausschlusskriterien gehörten Nikotinabusus, vorangegangene maligne Erkrankungen, schwere internistische Begleiterkrankungen (Myokardinfarkt, Kardiomyopathie,

Herzinsuffizienz NYHA III/IV, schwere COPD, Niereninsuffizienz, nicht eingestellter Diabetes mellitus), eine HIV-Infektion bzw. AIDS-Erkrankung, sowie eine Drogenabhängigkeit.

2.2 Studiendesign

Die Patientinnen erhielten unabhängig von unserem Studiendesign eine leitliniengerechte Therapie. Am Morgen des OP-Tages wurden von allen Studienteilnehmerinnen alveolare Atemproben abgenommen, die anschließend laborchemisch per Gaschromatograph und Massenspektrometer analysiert wurden.

2.2.1 Durchführung der Studie

Von jeweils 10 erkrankten und jeweils 10 gesunden Studienteilnehmerinnen wurden unter gleichen Voraussetzungen nüchtern Atemproben genommen. Vor der Beprobung wurde mit allen Studienteilnehmerinnen ein ausführliches Aufklärungsgespräch über Sinn und Zweck der Studie geführt und eventuelle Fragen besprochen. Jede Teilnehmerin erhielt zusätzlich in schriftlicher Form Informationen über den Hintergrund und den Ablauf der Studie. Es erfolgte eine Datenerhebung bei jeder Studienteilnehmerin, in der der jeweilige Patientenname, das Geburtsdatum, der Wohnort, die Körperlänge, das Körpergewicht und der Menopausenstatus abgefragt wurden. Eine Anamnese insbesondere zu den Ein- und Ausschlusskriterien wurde erhoben. Die Studienteilnehmerinnen fixierten ihr Einverständnis zur Teilnahme schriftlich. Die Raumtemperatur wurde für jede Beprobung dokumentiert.

Die Beprobung dauerte für jede Studienteilnehmerin ca. 3-5 Minuten einschließlich der Erklärungen und stellte keine körperliche Belastung dar. Der anschließende Pump- und Spülvorgang erstreckte sich über ca. 40 min. Die Anwesenheit der Studienteilnehmerin war hierbei nicht notwenig. Zum Vergleich wurde an jedem Probenentnahmetag eine Raumluftprobe gesammelt, die den exogenen Anteil der Atemluft repräsentieren soll. Zudem wurden zur Feststellung eventueller Querkontaminationen der Adsorptionsröhrchen bei Probenahme, Transport und Lagerung sog. "Blindproben" untersucht, d.h. nicht beaufschlagte Adsorptionsröhrchen, die analog den beaufschlagten Adsorberröhrchen zum und vom Probenahmeort transportiert und unter identischen Bedingungen gelagert werden.

Alle Probenentnahmen wurden protokolliert. Nach der Beprobung wurden die Atemproben mit Ziffern versehen und pseudonummeriert weiter untersucht. Das Labor, mit dem im Rahmen der Studie zusammengearbeitet wurde, erhielt die Atemproben anonymisiert mit einer Codenummer. Die Auswertung erfolgte als Laboranalyse.

2.2.2 Versuchsaufbauskizze

Die Konzentrationen der VOCs befinden sich im Nano- bzw. Mikrogrammbereich. Deshalb müssen sie zunächst konzentriert werden. Als Speichermedium für die Atemprobe wurde ein Glasbehälter (Abb.2 Nr.2) mit einem Fassungsvermögen von 1000 ml verwendet. Die „Gasmaus“ ist ein Glaszylinder, der sich zu beiden Seiten verjüngt. An den beiden Enden besitzt er Absperrhähne. Zusätzlich ist ein Septum angebracht, das die Gasentnahme mit einer Spritze ermöglicht, was in unserer Studie sowohl für die Einbringung des internen Standards relevant wurde, als auch für Reduzierung des Widerstandes beim Ausatmungsvorgang. Ein austauschbares Mundstück diente als Ausatmungsvorrichtung (Abb.2 Nr.1). Ein Silikonschlauch (Abb.2 Nr.3) verband die „Gasmaus“ (Abb.2 Nr.2) mit dem Tenaxröhrchen (Abb.2 Nr.4), das wiederum über einen weiteren Silikonschlauch (Abb.2 Nr.5) an eine tragbare Pumpe mit automatischer Volumenstromregelung (Abb.2 Nr.6) angeschlossen war.

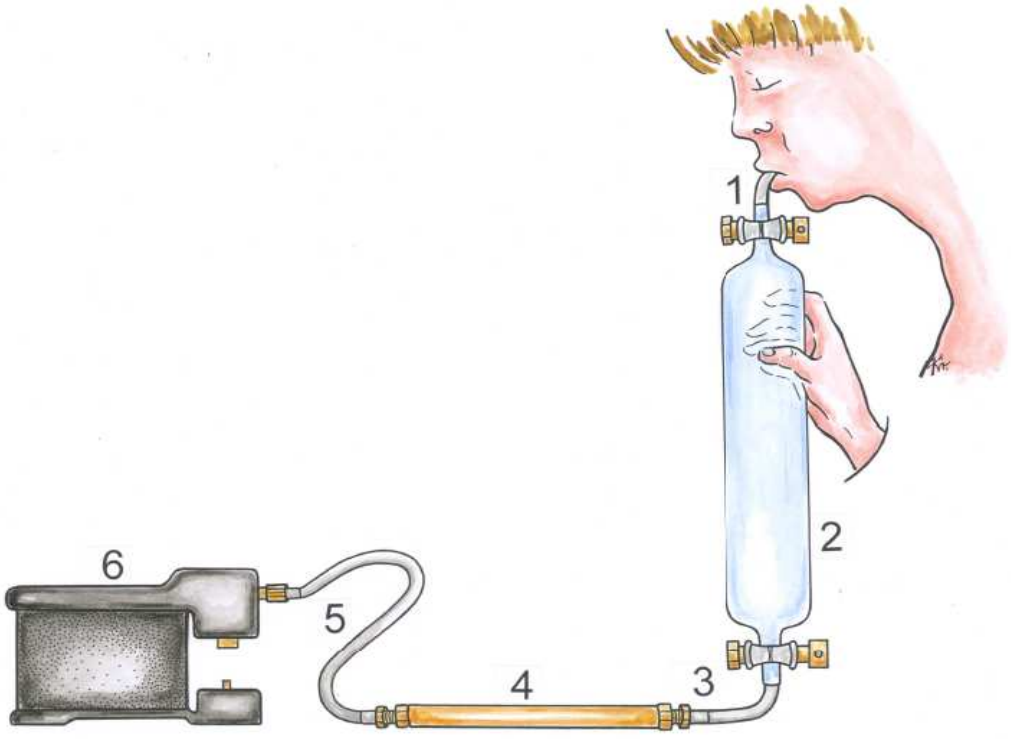


Abbildung 1: Probenahme mit Gasmaus, Prüfröhrchen und automatischer Pumpe (Zeichnung: Frau Kreutzer, Graphikerin Charité)

2.2.3 Probenahme

Zu Beginn jeder Probenahme wurde die „Gasmaus“ 10 min bei einer hohen Flussrate mit gereinigter Luft durchspült, um einen mehrfachen Luftwechsel zu erzielen.

Abbildung 2: Spülung der Gasmaus

Anschließend erfolgte der Einbau des Tenax-Röhrchens in Strömungsrichtung der Luft, d.h., dass zunächst die Luftzu- und ableitung an das Tenax-Röhrchen angeschlossen wurde. Um Leerwerte zu reduzieren und eine weitere Kontamination mit VOCs zu vermeiden, wurden alle Verbindungen mit entsprechenden Teflondichtungen bestückt.

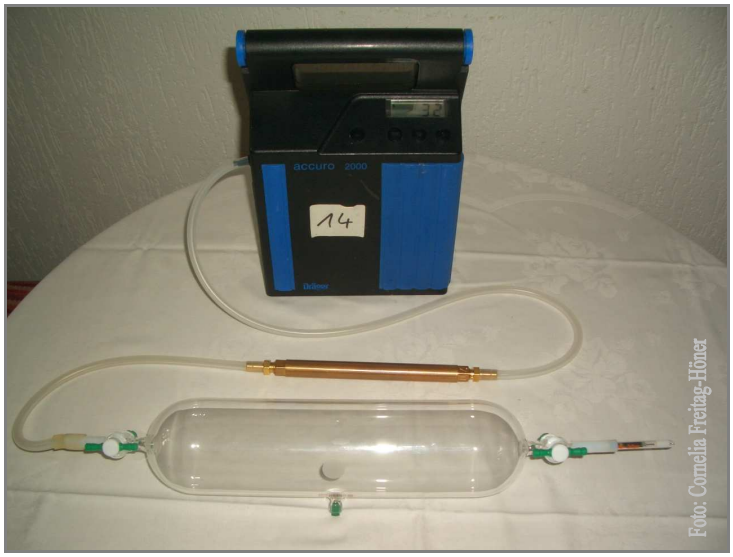


Abbildung 3: Pumpvorgang

Das Atemmanöver wurde vor der eigentlichen Messung einige Male mit den Probandinnen geprobt. Der jeweiligen Studienteilnehmerin wurde die „Gasmaus“ übergeben. Sie wurde aufgefordert, durch die Nase zu inspirieren, um sodann die „Gasmaus“ mit Alveolarluft („wie einen Luftballon“) zu füllen. Ein auswechselbares Teflonmundstück diente als Ausatmungsvorrichtung. Es sollte tief ausgeatmet werden, um einen möglichst großen Anteil endexpiratorischen Atems zu sammeln. Das Totraumvolumen (ca.300 ml) sollte dabei vor jedem Atemstoß verworfen, d.h. in den Raum ausgeatmet werden. Das Probeentnahmevolumen betrug 1l. Das Atemmanöver wurde jeweils 5 Mal wiederholt.

Abbildung 4: Ausatmungsvorgang

Die Hähne der „Gasmaus“ wurden erst zu Beginn des Abatmens geöffnet, so dass das Probenmaterial (die Alveolarluft) gut eindringen konnte und kein Überdruck entstand. Zu dem wurde ein Aktivkohlefilter auf das Septum in der Mitte der „Gasmaus“ gebracht, um den Widerstand beim Ausatmen zu verringern. Nachdem die Versuchsperson die „Gasmaus“ mit Atemluft gefüllt hat, wurden beide Hähne wieder geschlossen und das Mundstück gegen einen Aktivkohlefilter ausgetauscht, um die Versuchsapparatur in der Zeit zwischen den Beprobungen vor Rückdiffusion und verunreinigter Raumluft zu schützen. Erneut wurde die Verbindung zwischen Gasmaus und Tenaxsammelröhrchen geöffnet. Die konnektierte Pumpe wurde aktiviert und zog nun mit einer Flussrate von 100ml/min den Atem aus der „Gasmaus“ durch das Teströhrchen.
Danach wurden die Röhrchen gasdicht verschraubt und zur Laboranalyse transferiert.
Zwischen den einzelnen Probenahmen wurde die „Gasmaus“ 5 min bei einer hohen Flussrate mit gereinigter Luft durchspült.

Zum Vergleich wurden an jedem Probentag jeweils analog Raumluftproben gesammelt, um den Konzentrationsunterschied in der Raumluft und in der Alveolarluft der Studienteilnehmerinnen zu bestimmen.

2.2.4 Thermodesorption, Gaschromatographie, Massenspektrometrie

Da zur Messung flüchtiger organischer Spurenstoffe Messtechniken mit hoher Selektivität und niedriger Nachweisgrenze benötigt werden, kam im Rahmen dieser Studie die Adsorption-Thermodesorption gekoppelt mit Gaschromatographie und Massenspektrometrie (GC/MS) als Standartverfahren der Spurenanalytik zum Einsatz.
Diese Methode basiert auf drei Arbeitsvorgängen (Abb.):

1. Probenahme: Entnahme der zu untersuchenden Atemprobe mittels einer automatischen Pumpe aus dem Sammelmedium „Gasmaus“ und Anreicherung auf Tenax-TA.
2. Aufarbeitung: Reinigung der Probe, d.h. Abtrennung von Störsubstanzen.
3. Messung: Quantitative und Qualitative Bestimmung der auf Tenax adsorbierten Verbindungen mittels Kapillargaschromatographie und Massenspektrometer (GC/MS) nach vorheriger Thermodesorption.

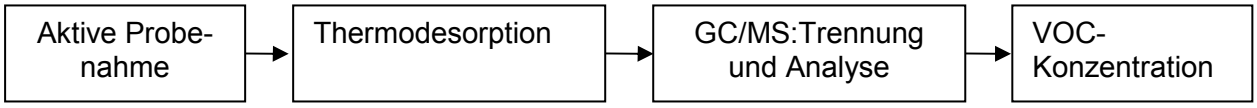


Abbildung 5: Schematischer Ablauf von Probenahme und Analytik

Die Probenahme für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen erfolgte mit TENAX® TA 60/80 als Adsorbens. TENAX® (Polyphenylenoxid) wird dafür in ein Glasröhrchen gefüllt (ca. 200 mg). Dabei wird zuerst Glaswolle, dann das TENAX® TA und am Ende ein Drahtnetz in das Glasrohr eingebracht. Das Drahtnetz und die Glaswolle dienen zur Fixierung des TENAX®. Bei der Probenahme wurde auf der Seite des Drahtnetzes eine Gaspumpe mit einem Volumenstrom von 100 ml/min angeschlossen, um das definierte Probenvolumen über das Adsorbens zu ziehen.

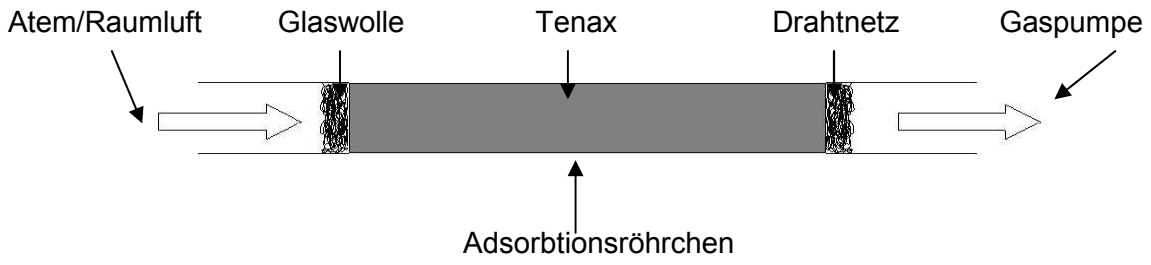


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Probenahme

Die Gaschromatographie (GC) ist, wie alle anderen chromatographischen Verfahren, eine Trennmethode. Die wichtigsten Bestandteile gaschromatographischer Systeme sind, wie in Abbildung 7 dargestellt, Injektor, Trennsäule und Detektor. Der Injektor dient zum Einbringen und Verdampfen der Probe. Die Trennsäule wird von der mobilen Phase, dem Trägergas, durchströmt, das den Transport der Komponenten der zu trennenden Mischung übernimmt. Die verdampfte Probe lagert sich an der stationären Phase der Trennsäule an. Diese befindet sich in einem Ofenraum, wodurch die Auftrennung der Probe kontrolliert und temperaturprogrammiert erfolgen kann. Der Detektor hat die Aufgabe, die aufgetrennten Stoffe zeitlich zu registrieren und eine elektrische Signalgröße zu liefern, um eine Quantifizierung und in Abhängigkeit vom Detektorsystem eine Identifizierung zu ermöglichen. Als Detektoren kommen verschiedenste Geräte zum Einsatz. Standard ist eine Kopplung mit der nachweisstarken Massenspektroskopie, die über die Quantifizierung hinaus wertvolle Informationen zur Substanz-Identifizierung liefert. Mit der Massenspektrometrie wird nicht nur die Masse der Partikel detektiert, sondern auch das Masse-zu-Ladungs-Verhältnis durch ein Massenspektrum abgebildet.

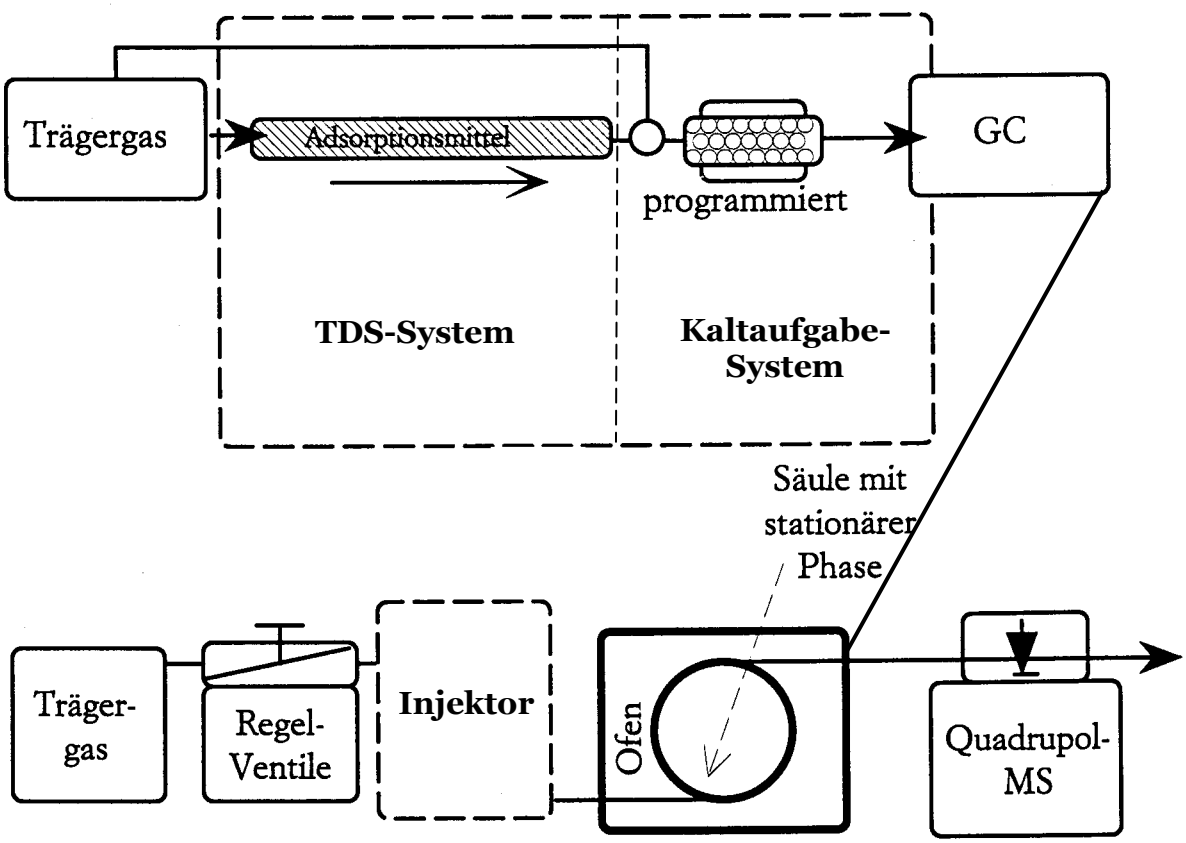


Abbildung 7: Modifiziertes Funktionsblockdiagramm der VOC-Analyse nach Schramm 1995.

Bei der Thermodesorption (TDS-System) werden in einem Ofen die mit dem Trägergas durchströmten Adsorptionsröhrchen bei hohen Temperaturen aufgeheizt. Ist die Desorptionstemperatur für eine Substanz erreicht oder überschritten, wird sie vom Adsorber desorbiert und vom Trägergas mitgerissen. Während der Aufheizphase werden die Stoffe je nach Desorptionstemperatur zu unterschiedlichen Zeitpunkten freigesetzt. Die desorbierten Stoffe werden in einem Kaltaufgabesystem (Kühlfalle) kryofokussiert (gesammelt). Nach Abschluss der Kryofokussierung werden, durch schnelles Aufheizen des Kaltaufgabesystems mit einer definierten Heizrate alle Substanzen verdampft. Diese schlagen sich auf der Trennsäule nieder, wo sie in Wechselwirkung mit der stationären Phase der Säule treten. An der Trennsäule findet ein Ad- und Desorptionsprozess statt, der für jede Substanz unterschiedlich schnell abläuft. Am Ende der Kapillarsäule treten die Komponenten aufgetrennt zu unterschiedlichen Zeiten in den Detektor ein.

Die in dem Gaschromatographen zeitlich aufgetrennten Substanzen des Probengemisches werden in die unter Vakuum stehende Ionisationskammer des Massenspektrometers eingeleitet und dort durch Kollisionen in einer Ionenquelle

ionisiert. Elektronen kollidieren mit den zu analysierenden Molekülen und produzieren Ionen. Diese fragilen Ionen kollabieren und zerfallen in kleinere Fragmente. Diese Fragmente kann man nun anhand ihres Masse-zu-Ladungs-Verhältnisses analysieren. Substanzen im Bereich von 1 µg/m³ können so aufgespürt werden.

2.2.5 Analyseparameter

Zur Verfügung stand das GC/MS-System der Fa. Agilent Technologie, das aus einem Gaschromatographen vom Typ 6890N mit Kaltaufgabesystem und einem Quadrupolmassenspektrometer vom Typ 5973 bestand. Das Trägermedium war Helium. Als Injektor diente ein Kaltaufgabesystem KAS3 zusammen mit einer Thermodesorptionseinheit TDS-2 der Firma Gerstel.

Die beladenden Tenaxröhrchen wurden zunächst mit Helium gespült. Anschließend wurden die VOCs per Thermodesorption von den Röhrchen getrennt. Während der Thermodesorption wurde das beladene Röhrchen in einer Thermodesorptionseinheit aufheizt. Die thermische Desorption begann bei 30℃ mit einer Heizrate von 60℃/min auf 280℃. Das Röhrchen wurde abschließend auf diesem Temperaturniveau 8 min lang ausgeheizt. Nun waren die VOCs im Carriergas Helium gelöst („mobile Phase“). Um „schlanke“ Peaks zu erhalten, wurde die Probe auf einer Kühlfalle, die bei –80℃ gekühlt wird, fokussiert. Diese Kühlfalle, die ebenfalls Tenax enthält, wurde beim Start der gaschromatographischen Analyse mit 12℃/min auf 280℃ hochgeheizt und bei dieser Endtemperatur 5 min belassen. Um Peakdeformationen zu vermeiden, wurde der Analysenstrom 1:10 gesplittet. Über eine Transferleitung, die konstant bei 300℃ gehalten wurde, wurde die Probe auf den Gaschromatographen transferiert. Dort adhärieren die Substanzen an der Kapillarsäule, der so genannten “stationären Phase”, die die Moleküle bei verschiedenen Temperaturen voneinander separiert. Die Interaktionen der gelösten VOCs mit der stationären Phase führen dazu, dass verschiedene Substanzen jeweils zu verschiedenen Zeiten (Retentionszeiten) eluieren. Die Analyse der verschiedenen Siedepunkte und der Vergleich zwischen den Retentionszeiten erlaubte die Identifizierung der Substanzen.

Die gaschromatographische Trennung wurde durch die Säule HP Ultra 2 mit einer Länge von 50 m, einem Innendurchmesser von 0,2 mm und einer Säulenbelegung von 0,33 µm gewährleistet. Mit einem konstanten Fluss von 1,7 ml/min wurde die Probe durch die Säule transportiert. Folgendes Temperaturprogramm wurde hierfür benutzt: 30℃ für

1 min, danach mit 5℃/min auf 130℃, anschließend m it 5℃/min auf 130℃ und mit 30℃ auf 300℃. Bei dieser Endtemperatur wurde die Säule 15 min ausgeheizt.
Die dispergierten Substanzen passierten den Detektor im Gaschromatograph, der der die Unterschiede in der Zusammensetzung der Moleküle in elektrische Signale verwandelte. Diese Signale wurden computerbasiert abgebildet und ergaben ein auszuwertendes Chromatogramm. Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte durch den Vergleich der Massenspektren und der gemessenen Retentionszeiten mit den in der Bibliothek abgespeicherten Massenspektren und Zeiten von Standardverbindungen. Die Quantifizierung erfolgt durch Vergleich der Peakflächen. Hierfür wurde die Software AMDIS 2.1 mit NIST 2.0 (US Department of Commerce, Technology Administration, Gaithersburg, USA) und das Programm Enhanced Chem Station G1701 DA, Version D.00.00.38 (Agilent Technologies) verwendet.
Die gesamte Analysendauer betrug in unserer Studie 41,67 min. Die Bestimmungsgrenze betrug bei 3 Liter Sammelvolumen 0,1-1 µg/m^3 pro Substanz. Blindwerte wurden in regelmäßigen Abständen analysiert. Weitere, detaillierte Informationen zu Methoden und Einstellungen können den Tabellen 4-6 entnommen werden.

Tabelle 2: Durchführung der Probenahme

Probenahmezeit	32 min
Volumenstrom	100 ml/min
Probevolumen	1000 ml
Adsorptionsröhrchen	Tenax

Tabelle 3: Desorption mittels Thermodesorption

Desorptionsbedingungen	280° für 8 min
Kryo-Fokussierung	-80°
transfer line Temperatur	300°
Desorbflow	10 ml/min
Inletflow	60 ml /min
Outletflow	14,5 ml /min

Tabelle 4: GC/MS Bestimmungen der VOC

Gerät	Agilent 6890 Network
Injektionstechnik	splitlos

Säule	50 m Ø (Innen): 0,2 mm Säulenbelegung: 0,33 µm
Trägergas	Helium 6,0
Säulendurchfluss	1,7 ml/min
Säulendruck	ca. 40 psi bis 80 psi
Temperaturprogramm	1. 30℃ für 1 min 2. 5℃/min auf 130℃ 3. 5℃/min auf 130℃ und mit 30℃ auf 300℃
Massenselektiver Detektor im SIM-MODUS	Agilent 5973 Network, Massenspektrometer
Interface-Temperatur	310°
Quantifizierung	mittels kommerziell erhältlicher Standards

2.2.6 Verwendete Chemikalien

Die Probenahme- und Analysebedingungen wurden hinsichtlich der Zielvorstellung, ein möglichst breites Substanzspektrum im Atem zu ermitteln, optimiert. Auf eine vorzeitige Spezialisierung ausgewählter Markersubstanzen hinsichtlich bestimmter Charakteristika wie Polarität, Masse und Stoffklasse wurde bewusst verzichtet, da noch keine einheitlich spezifische Zielgruppe für das Mammakarzinom anerkannt ist.

Die quantitative Analyse umfasste folgende Substanzen:

Tabelle 5: Alkankohlenwasserstoffe

Alkankohlenwasserstoffe	CAS-Nummer
n-Hexan	110-54-3
n-Heptan	142-82-5
n-Oktan	111-65-9
n-Nonan	111-84-2
n-Decan	124-18-5
n-Undecan	1120-21-4
n-Dodecan	112-40-3
n-Tridecan	629-50-5
n-Tetradecan	629-59-4
n-Pentadecan	629-62-9
n-Hexadecan	544-76-3
n-Heptadecan	629-78-7
n-Octadecan	583-45-3
n-Nonadecan	629-29-5
n-Eicosan	112-95-8
2-Methylpentan	107-83-5
3-Methylpentan	96-14-0
Methylcyclopentan	96-37-7
Cyclohexan	110-82-7
2-Methylhexan	591-76-4
3-Methylhexan	589-34-4
2,2,4-Trimethylpentan	540-84-1
Methylcyclohexan	108-87-2
1,4-Dimethylcyclohexan	589-90-2
2,3-Dimethylheptan	3074-71-3
2,2,4,6,6-Pentamethylheptan	13475-82-6
2,2,4,4,6,8,8-Heptamethyl-nonan	4390-04-9

Tabelle 6: Alkenkohlenwasserstoffe

Alkenkohlenwasserstoffe	CAS-Nummer
1-Hepten	592-76-7
1-Octen	111-66-0
1-Nonen	124-11-8
1-Decen	872-05-9
1-Undecen	821-95-4
1-Dodecen	112-41-4
1-Tridecen	2437-56-1

Tabelle 7: Ungesättigte Kohlenwasserstoffe

Ungesättigte Kohlenwasserstoffe	CAS-Nummer
4-Vinylcyclohexen	100-40-3
trimeres Isobuten	7756-94-7
Linalool	126-91-0
4-Phenylcyclohexen	4994-16-5

Tabelle 8: Halogenkohlenwasserstoffe

Halogen-Kohlenwasserstoffe	CAS-Nummer
1,1,1-Trichlorethan	71-55-6
1,2-Dichlorethan	107-06-2
1,2-Dichlorethen	540-59-0
Trichchlormethan	67-66-3
Tetrachlormethan	56-23-5
Trichchlorethen	79-01-6
Tetrachlorethen	127-18-4
Chlorbenzol	108-90-7
1,3-Dichlorbenzol	541-73-1
1,4-Dichlorbenzol	106-46-7
1,2-Dichlorbenzol	95-50-1

Tabelle 9: Terpene

Terpene	CAS-Nummer
α-Pinen	80-56-8
β-Pinen	127-91-3
δ-3-Caren	13466-78-9
α-Terpinen	99-86-5
Limonen	138-86-3
Eucalyptol	470-82-6
Campher	76-22-2
(-)-Borneol	464-45-9
Verbenon	1196-01-6
Isolongifolen	1135-66-6
Longifolen	475-20-7

Tabelle 10: Siloxane

Siloxane	CAS-Nummer
Hexamethyl-cyclotrisiloxan (D3)	541-05-9
Octamethylcyclo-tetrasiloxan (D4)	556-67-2
Decamethylcyclo-pentasiloxan (D5)	541-02-6

Tabelle 11: Ester einwertiger Alkohole

Ester einwertiger Alkohole	CAS-Nummer
Vinylacetat	108-05-4
Ethylacetat	141-78-6
Isopropylacetat	108-21-4
n-Propylacetat	80-62-6
Methacrylsäure-methylester	109-60-4
Butylformiat	592-84-7
Isobutylacetat	110-19-0
n-Butylacetat	123-86-4
Methylbenzoat	93-58-3

Tabelle 12: Aromaten

Aromaten	CAS-Nummer
Benzol	71-43-2
Toluol	108-88-3
Ethylbenzol	100-41-4
m,p-Xylol	1330-20-7
o-Xylol	95-47-6
Styrol	100-42-5
1,3,5-Trimethylbenzol	108-67-8
1,2,4-Trimethylbenzol	95-63-6
1,2,3-Trimethylbenzol	526-73-8
i-Propylbenzol	98-82-8
n-Propylbenzol	103-65-1
3/4-Ethyltoluol	620-14-4
2-Ethyltoluol	611-14-3
1-Methyl-4-Isopropylbenzol	99-87-6
Indan	496-11-7
1,2,4,5-Tetramethylbenzol	95-93-2
1,2,3,4-Tetrahydronaphthalin	119-64-2
Naphthalin	91-20-3
2-Methylnaphthalin	91-57-6
1-Methylnaphthalin	90-12-0
1,3-/1,4-Diisopropylbenzol	99-62-7

Tabelle 13: Ketone

Keton	CAS-Nummer
Methylethyketon (MEK)	78-93-3
Methylisobutylketon (MIBK)	108-10-1
Cyclohexanon	108-94-1
Benzophenon	119-61-9

Tabelle 14: Alkohole/ Aldehyde

Alkohol/ Aldehyd	CAS-Nummer
Isobutanol	78-83-1
n-Butanol	123-72-8
2-Ethyl-1-hexanol	104-76-7
Butanal	123-72-8
Pentanal	110-62-3
Hexanal	66-25-1
Heptanal	111-71-7
Octanal	124-13-0
Nonanal	124-19-6
Decanal	112-31-2
Benzaldehyd	100-52-7

Die Analysen wurden zusammen mit der ALAB GmbH durchgeführt. Auch die Eichlösung wurde von dort bezogen.

2.3 Verbrauchsmaterialien, Geräte, Instrumente

In den nachfolgenden Tabellen sind die Verbrauchsmaterialien, Geräte und Instrumente aufgeführt, welche für die experimentelle Durchführung der Untersuchungen erforderlich waren.

Tabelle 15: Verbrauchsmaterialien der VOC-Analyse

Verbrauchsmaterialien	Hersteller, Land
Thermo-Hygrometer	TFA, BRD
Puderfreie Latexhandschuhe	Kimberley-Clark, USA
Baumwollhandschuhe	China

Tabelle 16: Geräte und Instrumente der VOC-Analyse

Geräte, Instrumente	Hersteller, Stadt, Land
„Gasmaus“	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
Gaschromatograph (GC)	Agilent 6890 Network, Waldbronn, BRD
Massenspektrometer (MS)	Agilent 5973 Network, Waldbronn, BRD
Datensystem	Agilent, Waldbronn, BRD
Thermodesorptionseinheit	Gerstel, TDS, BRD

Tabelle 17: Weitere verwendete Materialien

Geräte, Instrumente	Hersteller, Stadt, Land
Silikonschlauch	GC-Chromatographie Service GmbH, Langerwehe, BRD
Teflonschläuche mit unterschiedlichen Durchmessern	GC-Chromatographie Service GmbH, Langerwehe, BRD
SKC-Universalpumpe, 224-PC XRxx	Analyt-MTC GMBH & CO KG, BRD
Accuro-Handpumpe	Dräger Safety AG &CO KG, BRD
Tenaxröhrchen in Messinghülsen	ALAB GmbH, Berlin, BRD

2.4 Analytische Auswertung

Als Ergebnis der gaschromatographischen Auswertung wurde für jede Atem- und Raumprobe ein Chromatogramm aufgezeichnet. Dabei wurden die einzelnen Substanzen nach der Reihenfolge ihrer Retentionszeiten dargestellt. Die Chromatogramme

wurden computergestützt manuell ausgewertet. Anschließend wurde die Differenz aus der Atem- und Raumluftkonzentration des jeweiligen Versuchsdurchlaufes gebildet. Die Konzentration der identifizierten VOCs lag entweder >0 µg/m^3 oder <0 µg/m^3 oder =0. Waren die VOC-Werte in der Ausatemluft höher als in der Raumluft, so ergaben sich VOC-Konzentrationen im negativen Bereich (negativer Alveolargradient), im umgekehrten Fall lagen sie im positiven Bereich (positiver Alveolargradient). Ein negativer Alveolargradient ist durch die Aufnahme und Verstoffwechslung der organisch flüchtigen Substanz im Organismus definiert. Ein positiver Alveolargradient ist durch die Abgabe der Substanz über die Ausatmungsluft definiert. Ein konstanter Alveolargradient besagt, dass die jeweilige VOC-Konzentration in der Ausatemluft identisch mit der in der Raumluft ist.

Signifikanzen mittels x^2 – Test wurden nicht ermittelt bei n=20. Um jedoch mögliche Zusammenhänge zwischen den drei Gruppierungsvariablen negativer Alveolargradient, Konstante VOC-Menge, positiver Alveolargradient und dem Gesundheitszustand der Studienteilnehmerinnen aufzuzeigen, wurden die Häufigkeitsverteilungen der drei Variablen für jede der analysierten flüchtigen organischen Substanzen in Kreuztabellen angegeben und deskriptiv beschrieben. Bei der Beurteilung der Häufigkeiten der Aufnahme (=negativer Alveolargradient) oder Abgabe (=positiver Alveolargradient) der jeweiligen flüchtigen organischen Substanz waren diejenigen von Interesse, deren Verhältnis zwischen Patientinnen und gesunden Probandinnen im Rahmen natürlicher Streuung besonders ausgeprägt ist und bei denen nur wenige Studienteilnehmerinnen einen konstanten VOC-Alveolargradienten aufweisen, da diese die ohnehin schon geringe Größe der Bezugsgruppe noch verringern. Interessant ist ein hoher Wert bei der VOC-Konstante nur dann, wenn in dem jeweils anderen Studienkollektiv dieser niedrig und der negative bzw. positive Alveolargradient dementsprechend hoch ist.

Die Auswertung der Daten erfolgte qualitativ und quantitativ. Die qualitative Auswertung bedeutet eine Beschreibung der Alveolargradienten und ihrer prozentualen Anteile bezüglich der identifizierten VOCs im Atem von Patientinnen mit Mammakarzinom und gesunden Probandinnen getrennt nach Stoffklassen. Die quantitative Auswertung bedeutet eine Tiefenanalyse der ermittelten statistisch signifikanten flüchtigen organischen Substanzen.

2.5 Statistische Auswertung

Die Datenerfassung wurde mit dem Programm Microsoft Office Excel 2003 durchgeführt. Eine Liste aller Basis- und Rohdaten liegt in einem gesonderten Ausdruck vor und gibt die vollständige in der Datenbank enthaltene Information wieder. Mit Hilfe der Software SPSS Version 15.0 für Windows wurden diese statistisch bearbeitet. Alle statistischen Tests wurden rein explorativ eingesetzt. Insofern haben alle Befunde keinen „beweisenden“ oder „konfirmativen“ Charakter.

Für die qualitative Analyse wurden aufgrund der Fallzahlen n=20 die Häufigkeiten beschrieben und Kreuztabellen eingesetzt.

Für die quantitative Analyse wurden alle untersuchten VOC-Parameter mittels K-S-Test auf Abweichung von einer Normalverteilung geprüft. Als signifikante Abweichung von der Normalverteilung galt eine Irrtumswahrscheinlichkeit $p <= 0,05$. Bei signifikanten Abweichungen wurden nicht-parametrische Verfahren zur statistischen Analyse eingesetzt. Anderenfalls wurden parametrische Verfahren benutzt. Dementsprechend wurde die Gruppe der Kranken mit der Gruppe der Gesunden mittels U-Test nach Mann und Whitney anhand nicht normalverteilter VOC-Parameter verglichen. Konnte hingegen keine signifikante Abweichung von einer Normalverteilung nachgewiesen werden, wurde der T-Test für unabhängige Stichproben für den Vergleich der Kranken mit den Gesunden hinsichtlich VOC-Größen eingesetzt. Für die VOC-Parameter, in denen sich die beiden Gruppen signifikant voneinander unterschieden, wurde eine ROC-Analyse durchgeführt. Die ROC-Kurve stellt den Zusammenhang zwischen Sensitivität und Spezifität dar, indem geeignete Trennwerte zwischen pathologischen und physiologischen Wertebereichen ermittelt werden (Swets 1986). Die Cut-Off-Werte sollten möglichst so gewählt sein, dass die Sensitivität und die Spezifität ihren größtmöglichen Wert annehmen; denn dort befindet sich die beste Trennung zwischen Gesunden und Kranken und eine diagnostische und prognostische Sicherheit ist gegeben (Hanley 1989).

Da es sich bei der vorliegenden Untersuchung um einen rein explorativen Ansatz handelte, wurde keine Adjustierung der p-Werte vorgenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Patientinnen und Probandinnen

In der folgenden Tabelle werden die wichtigsten Merkmale der Patientinnen mit Mammakarzinom (n=10) und der gesunden Probandinnen (n=10) vorgestellt.

Tabelle 18: Charakteristika der Patientinnen (n=10) und Probandinnen (n=10)

Patientin	n	Größe (in cm)	Gewicht (in kg)	Alter (in Jahren)	Menopausen-status
	1	1,68	72	61	post
	2	1,62	94	68	post
	3	1,70	73	65	post
	4	1,69	73	62	post
	5	1,74	59	41	prae
	6	1,68	67	73	post
	7	1,62	80	68	post
	8	1,60	62	69	post
	9	1,67	64	73	post
	10	1,66	62	65	post
Probandin					
	1	1,63	59	52	post
	2	1,60	67	69	post
	3	1,62	76	59	post
	4	1,64	65	54	post
	5	1,60	79	70	post
	6	1,71	68	51	post
	7	1,70	85	59	post
	8	1,70	80	60	post
	9	1,60	58	57	post
	10	1,64	76	56	post

Die klinischen Merkmale zeigten sich wie folgt: Das durchschnittliche Alter der 10 in dieser klinischen Studie erfassten Patientinnen lag über der Kontrollgruppe und betrug 64,5 (41-73) Jahre, der Median 66,5 Jahre (Abb. 8). Der Body-Mass-Index lag in beiden Gruppen auf vergleichbarem Niveau und lag im Mittel bei 25,50 kg/m² (19 – 36), mit einer Standardabweichung von 4,67 (Abb. 9). 9/10 (90%) Frauen waren postmenopausal, 1 von 10 Frauen (10%) war prämenopausal.

In der gesunden Kontrollgruppe zeigten sich die klinischen Merkmale wie folgt: Das durchschnittliche Alter der 10 in dieser klinischen Studie erfassten Probandinnen betrug 58,5 (51-70) Jahre, der Median 58 Jahre (Abb. 8). Der Body-Mass-Index lag im Mittel bei 26,30 kg/m² (22 – 31), mit einer Standardabweichung von 3,13 (Abb. 9).

Tabelle 19: Alter und BMI der Patientinnen (n=10) und Probandinnen (n=10)

		Mittelwert (in Jahren)	Standard-abweichung (in Jahren)	Minimum (in Jahren)	Maximum (in Jahren)
Patientinnen (n=10)	Alter	64,40	9,095	41	73
	BMI	25,50	4,673	19	36
Probandinnen (n=10)	Alter	58,90	6,280	52	70
	BMI	26,30	3,129	22	31

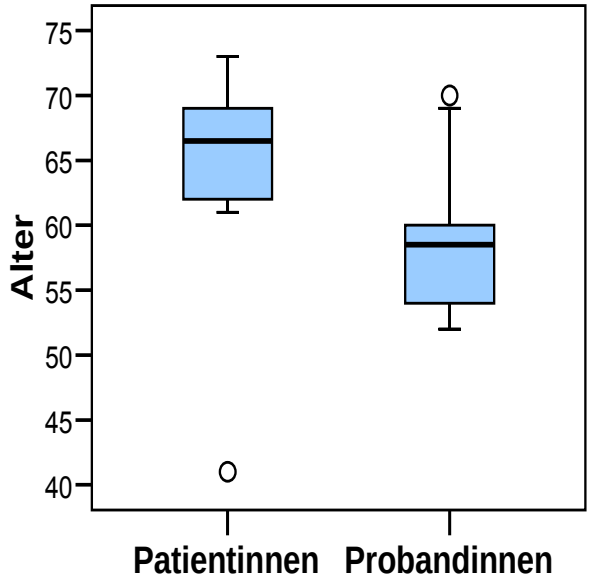


Abbildung 8: Box-Whisker-Plot für das Alter der Patientinnen und Probandinnen

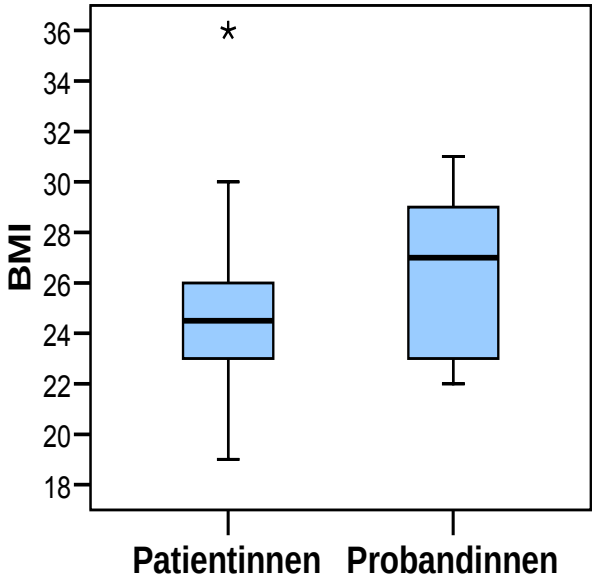


Abbildung 9: Box-Whisker-Plot für den BMI der Patientinnen und Probandinnen

Histologisch wurde bei allen Patientinnen (100%) durch Stanzbiopsie die Diagnose invasives Mammakarzinom gesichert. In der postoperativen histopathologischen Aufarbeitung wurden die Diagnosen bestätigt.

Tabelle 20: Diagnosen der Patientinnen (n=10)

Patientin	Lokalisation des Karzinoms	Histologie
1	Mamma rechts oben innen	invasives duktales Karzinom ER: 80% PR: 0% HER2(neu): keine Amplifikation pT2 pN0 M0 G3 R0 L0 V0

2	Mamma links oben außen	invasives duktales Karzinom & DCIS ER: 100% PR: 15% HER2(neu): 1+ pT1a pN0 (0/2 sn) M0 G2 R0 L0 V0 & pTis (DCIS) G3 R0 L0 V0
3	Mamma rechts unten außen	invasives duktales Karzinom & DCIS ER:50% PR:30% HER2(neu): 3+ pT1a pN0(0/1sn) M0 G2 R0 L0 V0 & pTis (DCIS)
4	Mamma links unten innen	tubuläres Karzinom ER: 100% PR: 80% HER2(neu): 1+ pT1c pN0 (0/1sn) M0 G1 R0 L0 V0
5	Mamma links außen, inter-quadrantär	invasives duktales Karzinom ER: 80% PR: 20% HER2: 1+ pT1c pN0 (0/2sn) M0 G2 R0 L1 V0
6	Mamma links oben innen und zwischen beiden oberen Quad-ranten	invasives duktales Karzinom & DCIS ER: 100% PR: 60%-80% HER2(neu): 1+ pT1a, pN0 M0 G2 R0 L0 V0 & pTis (DCIS)
7	Mamma rechts oben aussen	invasives duktales Karzinom & DCIS ER: 80% PR: 40% HER2(neu): 1+ pT2 pN1mic (1/14) M0 G2 R0 & pTis (DCIS) G2 R0 L0 V0
8	Mamma links oben außen	invasives duktales Karzinom & DCIS ER: 90% PR: 10% HER2(neu): 1+ pT1c pN0 (0/1sn) M0 G1 R0 L0 V0 pTis (DCIS) G1 R0 L0 V0
9	Mamma links oben innen	invasiv lobuläres Karzinom ER: 0% PR: 0% HER2(neu): 0 pT2 pN0 M0 G2 R1 L0 V0
10	Mamma links unten innen	invasiv lobuläres Karzinom ER: 100% PR: 60% HER2(neu): 1+ pT1c pN1a M0 G2 R1 L1 V0

Histologie: Wie aus der Abbildung 10 hervorgeht, wurde beim überwiegenden Anteil der Patientinnen (7/10) ein invasiv duktales Karzinom diagnostiziert. Ein invasiv lobuläres Karzinom fand sich in 20% (2/10) der histologischen Befunde. Das tubuläre Karzinom wurde in 10% (1/10) der Fälle diagnostiziert.

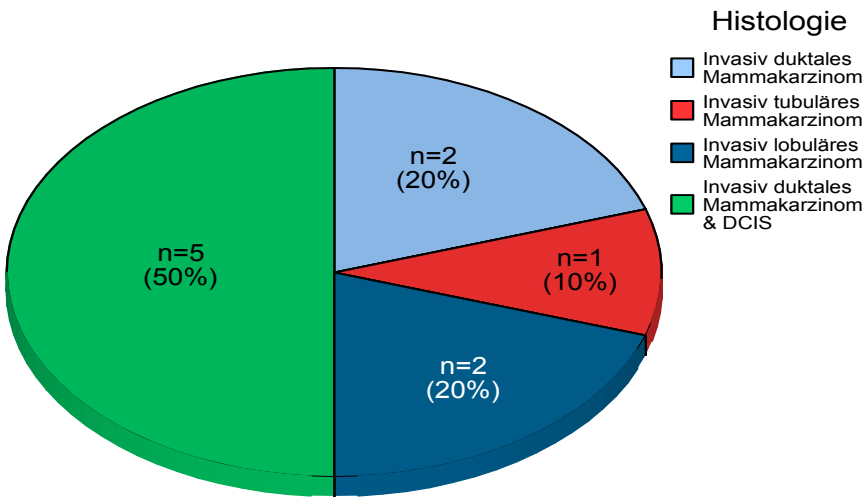


Abbildung 10: Überblick über die histologischen Typen

Die linke Brust war in 70% (7/10) der Fälle betroffen, die rechte Brust in 30% (3/10). In 30% (3/10) war der obere äußere, in 30% (3/10) der obere innere, in 0% (0/10) der untere äußere und in 20% (2/10) der untere innere Quadrant betroffen. In 80% (8/10) lag der Tumor im zentralen Drüsenkörper, in 20% (2/10) durchsetzte er mehrere Teilregionen. Der Blick auf die Häufigkeitsverteilung beim Differenzierungsgrad der Karzinome in Abb. ? zeigt, dass bei 10% (n=1) eine mäßige (G3) Zelldifferenzierung diagnostiziert wurde, 70% (n = 7) wurden als G2 und 20% (n =2) als G1 klassifiziert.

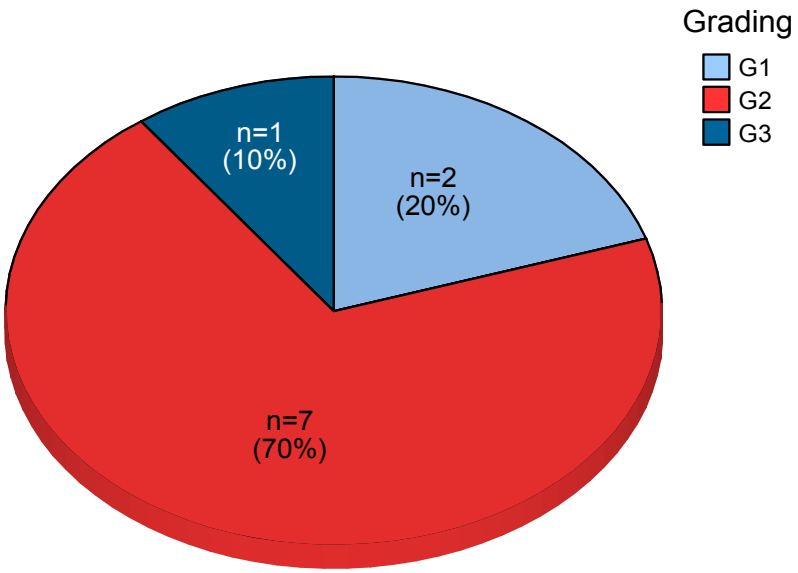


Abbildung 11: Überblick über die prozentuale Verteilung des Grading

Tabelle 21: Häufigkeitsverteilung beim Grading

Grading	Anzahl Patientinnen	%
G1	2	20
G2	7	70
G3	1	10

Wie aus der Abbildung 12 hervorgeht, waren alle Patientinnen bei Diagnosestellung bzw. Operation in einem Anfangsstadium. Bei 30% (3/10) der Tumoren betrugen die Durchmesser mehr als 2 cm, aber nicht mehr als 5 cm, bei 30% (n = 3/10) lagen sie bei 0,5 cm oder weniger und bei 40 % (4/10) betrugen sie mehr als 1 cm, aber nicht mehr als 2 cm. Bei 20% konnten Lymphknoten beurteilt werden, bei 0% lagen Fernmetastasen vor.

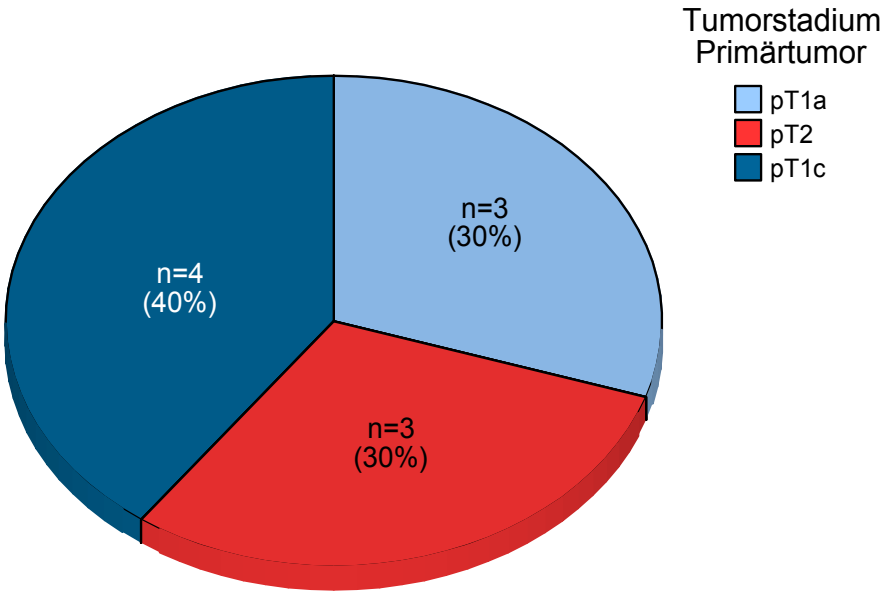


Abbildung 12: Überblick über die Verteilung der Tumorstadien im Gesamtkollektiv

Tabelle 22: Häufigkeitsverteilung der Patientinnen in den gruppierten Tumorstadien

Stadium	Anzahl Patientinnen	%
Ia bis Ic	7	70
IIa bis IIc	3	30
IIIa bis IIIc	0	0
IV	0	0

3.2 Auswertung der Daten

Im Rahmen dieser Studie wurde das im Atem enthaltene VOC-Spektrum von 10 Patientinnen (n=10) mit der klinischen Diagnose „Mammakarzinom“ versus 10 Probandinnen (n=10) ohne die klinische Diagnose „Mammakarzinom“ analysiert.

Tabelle 23: Gegenstand der Untersuchung

Probenart	Probenbezeichnung	Untersuchungsparameter	Luftmenge
Tenax-Sammelröhrchen	n=10; Patientinnen	VOC	1Liter
Tenax-Sammelröhrchen	n=10; Probandinnen	VOC	1Liter

Unter Anwendung der Gaschromatographie in Kombination mit der Massenspektrometrie wurden 109 VOCs aus 10 verschiedenen Stoffklassen auf signifikante Konzentrationsunterschiede in der Ausatemluft von Mammakarzinompatientinnen und gesunden Probandinnen getestet. Davon konnten im Atem der Studienteilnehmerinnen zwischen 83 und 100 organisch flüchtige Verbindungen identifiziert werden, zu denen Alkane, Alkene, Ketone, Halogenkohlenwasserstoffe, Ester, Ungesättigte Kohlenwasserstoffe, Terpene, Siloxane, Alkohole und Aromaten gehören. Aber nur 74 der 103 VOC waren Bestandteile aller Atemproben, die in der folgenden Tabelle aufgelistet sind.

Tabelle 24: Identifizierte VOCs aller Atemproben

Stoffgruppe	Substanz		
Alkankohlenwasserstoffe	n-Heptan	n-Dodecan	3-Methylpentan
	n-Undecan	Eicosan	Methylcyclohexan
	n-Pentadecan	Cyclohexan	n-Decan
	n-Hexadecan	Isooctan	n-Tetradecan
	3-Methylhexan	n-Nonan	2,2,4,4,6,8,8Heptamethylnonan
	n-Nonadecan	n-Tridecan	2,2,4,6,6-Pentamethylheptan
	n-Octan	2-Methylpentan	Methylcyclopentan
	n-Heptadecan		
Alkenkohlenwasserstoffe	Hepten		
Ungesättigte Kohlenwasserstoffe	Trimeres Isobuten	Linalool	
Aromatische Kohlenwasserstoffe	Benzol	Styrol	1,3,5-Trimethylbenzol
	Toluol	o-Xylol	2- Methylnaphthalin
	Ethylbenzol	n-Propylbenzol	1,2,4-Trimethylbenzol
	m+p-Xylol	3/4-Ethyltoluol	1-Methyl-4-isopropylbenzol
	Indan	2-Ethyltoluol	1,2,3-Trimethylbenzol
Chlorierte Kohlenwasserstoffe	Trichlormethan	Trichlorethen	1,1,1-Trichlorethan
		Perchlorethen	Tetrachlormethan

Terpene	ß-Pinen	Limonen	Verbenon
	Δ-3-Caren	Eucalyptol	Longifolen
	α-Terpinen	Campher	Caryophyllen
Ester einwertiger Alkohole	Ethylacetat	Butylformiat	Isobutylacetat
	Methylbenzoat		
Ketone	Methylethylketon	Cyclohexanon	Methylisobutylketon
Siloxane	Hexamethylcyclo-trisiloxan	Octamethyl-cyclotetrasiloxan	Decamethylcyclopentasiloxan
Alkohole	n-Butanol	Pentanal	2-Ethyl-1-hexanol
	Butanal	Hexanal	Nonanal
	Octanal	Heptanal	Decanal
	Benzaldehyd		

Das Ziel dieser Studie, unter diesen Substanzen sensitive und spezifische Biomarker hinsichtlich des Mammakarzinoms zu finden, wurde erreicht. Es gelang, fünf organisch flüchtige Verbindungen als Biomarker im Atem für das Mammakarzinom nachzuweisen.

3.2.1 Qualitative Analyse

Die qualitative Analyse der VOC-Stoffklassen ergab, dass in der Ausatemluft der Patientinnen für insgesamt 99 organisch flüchtige Substanzen ein positiver Alveolargradient ermittelt wurde. Bei den gesunden Probandinnen wurde für 93 Substanzen ein positiver Alveolargradient ermittelt. Ein negativer Alveolargradient konnte für 98 Substanzen in der Ausatemluft der Patientinnen nachgewiesen werden, bei den gesunden Probandinnen konnte hingegen für 64 Substanzen ein negativer Alveolargradient nachgewiesen werden. Zu dem wurde ersichtlich, dass durchschnittlich mehr Patientinnen einen positiven Alveolargradienten für Alkene, Terpene, Siloxane und Alkohole zeigten als die gesunden Probandinnen. Hingegen verzeichneten letztere vermehrt einen positiven Alveolargradienten für Alkane, Halogenkohlenwasserstoffe und Aromaten. Bei den anderen Substanzgruppen (Ester einwertiger Alkohole, Ketone) differierte der Alveolargradient nicht. In Tabelle 25-30 sind die Alveolargradienten der auffälligsten Vertreter der einzelnen Stoffklassen zusammengestellt. Die Einzelgehalte aller organisch flüchtigen Substanzen sind im Anhang in Tabelle 1-10 zusammengefasst.

3.2.1.1 Alkane

Insgesamt wurden 26 Alkane im Atem sowohl von Patientinnen mit Mammakarzinom als auch von gesunden Probandinnen identifiziert. Auffällig von diesen sind n-Hexan; n-Dodekan; n-Tridekan; n-Pentadekan; n-Hexadekan; n-Heptadekan; Cyclohexan; 2-Methylhexan und 3-Methylhexan. Die prozentuale Verteilung der Alveolargradienten

zeigt Unterschiede zwischen beiden Studienkollektiven: Bei den gesunden Probandinnen lässt sich ein negativer Alveolargradient für n-Hexan (7/10), n-Tridekan (9/10) und Cyclohexan (8/10) feststellen, d.h. über die Mehrzahl der Probandinnen nimmt die genannten VOCs im Organismus auf und verstoffwechselt diese. Bei den Patientinnen hingegen ist es nur eine Minderheit, die für n-Hexan (4/10), n-Tridekan (4/10) und Cyclohexan (4/10) einen negativen Alveolargradienten aufweisen. Die Mehrzahl der Patientinnen weist für n-Hexan (6/10) und Cyclohexan (6/10) einen positiven Alveolargradienten auf, was für die Abgabe dieser VOCs spricht. Eine Ausnahme bildet n-Tridekan. Bei 6/10 Patientinnen ist die Konzentration dieser Substanz in der Ausatemluft konstant. Ähnlich verhält sich n-Pentadekan. Bei 5/10 gesunden Probandinnen ist die Substanzkonzentration konstant, die Mehrzahl der Patientinnen (8/10) weist hingegen einen negativen Alveolargradienten auf. Ebenso weisen einen negativen Alveolargradienten die Mehrzahl der Patientinnen für n-Dodekan (5/10), n-Hexadekan (8/10), 2-Methylhexan (7/10) und 3-Methylhexan (6/10) auf. Für diese VOCs verzeichnet allerdings die Mehrzahl der gesunden Probandinnen einen positiven Alveolargradienten. Interessant ist weiterhin die Substanz n-Heptadekan, für die bei 8/10 gesunden Probandinnen kein Konzentrationsunterschied zwischen Raumluft und Ausatemluft nachgewiesen werden konnte, d.h. diese flüchtige organische Substanz wird von den gesunden Probandinnen weder vom Organismus aufgenommen noch abgegeben. 4/10 Patientinnen hingegen nahmen sie entweder auf bzw. gaben sie wieder ab. Eine konstante Konzentration wurde nur bei 2/10 Patientinnen gemessen. Deutlich wird, dass in Bezug auf die Abgabe und Aufnahme der beschriebenen VOCs Unterschiede zwischen beiden Untersuchungsgruppen bestehen.

Tabelle 25: Darstellung der absoluten Häufigkeiten der Alveolargradienten – Alkane

Alkan		Gruppe		
		Probandinnen	Patientinnen	Gesamt
n-Hexan	Negativer Alveolargradient	7(70%)	4(40%)	11(55%)
	VOC-Konstant	0(0%)	0(0%)	0(0%)
	Positiver Alveolargradient	3(30%)	6(60%)	9(45%)
n-Dodekan	Negativer Alveolargradient	0(0%)	5(50%)	5(25%)
	VOC-Konstant	2(20%)	1(10%)	3(15%)
	Positiver Alveolargradient	8(80%)	4(40%)	12(60%)
n-Tridekan	Negativer Alveolargradient	9(90%)	4(40%)	13(65%)
	VOC-Konstant	1(10%)	6(60%)	7(35%)
	Positiver Alveolargradient	0(0%)	0(0%)	0(0%)

n-Pentadekan	Negativer Alveolargradient	3(30%)	8(80%)	11(55%)
	VOC-Konstant	5(50%)	0(0%)	5(25%)
	Positiver Alveolargradient	2(20%)	2(20%)	4(20%)
n-Hexadekan	Negativer Alveolargradient	4(40%)	8(80%)	12(60%)
	VOC-Konstant	2(20%)	0(0%)	2(10%)
	Positiver Alveolargradient	4(40%)	2(20%)	6(30%)
n-Heptadekan	Negativer Alveolargradient	2(20%)	4(40%)	6(30%)
	VOC-Konstant	8(80%)	2(20%)	10(50%)
	Positiver Alveolargradient	0(0%)	4(40%)	4(20%)
Cyclohexan	Negativer Alveolargradient	8(80%)	4(40%)	12(60%)
	VOC-Konstant	0(0%)	0(0%)	0(0%)
	Positiver Alveolargradient	2(20%)	6(60%)	8(40%)
2-Methylhexan	Negativer Alveolargradient	3(30%)	7(70%)	10(50%)
	VOC-Konstant	0(0%)	0(0%)	0(0%)
	Positiver Alveolargradient	7(70%)	3(30%)	10(50%)
3-Methylhexan	Negativer Alveolargradient	2(20%)	6(60%)	8(40%)
	VOC-Konstant	2(20%)	1(10%)	3(15%)
	Positiver Alveolargradient	6(60%)	3(30%)	9(45%)

3.2.1.2 Alkene

Insgesamt wurden 7 Alkene identifiziert. Auffällig von diesen sind Octen und Decen. Während die Mehrzahl der Patientinnen (7/10) einen höheren negativen Alveolargradienten für Octen zeigt, ist bei der Mehrzahl der gesunden Probandinnen die Konzentration dieser Substanz in der Ausatemluft konstant, d.h. sie wird weder aufgenommen noch abgegeben. Für Decen verzeichnet die Hälfte der Probandinnen (5/10) einen positiven Alveolargradienten, während bei 4/10 Probandinnen die Konzentration konstant ist. 4/10 Patientinnen hingegen nehmen Decen weder auf noch geben Decen ab.

Tabelle 26: Darstellung der absoluten Häufigkeiten der Alveolargradient – Alkene

Alken		**Gruppe**		
		Probandinnen	**Patientinnen**	**Gesamt**
Octen	Negativer Alveolargradient	4(40%)	7(70%)	11(55%)
	VOC-Konstant	6(60%)	0(0%)	6(30%)
	Positiver Alveolargradient	0(00%)	3(30%)	3(15%)
Decen	Negativer Alveolargradient	1(10%)	4(40%)	5(25%)
	VOC-Konstant	4(40%)	2(20%)	6(30%)
	Positiver Alveolargradient	5(50%)	4(40%)	9(45%)

3.2.1.3 Ungesättigte Kohlenwasserstoffe

Insgesamt wurden 4 ungesättigte Kohlenwasserstoffe identifiziert. Unter ihnen zeigte sich keine flüchtige organische Substanz, die einen markanten Unterschied in Bezug auf ihre Verstoffwechslung zu erkennen gibt.

3.2.1.4 Aromatische Kohlenwasserstoffe

Insgesamt wurden 21 Aromatische Kohlenwasserstoffe identifiziert. Auffällig von diesen sind Toluol, 1,24-Trimethylbenzol, 3,4 Ethyltoluol, 2-Ethyltoluol und Naphthalin. Interessant ist Toluol, wo ein reziprokes Verhältnis vorliegt. Während die Mehrzahl der Probandinnen (7/10) Toluol aufnehmen, gibt die Mehrzahl der Patientinnen (7/10) Toluol ab. 1,2,4- Trimethylbenzol fällt insofern ins Auge, da alle Probandinnen (10/10) diese Substanz abgeben, gegenüber den Patientinnen, von denen 6/10 diese Substanz abgeben. Ein ähnliches Verhältnis ist für 3,4 Ethyltoluol zu verzeichnen. Alle Probandinnen (10/10) geben diese organisch flüchtige Substanz ab, während es bei den Patientinnen nur die Hälfte tun (5/10). Und auch die organisch flüchtige Substanz Naphthalin geben mehr als die Hälfte der Probandinnen (9/10) ab, hingegen ist die Konzentration dieser Substanz bei 6/10 Patientinnen konstant. Nur 3/10 geben sie mit der Ausatemluft wieder ab. Auch für 2-Ethyltoluol ist ein höherer positiver Alveolargradient bei den gesunden Probandinnen zu verzeichnen. Bei den Patientinnen bestehen zwischen Auf- und Abgabe dieser Substanz keine markanten Differenzen.

Tabelle 27: Darstellung der absoluten Häufigkeiten der Alveolargradienten – Aromatische Kohlenwasserstoffe

Aromatische Kohlenwasserstoffe		Gruppe		
		Probandinnen	Patientinnen	Gesamt
Toluol	Negativer Alveolargradient	7(70%)	3(30%)	10(50%)
	VOC-Konstant	0(0%)	0(0%)	0(0%)
	Positiver Alveolargradient	3(30%)	7(70%)	10(50%)
1,2,4- Trimethylbenzol	Negativer Alveolargradient	0(0%)	4(40%)	4(20%)
	VOC-Konstant	0(0%)	0(0%)	0(0%)
	Positiver Alveolargradient	10(100%)	6(60%)	16(80%)
3,4 Ethyltoluol	Negativer Alveolargradient	0(0%)	3(30%)	3(15%)
	VOC-Konstant	0(0%)	2(20%)	2(10%)
	Positiver Alveolargradient	10(100%)	5(50%)	15(75%)
2-Ethyltoluol	Negativer Alveolargradient	0(0%)	4(40%)	4(20%)
	VOC-Konstant	3(30%)	2(20%)	5(25%)
	Positiver Alveolargradient	7(70%)	4(40%)	11(45%)

Naphthalin	Negativer Alveolargradient	0(0%)	1(10%)	1(5%)
	VOC-Konstant	1(10%)	6(60%)	7(35%)
	Positiver Alveolargradient	9(90%)	3(30%)	12(60%)

3.2.1.5 Halogenkohlenwasserstoffe

Insgesamt wurden 11 Halogenkohlenwasserstoffe identifiziert. Auffällig von diesen sind Trichlorethylen und Perchlorethylen. Besonders interessant ist Trichlorethylen, da 8/10 Patientinnen diese Substanz ausatmen und nur 2/10 sie aufnehmen. Hingegen ist bei 6/10 Probandinnen die Konzentration konstant, so dass Auf- und Abgabe sekundär zu bewerten ist. Ähnliches gilt für Perchlorethylen. 7/10 Patientinnen weisen einen positiven Alveolargradienten auf, hingegen ist bei 7/10 Probandinnen die Konzentration konstant.

Tabelle 28: Darstellung der absoluten Häufigkeiten der Alveolargradienten – Halogenkohlenwasserstoffe

Halogenkohlenwasserstoffe		**Gruppe**		
		Probandinnen	**Patientinnen**	**Gesamt**
Trichlorethylen	Negativer Alveolargradient	1(10%)	2(20%)	3(15%)
	VOC-Konstant	6(60%)	0(0%)	6(30%)
	Positiver Alveolargradient	3(30%)	8(80%)	11(55%)
Perchlorethylen	Negativer Alveolargradient	0(0%)	2(20%)	2(10%)
	VOC-Konstant	7(70%)	1(10%)	8(40%)
	Positiver Alveolargradient	3(30%)	7(70%)	10(50%)

3.2.1.6 Terpene

Insgesamt wurden 13 Terpene identifiziert. Auffällig von diesen sind Verbenon, Vanillin und Caryophyllen. Verbenon wird von 8/10 Patientinnen abgegeben, während es bei den Probandinnen von nur 4/10 abgegeben wird. Bei 5/10 der Probandinnen ist die Konzentration konstant. Vanillin ist auffällig, da 10/10 der Probandinnen eine konstante Konzentration aufweisen, während es bei den Patientinnen nur 5/10 tun. Die andere Hälfte der Patientinnen nimmt vielmehr diese Substanz auf. Caryophyllen wird von der Mehrzahl der Patientinnen (6/10) aufgenommen, während die Mehrzahl der Probandinnen (7/10) Caryophyllen abgibt.

Tabelle 29: Darstellung der absoluten Häufigkeiten der Alveolargradienten – Terpene

Terpene		Gruppe		
		Probandinnen	Patientinnen	Gesamt
Verbenon	Negativer Alveolargradient	1(10%)	1(10%)	2(10%)
	VOC-Konstant	5(50%)	1(10%)	6(30%)
	Positiver Alveolargradient	4(40%)	8(80%)	12(60%)
Vanillin	Negativer Alveolargradient	0(0%)	5(50%)	5(25%)
	VOC-Konstant	10(100%)	5(50%)	15(75%)
	Positiver Alveolargradient	0(0%)	0(00%)	0(0%)
Caryophyllen	Negativer Alveolargradient	0(0%)	6(60%)	6(30%)
	VOC-Konstant	3(30%)	2(20%)	5(25%)
	Positiver Alveolargradient	7(70%)	2(20%)	9(45%)

3.2.1.7 Siloxane

Insgesamt wurden 3 Siloxane identifiziert. Unter ihnen zeigte sich keine flüchtige organische Substanz als markant different.

3.2.1.8 Ester einwertiger Alkohole

Insgesamt wurden 9 Ester einwertiger Alkohole identifiziert. Auffällig von diesen ist Butylformiat. Mehr als die Hälfte der Patientinnen (6/10) haben einen positiven Alveolargradienten, während bei den Probandinnen keine markanten Differenzen zwischen den drei Gruppierungsvariablen ins Auge fallen.

Tabelle 30: Darstellung der absoluten Häufigkeiten der Alveolargradienten – Ester einwertiger Alkohole

Ester einwertiger Alkohole		Gruppe		
		Probandinnen	Patientinnen	Gesamt
Butylformiat	Negativer Alveolargradient	4(40%)	1(10%)	5(25%)
	konstant	3(30%)	3(30%)	6(30%)
	Positiver Alveolargradient	3(30%)	6(60%)	9(45%)

3.2.1.9 Ketone

Insgesamt wurden 4 Ketone identifiziert. Unter ihnen zeigte sich keine flüchtige Substanz, die als markant different bewertet werden kann.

3.2.1.10 Alkohole und Aldehyde

Insgesamt wurden 11 Alkohole und Aldehyde identifiziert. Auffällig von diesen sind Isobutanol; 2-Ethyl-1-hexanol und Butanal. Unter ihnen erscheint 2-Ethyl-1-hexanol als

besonders markant. 9/10 Patientinnen weisen einen positiven Alveolargradienten auf, gegenüber 5/10 der Probandinnen. Und auch Isobutanol ist interessant, da 10/10 Patientinnen eine konstante Konzentration dieser Substanz aufzeigen, hingegen nur 4/10 Probandinnen. Hier zeigt sich ein höherer negativer Alveolargradient, da 4/10 der Probandinnen diese Substanz aufnehmen. Für Butanal lässt sich erneut ein reziprokes Verhältnis ausmachen. Während 6/10 der Probandinnen Butanal aufnehmen, geben 7/10 Patientinnen diese Substanz ab.

Tabelle 30: Darstellung der absoluten Häufigkeiten der Alveolargradienten – Alkohole und Aldehyde

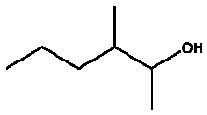
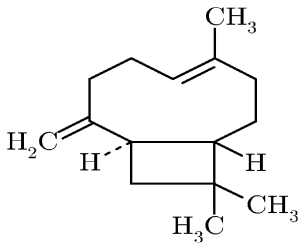
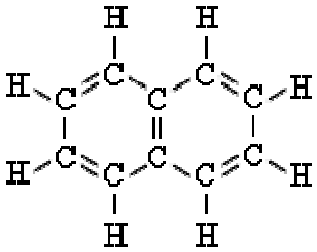
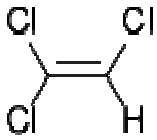
Alkohole und Aldehyde		Gruppe		
		Probandinnen	Patientinnen	Gesamt
Isobutanol	Negativer Alveolargradient	4(40%)	0(0%)	4(20%)
	VOC-Konstant	4(40%)	10(100%)	14(70%)
	Positiver Alveolargradient	2(20%)	0(00%)	10 (50%)
2-Ethyl-1-Hexanol	Negativer Alveolargradient	1(10%)	1(10%)	2(10%)
	VOC-Konstant	4(40%)	0(0%)	4(20%)
	Positiver Alveolargradient	5(50%)	9(90%)	14(70%)
Butanal	Negativer Alveolargradient	6(60%)	1(10%)	7(35%)
	VOC-Konstant	0(0%)	2(20%)	2(10%)
	Positiver Alveolargradient	4(40%)	7(70%)	11(55%)

3.2.2 Quantitative Analyse

Für alle identifizierten VOCs wurden Minimum, Maximum, Mittelwert und Standardabweichung bestimmt (Anhang). Die deskriptive, quantitative Analyse der Untersuchungen zeigt eine hohe Streuung in Bezug auf die Spannweite, den Mittelwert und die Standartabweichung der Variablen. Unter den identifizierten Substanzen fanden sich jedoch fünf VOCs aus der Stoffgruppe der Alkane, Alkene, Halogenkohlenwasserstoffe, Aromaten und Terpene, für die sich jeweils ein signifikanter Unterschied zwischen den Kranken und Gesunden zeigt (Tabelle 31). In der Atemluft der Probandinnen waren die Konzentrationen von 3-Methylhexan, Decen, Caryophyllen und Naphthalin signifikant höher gegenüber den Patientinnen mit Mammakarzinom. Hingegen waren die Konzentrationen von Trichchlorethylen in der Atemluft der Patientinnen signifikant höher. Die Mittelwerte für die restlichen untersuchten VOCs weisen eine nur geringe Differenz auf. Aus diesem Grund konnten keine Signifikanzen ermittelt werden. Die VOCs, bei denen sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Kranken und Gesunden zeigte, werden im Folgenden anhand beschreibender Maßzahlen sowie Boxplotdiagrammen darge-

stellt. Darüber hinaus wird mittels ROC-Analyse ermittelt, in welchem Bereich sich der Cut-Off-Wert des VOC befindet, der die Kranken von den Gesunden unterscheidet. Da die p-Werte explorativ bewertet werden, wurde nicht adjustiert.

Tabelle 31: Summenformel, Strukturformel und CAS-Nummer der signifikanten VOCs

Bezeichnung der Substanz	Stoffklasse	Summen-formel	Strukturformel	CAS-nummer
3-Methylhexan	Alkan	C_7H_{16}		617-78-7
Decen	Alken	$C_{10}H_{20}$		872-05-9
Caryophyllen	Terpen	$C_{15}H_{24}$		87-44-5
Naphthalin	Aromat	$C_{10}H_8$		91-20-3
Trichlorethylen	Halogen-kohlen-wasserstoff	C_2HCl_3		79-01-6

Die Untersuchungen zeigen, dass die VOC-Konzentrationen im Atem in einem Bereich von wenigen Mikrogramm (µg/m^3) bis hin zu einigen 100 µg/m^3 je Substanz lagen.

3.2.2.1 Alkan 3-Methylhexan

Für 3-Methylhexan konnte ein signifikanter Konzentrationsunterschied im Atem von Patientinnen gegenüber gesunden Probandinnen ermittelt werden.

Tabelle 32: Deskriptive Statistik für 3-Methylhexan

3-Methylhexan	n	Mittelwert [µg/m³]	Standard-abweichung [µg/m³]	Min [µg/m³]	Max [µg/m³]	Perzentile [µg/m³]		
						25.	50. (Median)	75.
Probandinnen	10	0,210	0,4748	-0,4	1,4	0,025	0,150	0,325
Patientinnen	10	-0,350	0,5563	-1,5	0,2	-0,725	-0,150	0,125

(keine signifikante Abweichung von einer Normalverteilung, Kolmogorov-Smirnov-Test)
Die Angabe der Ergebnisse erfolgt in Mikrogramm Substanz pro Kubikmeter Luft [µg/m³].

Die Gruppen wurden durch den T-Test und den vorgeschalteten Levene-Test (der auf Variantengleichheit prüft) auf Mittelwertunterschiede geprüft. Trotz der geringen Differenz konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Kranken und Gesunden nachgewiesen werden (p=0,026). Der Unterschied wird in folgendem Boxplotdiagramm veranschaulicht:

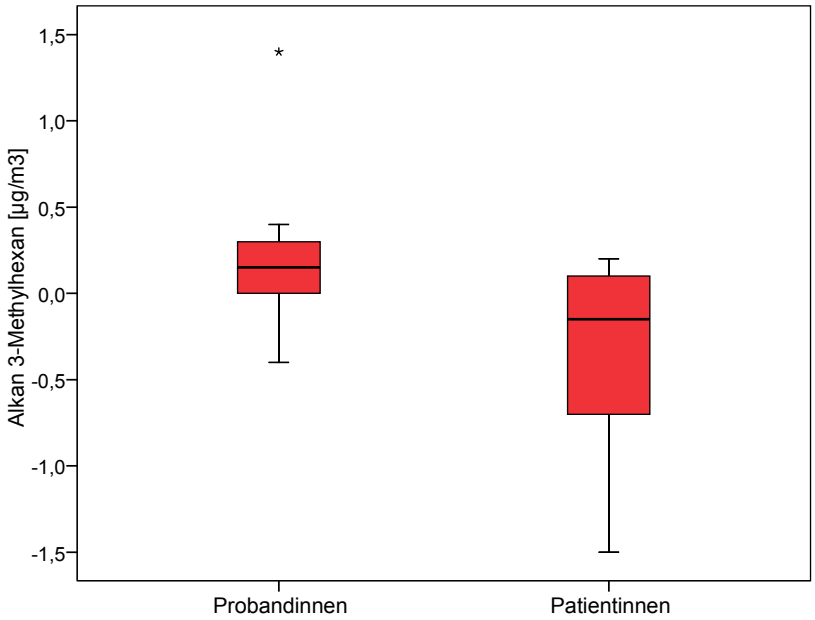


Abbildung 13: Box-Whisker-Plot für die Konzentrationen von 3-Methylhexan bei den Patientinnen und den gesunden Probandinnen

Mittels ROC-Analyse wurde ermittelt, in welchem Bereich sich ein Cut-Off-Wert befinden könnte. Dabei wurde zu jedem Trennwert die entsprechende Sensitivität und Spezifität ermittelt. Der optimale Cut-Off-Wert per definitionem ist der Wert, mit der größtmöglichen Sensitivität und einer gleichzeitig möglichst geringen Falsch-Positiv-Rate als beste Trennung zwischen Gesunden und Kranken.

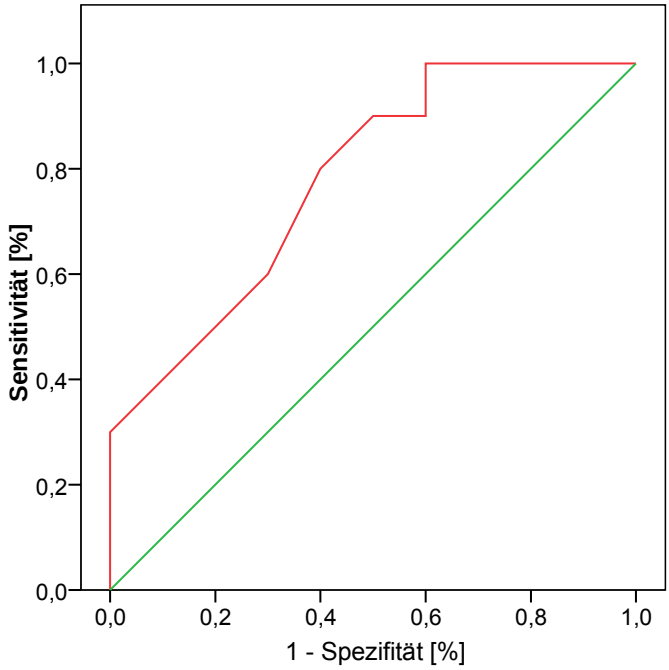


Abbildung 14: ROC-Kurve für die Konzentrationswerte von 3-Methylhexan in der Atemluft von Patientinnen mit Mammakarzinom.

Tabelle 33: ROC-Analyse für 3-Methylhexan

3-Methylhexan Positiv, wenn größer oder gleich [µg/m³]	**Sensitivität [%]**	1 – Spezifität [%]	**Spezifität [%]**	Sensitivität + Spezifität [%]
-2,5	1	1	0	1
-1,15	1	0,9	0,1	1,1
-0,75	1	0,8	0,2	1,2
-0,55	1	0,6	0,4	1,4
-0,3	0,9	0,6	0,4	1,3
-0,15	0,9	0,5	0,5	1,4
-0,05	0,8	0,4	0,6	1,4
0,05	0,6	0,3	0,7	1,3
0,15	0,5	0,2	0,8	1,3
0,25	0,3	0	1	1,3
0,35	0,2	0	1	1,2
0,9	0,1	0	1	1,1
2,4	0	0	1	1

Der kleinste Trennwert ist der kleinste gemessene Wert minus 1, der größte Trennwert ist der größte gemessene Wert plus 1. Alle anderen Trennwerte sind Mittelwerte von zwei aufeinander folgenden, geordneten beobachteten Testwerten.

Bei einem Cut-Off von -0,55 [µg/m³] wird eine Sensitivität von 100% erreicht, die Spezifität liegt bei diesem Trennwert bei 40%. Wird der Cut-Off-Wert bei -0,05 [µg/m³] festgelegt, so erreicht man eine Sensitivität von 80% und eine Spezifität von 60%.

3.2.2.2 Alken Decen

In der Gruppe der Alkene hat sich ein signifikanter Konzentrationsunterschied für Decen ermitteln lassen.

Tabelle 34: Deskriptive Statistik für Decen

Decen	n	Mittelwert [µg/m³]	Standard-abweichung [µg/m³]	Min [µg/m³]	Max [µg/m³]	Perzentile [µg/m³]		
						25.	50. (Median)	75.
Probandinnen	10	0,145	0,1707	-0,1	0,4	0,000	0,100	0,300
Patientinnen	10	-0,065	0,2473	-0,4	0,3	-0,325	0,000	0,125

(keine signifikante Abweichung von einer Normalverteilung, Kolmogorov-Smirnov-Test)
Die Angabe der Ergebnisse erfolgt in Mikrogramm Substanz pro Kubikmeter Luft [µg/m³].

Mittels T-Test für unabhängige Stichproben konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Kranken und Gesunden nachgewiesen werden (p=0,040). Das folgende Boxplotdiagramm zeigt den Unterschied:

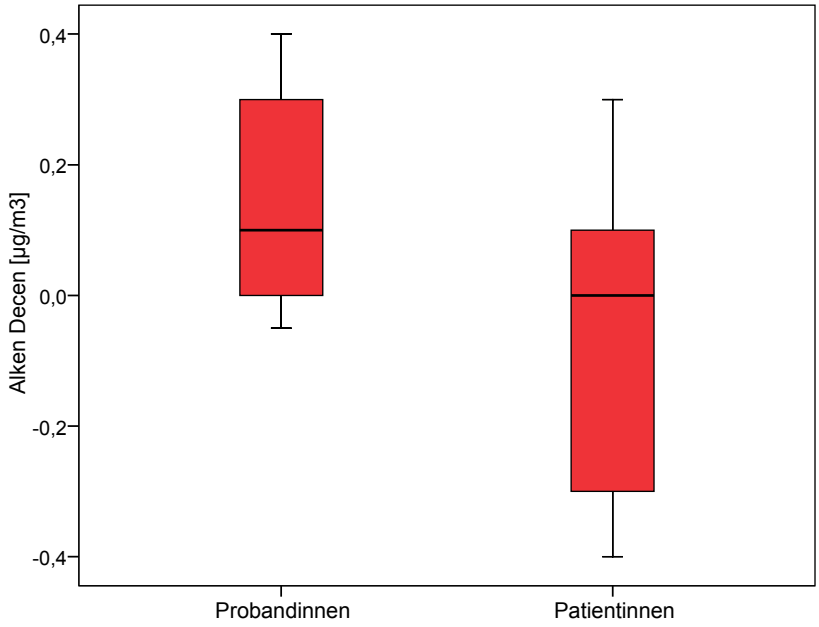


Abbildung 15: Box-Whisker-Plot für die Konzentrationen von Decen bei den Patientinnen und den gesunden Probandinnen

Mittels ROC-Analyse wurde ermittelt, in welchem Bereich sich ein Cut-Off-Wert befinden könnte.

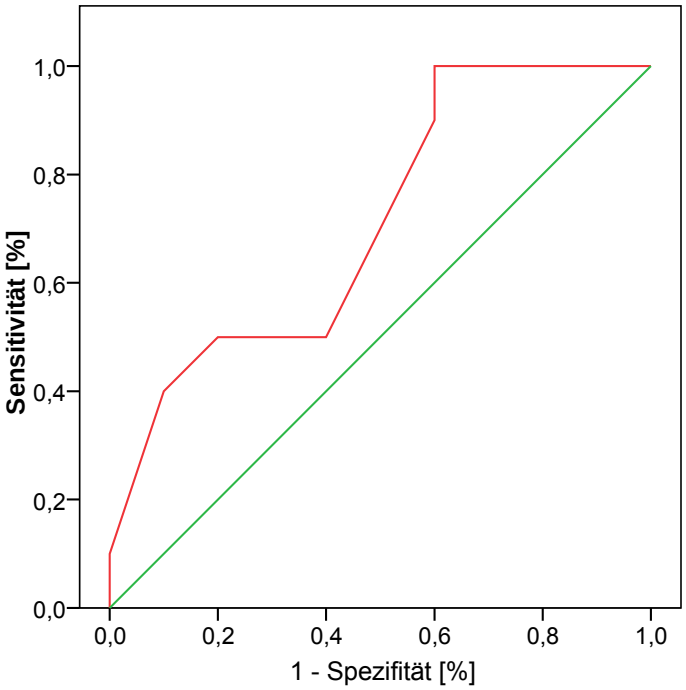


Abbildung 16: ROC-Kurve für die Konzentrationswerte von Decen in der Atemluft von Patientinnen mit Mammakarzinom

Tabelle 35: Deskriptive Statistik für Decen

Alken Decen Positiv, wenn größer oder gleich [µg/m³]	**Sensitivität [%]**	1 – Spezifität [%]	**Spezifität [%]**	Sensitivität + Spezifität [%]
-1,4	1	1	0	1
-0,35	1	0,8	0,2	1,2
-0,25	1	0,7	0,3	1,3
-0,125	1	0,6	0,4	1,4
-0,025	0,9	0,6	0,4	1,3
0,025	0,5	0,4	0,6	1,1
0,075	0,5	0,3	0,7	1,2
0,15	0,5	0,2	0,8	1,3
0,25	0,4	0,1	0,9	1,3
0,35	0,1	0	1	1,1
1,4	0	0	1	1

Der kleinste Trennwert ist der kleinste gemessene Wert minus 1, der größte Trennwert ist der größte gemessene Wert plus 1. Alle anderen Trennwerte sind Mittelwerte von zwei aufeinander folgenden, geordneten beobachteten Testwerten.

Bei einem Cut-Off von -0,125 [µg/m³] wird eine Sensitivität von 100% erreicht, die Spezifität liegt bei diesem Trennwert bei 40%. Wird der Cut-Off-Wert bei 0,15 [µg/m³] festgelegt, so erreicht man eine Sensitivität von 50% und eine Spezifität von 80%.

3.2.2.3 Terpen Caryophyllen

In der Gruppe der Terpene hat sich ein signifikanter Konzentrationsunterschied für Caryophyllen ermitteln lassen.

Tabelle 36: Deskriptive Statistik für Caryophyllen

Caryophyllen	n	Mittelwert [µg/m³]	Standard-abweichung [µg/m³]	Min [µg/m³]	Max [µg/m³]	Perzentile [µg/m³]		
						25.	50. (Medi-an)	75.
Probandinnen	10	0,070	0,483	0,0	0,1	0,000	0,100	0,100
Patientinnen	10	-1,230	-1,230	-6,1	0,2	-1,650	-0,100	0,025

(keine signifikante Abweichung von einer Normalverteilung, Kolmogorov-Smirnov-Test)
Die Angabe der Ergebnisse erfolgt in Mikrogramm Substanz pro Kubikmeter Luft [µg/m³].

Mittels Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Kranken und Gesunden nachgewiesen werden (p=0,016). Der Unterschied wird in folgendem Boxplotdiagramm veranschaulicht:
Um die Mittelwertunterschiede zwischen beiden Gruppen deutlicher werden zu lassen, ist in der folgenden Graphik eine feinere y-Achseneinteilung gewählt. Zu dem sind die Extremwerte ausgeblendet.

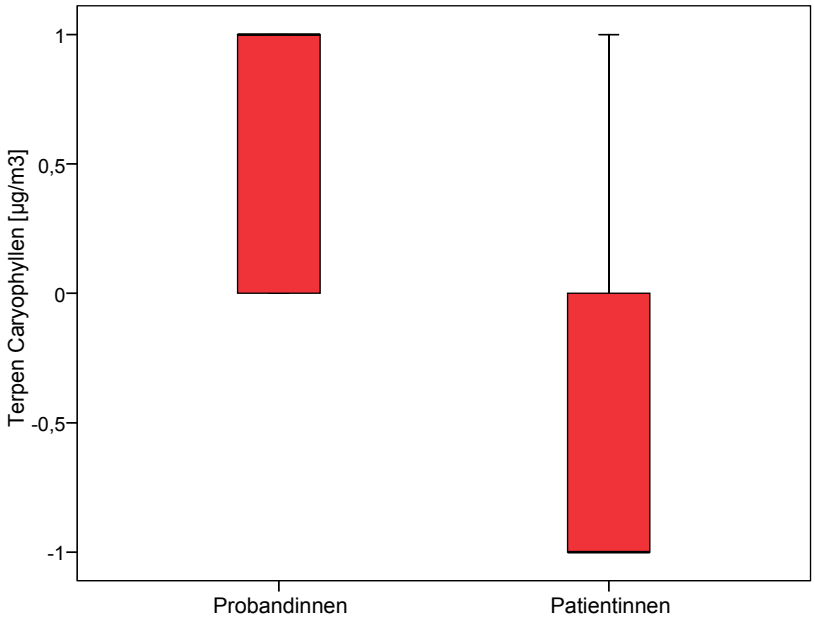


Abbildung 17: Box-Whisker-Plot Konzentrationen von Caryophyllen bei den Patientinnen und den gesunden Probandinnen

Mittels ROC-Analyse wurde ermittelt, in welchem Bereich sich ein Cut-Off-Wert befinden könnte.

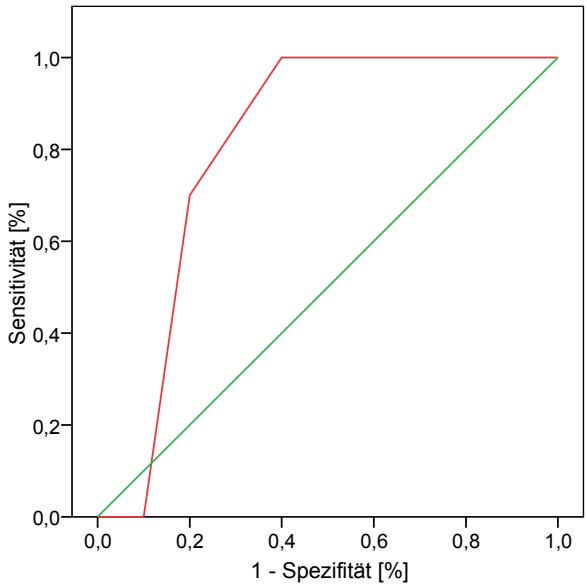


Abbildung 18: ROC-Kurve für die Konzentrationswerte von Caryophyllen in der Atemluft von Patientinnen mit Mammakarzinom.

Tabelle 37: ROC-Analyse für Caryophyllen

Terpen Caryophyllen Positiv, wenn größer oder gleich [µg/m³]	**Sensitivität [%]**	1 – Spezifität [%]	**Spezifität [%]**	Sensitivität + Spezifität [%]
-7,1	-7,1	1	0	-7,1
-6,05	1	0,9	0,1	1,1
-3,1	1	0,8	0,2	1,2
-0,15	1	0,7	0,3	1,3
-0,05	1	0,4	0,6	1,6
0,05	0,7	0,2	0,8	1,5
0,15	0	0,1	0,9	0,9
1,2	0	0	1	1

Der kleinste Trennwert ist der kleinste gemessene Wert minus 1, der größte Trennwert ist der größte gemessene Wert plus 1. Alle anderen Trennwerte sind Mittelwerte von zwei aufeinander folgenden, geordneten beobachteten Testwerten.

Bei einem Cut-Off von -0,05 [µg/m³] wird eine Sensitivität von 100% erreicht, die Spezifität liegt bei diesem Trennwert bei 60%. Wird der Cut-Off-Wert bei 0,05 [µg/m³] festgelegt, so erreicht man eine Sensitivität von 70% und eine Spezifität von 80%.

3.2.2.4 Aromat Naphthalin

In der Gruppe der Aromaten hat sich ein signifikanter Konzentrationsunterschied für Naphthalin ermitteln lassen.

Tabelle 38: Deskriptive Statistik für Naphthalin

Naphthalin	n	Mittelwert [µg/m³]	Standard-abweichung [µg/m³]	Min [µg/m³]	Max [µg/m³]	Perzentile [µg/m³]		
						25.	50. (Medi-an)	75.
Probandinnen	10	0,170	0,1059	0,0	0,3	0,100	0,150	0,300
Patientinnen	10	-0,025	0,3156	-0,9	0,4	0,000	0,000	0,000

(keine signifikante Abweichung von einer Normalverteilung, Kolmogorov-Smirnov-Test)
Die Angabe der Ergebnisse erfolgt in Mikrogramm Substanz pro Kubikmeter Luft [µg/m³].

Mittels Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Kranken und Gesunden nachgewiesen werden (p=0,015). Der Unterschied wird in folgendem Boxplotdiagramm veranschaulicht:

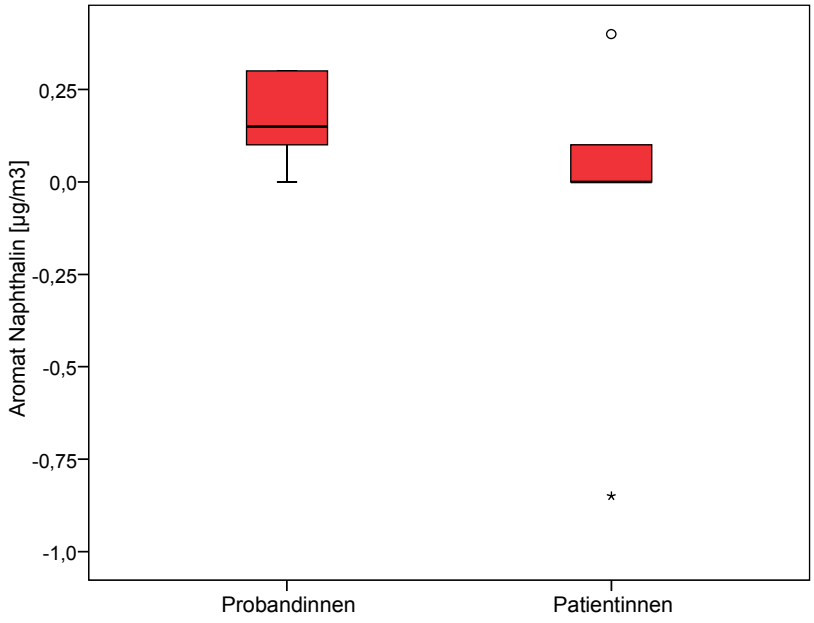


Abbildung 19: Box-Whisker-Plot für die Konzentrationen von Naphthalin bei den Patientinnen und den gesunden Probandinnen

Mittels ROC-Analyse wurde ermittelt, in welchem Bereich sich ein Cut-Off-Wert befinden könnte.

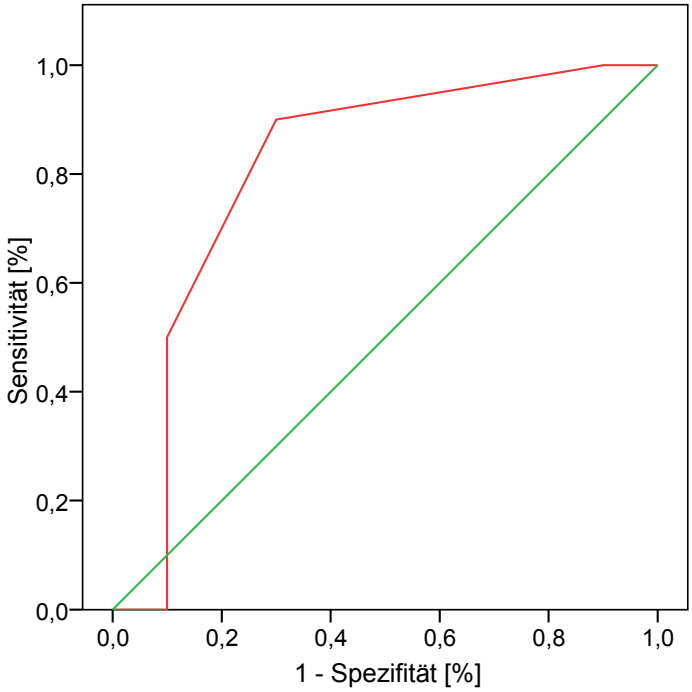


Abbildung 20: ROC-Kurve für die Konzentrationswerte von Naphthalin in der Atemluft von Patientinnen mit Mammakarzinom

Tabelle 39: ROC-Analyse für Naphthalin

Naphthalin Positiv, wenn größer oder gleich [µg/m³]	**Sensitivität [%]**	1 – Spezifität [%]	**Spezifität [%]**	Sensitivität + Spezifität [%]
-1,85	1,0	1,0	0,0	1,0
-0,425	1,0	0,9	0,1	1,1
0,05	0,9	0,3	0,7	1,6
0,15	0,5	0,1	0,9	1,4
0,25	0,3	0,1	0,9	1,2
0,35	0,0	0,1	0,9	0,9
1,4	0,0	0,0	1,0	1,0

Der kleinste Trennwert ist der kleinste gemessene Wert minus 1, der größte Trennwert ist der größte gemessene Wert plus 1. Alle anderen Trennwerte sind Mittelwerte von zwei aufeinander folgenden, geordneten beobachteten Testwerten.

Bei einem Cut-Off von 0,05 [µg/m³] wird eine Sensitivität von 90% erreicht, die Spezifität liegt bei diesem Trennwert bei 70%. Wird der Cut-Off-Wert bei 0,15 [µg/m³] festgelegt, so erreicht man nur noch eine Sensitivität von 50%, aber eine Spezifität von 90%.

3.2.2.5 Halogenkohlenwasserstoff Trichlorethylen

In der Gruppe der Halogenkohlenwasserstoffe hat sich ein signifikanter Konzentrationsunterschied für Trichlorethylen ermitteln lassen.

Tabelle 40: Deskriptive Statistik für Trichlorethylen

Trichlorethylen	n	Mittelwert [µg/m³]	Standard-abweichung [µg/m³]	Min [µg/m³]	Max [µg/m³]	Perzentile [µg/m³]		
						25.	50. (Medi-an)	75.
Probandinnen	10	0,050	0,1179	-0,1	0,3	0,000	0,000	0,125
Patientinnen	10	0,870	1,1096	-0,1	2,9	0,050	0,600	1,375

(keine signifikante Abweichung von einer Normalverteilung, Kolmogorov-Smirnov-Test)
Die Angabe der Ergebnisse erfolgt in Mikrogramm Substanz pro Kubikmeter Luft [µg/m³].

Mittels T-Test für unabhängige Stichproben konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Kranken und Gesunden nachgewiesen werden (p=0,045). Der Unterschied wird in folgendem Boxplotdiagramm veranschaulicht:

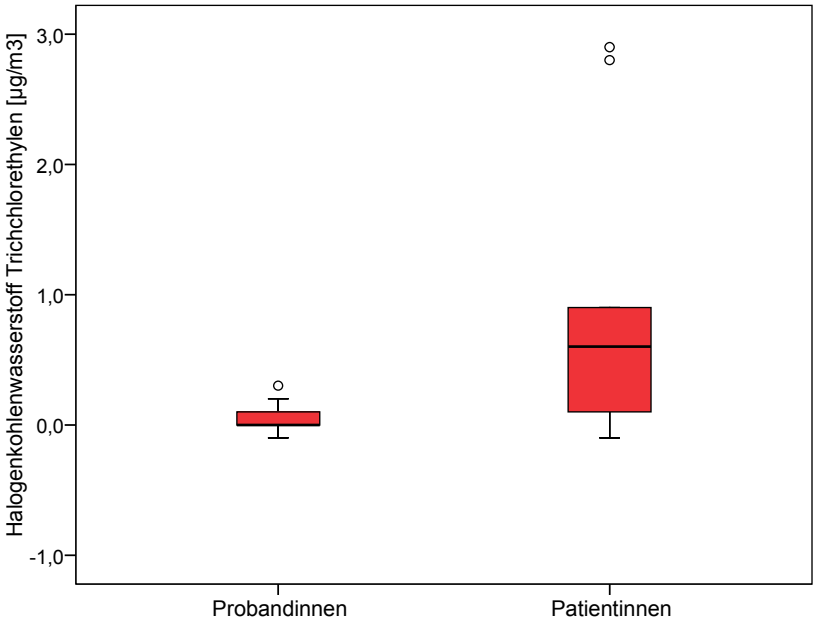


Abbildung 21: Box-Whisker-Plot für die Konzentrationen von Trichlorethylen bei den Patientinnen und den gesunden Probandinnen

Mittels ROC-Analyse wurde ermittelt, in welchem Bereich sich ein Cut-Off-Wert befinden könnte.

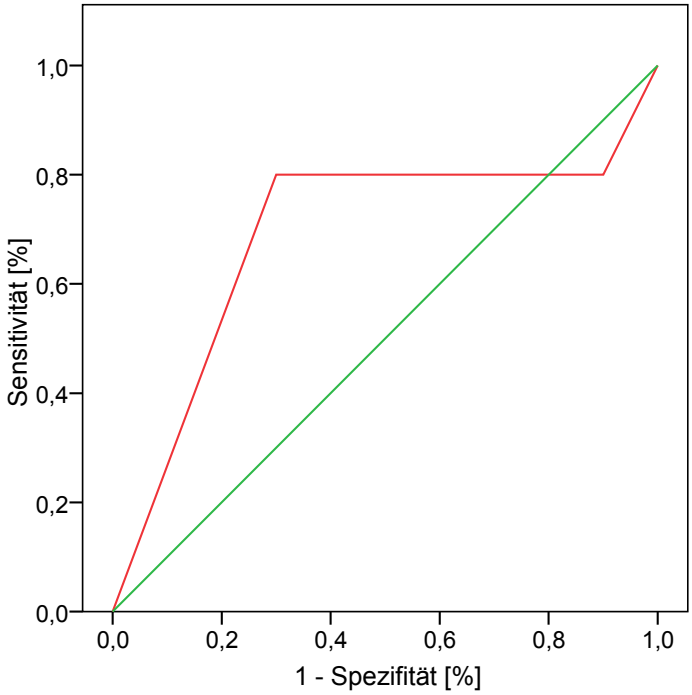


Abbildung 22: ROC-Kurve für die Konzentrationswerte von Trichlorethylen in der Atemluft von Patientinnen mit Mammakarzinom

Tabelle 41: ROC-Analyse für Trichlorethylen

Trichlorethylen Positiv, wenn größer oder gleich [µg/m³]	**Sensitivität [%]**	1 – Spezifität [%]	**Spezifität [%]**	Sensitivität + Spezifität [%]
-1,1	1,0	1,0	0,0	1,0
-0,05	0,8	0,9	0,1	0,9
0,05	0,8	0,3	0,7	1,5
0,15	0,6	0,2	0,8	1,4
0,25	0,6	0,1	0,9	1,5
0,4	0,6	0,0	1,0	1,6
0,6	0,5	0,0	1,0	1,5
0,8	0,4	0,0	1,0	1,4
1,85	0,2	0,0	1,0	1,2
2,85	0,1	0,0	1,0	1,1
3,9	0,0	0,0	1,0	1,0

Der kleinste Trennwert ist der kleinste gemessene Wert minus 1, der größte Trennwert ist der größte gemessene Wert plus 1. Alle anderen Trennwerte sind Mittelwerte von zwei aufeinander folgenden, geordneten beobachteten Testwerten.

Bei einem Cut-Off von 0,05 [µg/m³] wird eine Sensitivität von 80% erreicht, die Spezifität liegt bei diesem Trennwert bei 70%. Wird der Cut-Off-Wert bei 0,4 [µg/m³] festgelegt, so erreicht man nur noch eine Sensitivität von 60%, es wird allerdings eine Spezifität von 100% erreicht.

4 Diskussion

Die Analyse von Volatile organic compounds als nicht-invasive Marker von entzündlichen und oxidativen Prozessen werden in der klinischen Diagnostik von internistischen Erkrankungen (Kharitonov, Barnes 2006; Paoletti 1995) als neue Methode eingesetzt. Die hohe Treffsicherheit trainierter Hunde insbesondere Lungen- und Mammakarzinome in der Ausatemluft erschnüffeln zu können, gab Anlass zu der These, das Karzinomzellen einen anderen Geruch und damit ein anderes VOC-Spektrum absondern als gesunde Zellen (McCulloch et al. 2006). Methodische Standards zu diesen Forschungsergebnissen sind bisher nur begrenzt vorhanden (Lewis 2004). Im Gegensatz zur Analyse von Blut, Urin und anderen Körperflüssigkeiten ist die Untersuchung der Exhalationsluft trotz vorhandenen diagnostischen Potentials noch nicht in den klinischen Alltag eingegangen. Die Schwierigkeiten der Etablierung einer reproduzierbaren standardisierten Atembeprobung mag eine Hürde der Atemdiagnose sein.

Das Ziel unserer Studie war es, eine spurenanalytische Bestimmung von VOCs im Atem von Mammakarzinompatientinnen aufzuzeigen und Fragen zum Nutzen und der Einsetzbarkeit von Atemmarkern in der klinischen Routine zu beantworten. Hierfür wurde eine geeignete Methodik vorgeschlagen, die zum Nachweis von niedrigen organischen Emissionen dient und dabei Produktivitäts- und Qualitätsparameter einhält. Die Erforschung der Biomarker in der Atemluft soll dazu beitragen, die frühzeitige Diagnostik des Mammakarzinoms zu verbessern.

4.1 Diskussion der Ergebnisse

Als Nullhypothese wurde formuliert, dass sich das VOC-Spektrum im Atem von Patientinnen mit Mammakarzinom nicht signifikant unterscheidet von dem im Atem gesunder Probandinnen. Als Alternativhypothese wurde formuliert, dass sich das VOC-Spektrum bezüglich der beiden Kontrollgruppen signifikant unterscheidet. Als Signifikanzniveau galt $\alpha < 0{,}05$. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen eine Bestätigung der Forschungshypothese (=Alternativhypothese) zu. Das VOC-Spektrum im Atem differiert bei gesunden und erkrankten Probandinnen.

4.1.1 Organisch flüchtige Substanzen als Marker maligner Prozesse

Zurzeit ist noch sehr wenig über die genaue Funktion und Herkunft der prognostischen VOC-Determinanten bekannt. Mehrere Studien, die zum Thema Atemanalyse bei Karzinomen Untersuchungen präsentieren, stammen von Phillips et al. und seinen Mitarbeitern aus einem einzigen kommerziellen Labor.

Hinsichtlich der Etablierung von Atemanalysen erforschten M. Phillips et al. (1999) die Bandbreite an VOCs im Atem von 50 gesunden Menschen mit Hilfe der Gaschromatographie und der Massenspektroskopie. Eine Atemprobe enthielt durchschnittlich 204,2 VOCs (SD=19,8; Spannweite 157-241). Der alveolare Anteil von jedem VOC (Menge des Atems minus Menge der Luft) variierte mit dem Grad der Zusammensetzung minus dem Grad der Entnahme. Insgesamt wurden 3481 verschiedene VOCs identifiziert: 1753 mit einem positiven Alveolar-Gradienten, 1728 mit einem negativen Alveolar-Gradienten. 27 VOCs wurden bei allen Probandinnen als gemein identifiziert. Diese Studie bestätigte vorausgegangene Berichte über die weite Bandbreite an VOCs im Atem von Individuen. Zudem konnten zwei neue Entdeckungen festgehalten werden: (1) Die Anzahl der VOCs im Atem eines Individuums variiert vergleichsweise wenig. (2) Es gibt einen Kernbestand an bestimmten VOCs im Atem, die bei allen Probandinnen gefunden werden konnten.

Wie sich dieser Kernbestand bei pathologischen Gewebeänderungen verhält, ist in den Folgestudien von Phillips und seinen Mitarbeitern beschrieben worden. Insbesondere wurden maligne Erkrankungen der Lunge untersucht. In einer frühen Querschnittsstudie (M. Phillips et al. 1999) wurden 108 Patienten untersucht, von denen 60 Patienten Lungenkrebs hatten. Es wurde eine spezifische VOC-Kombination (überwiegend Alkane, Alkanderivate und Benzenderivate) im Atem der Lungenkrebspatienten identifiziert, mittels derer die Diagnose in 81,5% der Fälle richtig gestellt werden konnte.

In einer späteren Fall-Kontroll- und Querschnittsstudie untersuchten M. Phillips et al. (2003) erneut Lungenkrebspatienten und gesunde Probandinnen. In den laborchemischen Atemanalysen mittels GC/MS identifizierten sie 80 verschiedene C4 bis C20 Alkane und einfach methylierte Alkane, wovon neun VOCs in Kombination als signifikante Marker für den Lungenkrebs erklärt wurden. Diese waren:

Tabelle 42: Übersicht der VOC-Kombination zur Erkennung eines Lungenkarzinoms (M. Phillips et al. 2003)

Butan (der beste Marker einzeln)	3-Methyl-Hexan
3-Methyl-Tridekan	Heptan
7-Methyl-Tridekan	2-Methyl-Hexan
4-Methyl-Oktan	5-Methyl-Dekan
Pentan	

Mit Hilfe dieser Kombination betrug die Sensitivität 89,6% (60 von 67 wurden als krebskrank erkannt) und die Spezifität 82,9% (34 der 41 gesunden Probandinnen). Demgegenüber untersuchten Diana Poli und ihre Kollegen (2005) Patienten mit einem nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom (NSCLC) und verglichen ihre VOCs mit denen, die aus dem Atem von gesunden Rauchern und Nichtrauchern und von Patienten mit chronisch obstruktiven Lungenerkrankungen (COPD) gewonnen wurden. In dieser Studie konnte nicht festgestellt werden, dass eine bestimmte Substanz für eine Gruppe spezifisch war. Analog zu den Studien von Phillips gaben die ermittelten VOCs nur in Kombination Hinweise auf die Erkrankung. Es wurden folgende VOCs identifiziert:

Tabelle 43: VOCs in der Atemluft der Probandinnen (Diana et al. 2005)

Isopren	Benzen *~
2-Methylpentan *°~	Heptan °~
Pentan *°~	Dekan *°
Ethylbenzen *°~	Styrol °
Xylol *°~	Oktan *°
Trimethylbenzen *°~	Pentamethylheptan *~
Toluol *~	

Die Konzentrationen von 10 (mit * gekennzeichnet) dieser 13 Substanzen waren signifikant höher bei Lungenkrebspatienten als bei der Kontrollgruppe „Nichtraucher“, die Konzentrationen von 9 waren bei COPD Patienten (mit ° gekennzeichnet) und bei Rauchern (mit ~ gekennzeichnet) größer als bei Nichtrauchern. Die NSCLC Patienten hatten bedeutsam höhere 2-Methyl-Pentan- und Isopren-Werte und bedeutsam niedrigere Ethylbenzen- und Styrol-Werte als die COPD-Patienten und erheblich niedrige Benzen,

Heptan und Toluol Spiegel als die Raucher. In der Atemluft der Nichtraucher waren die Konzentrationen von Isopren und Heptan größer als in der Umgebungsluft, wohingegen bei NSCLC, COPD Patienten und Rauchern fast alle Substanzen in größeren Mengen vorhanden waren als in der umgebenden Luft. In einer Folgestudie, in der die NSCLC Patienten nach einer Operation wieder untersucht wurden, konnte man feststellen, dass nur die Konzentrationen von Isopren und Dekan erheblich abnahmen. Ingesamt gesehen betrug die Gesamtsensitivität, bezogen auf die NSCLC Patienten, 72,2% und die Gesamtspezifität 93,6%.

Die Atemanalyse, als nicht-invasive Diagnostikmethode, wurde von Phillips und seinen Mitarbeitern auch bei Patienten mit Mammakarzinom angewandt (Phillips et al. 2003). An den Tests beteiligten sich 101 Frauen mit einem anomalem Mammogramm (51 mit und 50 ohne Nachweis von Krebszellen in der Brustbiopsie) sowie weitere 42 altersgleiche Frauen ohne Mammakarzinomverdacht. Die Atemproben wurden in einem Sammelapparat aufgefangen und mittels thermaler Desorption, Gaschromatographie und Massenspektroskopie analysiert. Das Ergebnis des Atemtests: Die Atemanalyse konnte Frauen mit Brustkrebs von den gesunden Probandinnen mit einer Sensitivität von 94,1% und einer Spezifität von 73,8% unterscheiden. Falls die Frauen ein abweichendes Mammogramm hatten, aber durch die Biopsienentnahme nicht diagnostiziert werden konnten, sprach der Test mit einer Sensitivität von 62,7% und einer Spezifität von 84% an. Als Biomarker identifizierten die Forscher verschiedene C4-C20 (methylierte) Alkane, aus denen acht VOCs als beste Marker zur Diagnose des Brustkrebses erklärt wurden. Zu ihnen gehören:

Tabelle 44: Übersicht der VOC-Kombination zur Erkennung eines Mammakarzinoms (Philipps et al., 2003)

Nonan	2-Methylpropan
5-Methyltridekan	3-Methylnonadekan
3-Methylundekan	4-Methyldodekan
6-Methylpentadekan	2-Methyloktan

In der Brustkrebsstudie von M. Phillips et al. (2003) konnte damit gezeigt werden, dass mit Hilfe von acht Markern nicht nur zwischen Frauen mit Mammakarzinom und gesunden Probandinnen unterschieden werden kann, sondern hypothetisch auch Frauen mit

Mammakarzinom von Frauen, die eine abweichende Mammographie hatten, abgrenzt werden können. Bei Frauen, deren Biopsie ein negatives Ergebnis bezüglich des Vorhandenseins eines Krebses lieferte, wurden trotzdem andere Werte im Vergleich zu den gesunden Probandinnen registriert. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass entweder der Krebs im frühesten Stadium ist bzw. durch die Biopsie nicht aufgedeckt wurde oder andere pathogene Vorgänge oxidativen Stress und somit eine abweichende Mammographie hervorrufen. Oxidativer Stress könnte z.B. auch durch Infektionen oder Entzündungen, die gleichzeitig im anderen Gewebe vorkommen, verursacht werden. Die Ergebnisse wären folglich verzerrt. Um möglichst genaue Ergebnisse zu erhalten, wurden in dieser Studie andere pathogene Mechanismen (z.B. Myokardinfarkt, Kardiomyopathie, Herzinsuffizienz NYHA III/IV, schwere COPD, Niereninsuffizienz, Diabetes mellitus) vor Beginn der Studie ausgeschlossen.

Bisher liegen keine einheitlich reproduzierbaren Ergebnisse in der Literatur vor, was in unserer Studie erneut bestätigt werden konnte. Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl in den Atemproben gesunder als auch an Krebs erkrankter Probandinnen viele verschiedene VOCs identifiziert wurden. Es wurden auch VOCs beobachtet, die in der gesunden und in der kranken Gruppe vorkamen, jedoch bestanden hier mengenmäßige Unterschiede. Dies könnte an den unterschiedlichen Sammel- und Konzentrationsmethoden der Atemproben, aber auch an dem zu Grunde liegenden Patientenkollektiv der jeweiligen Studie liegen. Hinsichtlich Anzahl und Auswahl der Studienteilnehmer lassen sich entscheidende Differenzen feststellen. Dieser Umstand könnte die Vergleichbarkeit der Studien limitieren.
In keiner der aufgeführten Studien gelang es, reproduzierbare spezifische Marker und so genannte Cut-Off Werte für Markersubstanzen für den Lungen- bzw. Brustkrebs zu identifizieren. Jedoch wurden in der Literatur verschiedene VOC-Muster angegeben, die auf den Krebs hinweisen: Beim Brustkrebs wurden acht VOCs in Kombination als aussagefähig erklärt, beim Lungenkrebs je nach Studie neun, dreizehn bzw. 22. Die vorliegende Studie hat demgegenüber wesentlich neue Erkenntnisse über spezifische Markersubstanzen für das Mammakarzinom und deren Cut-Off-Werte gebracht, die im Screeningtest eine Identifikation von Erkrankten und Gesunden erlauben. Als Biomarker wurden 5 VOCs in Kombination für das Mammakarzinom identifiziert:

Tabelle 45: Übersicht der VOC-Kombination zur Erkennung eines Mammakarzinoms

Caryophyllen	Naphthalin
3-Methylhexan	Trichlorethylen
Decen	

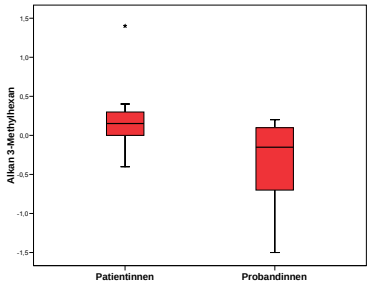
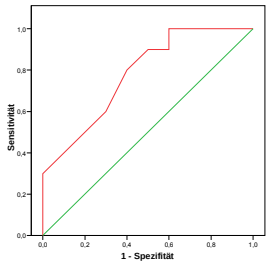
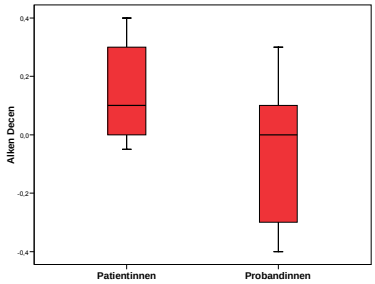
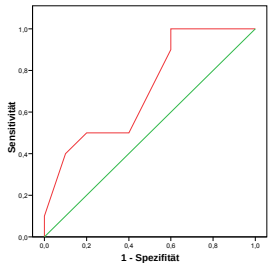
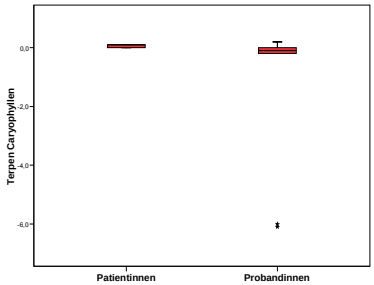
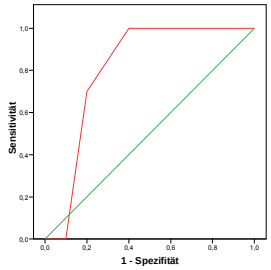
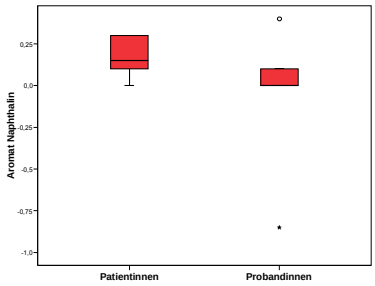
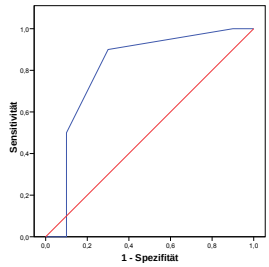
In der Ausatemluft der Gesunden lagen höhere Konzentrationsmittelwerte vor für 3-Metylhexan (0,210 µg/m^3/ -0,350 µg/m^3), Decen (0,145 µg/m^3/ -0,065 µg/m^3), Caryophyllen (0,070 µg/m^3/ -1,230 µg/m^3) und Naphthalin (0,170 µg/m^3/ -0,025 µg/m^3) gegenüber der Ausatemluft von Erkrankten. Der Konzentrationsmittelwert für Trichlorethylen war hingegen höher im Atem der Erkrankten (0,870 µg/m^3) als im Atem der Gesunden (0,050 µg/m^3). Von den genannten VOCs weisen vier Verbindungen (3-Metylhexan, Decen, Caryophyllen und Naphthalin) einen negativen Alveolargradienten im Atem der Erkrankten auf. Diese Beobachtung stützt die dieser Studie zugrunde liegenden These, dass karzinoide Stoffwechselprodukte durch die gesteigerte Aktivität der Cytochrom-P450-Enzyme der Lunge metabolisiert werden (Phillips et al. 2003). Voraussetzung hierfür ist oxidativer Zellschaden, dem zur Folge in der Lunge Cytochrom-P450-Enzyme induziert werden. Für diese Substanzen gilt, dass die Induktion der Cyt-P450-Enzyme in der Lunge mit dem Ausmaß an oxidativen Zellschaden einhergeht. Ihre Konzentration korreliert entsprechend mit dem Ausmaß maligner Zellprozesse. Für die organisch flüchtige Verbindung Trichlorethylen scheint ein anderer Mechanismus zu greifen. Hier steht nicht die Metabolisierung durch die Cyt-P450-Enzyme im Vordergrund, sondern die direkte Eliminierung über die Lunge. Auch für diese Substanz gilt, dass ihre Konzentration in engem Zusammenhang mit oxidativem Stress steht. Sauerstoffradikale, die in den Mitochondrien der Tumorzellen produziert werden und in das Cytoplasma entweichen, oxidieren DNA und wichtige Proteine, aber auch ungesättigte Fettsäuren in Membranen, die in Alkane und methylierte Alkane umgebaut werden (Esterbauer et al. 1991, Marnett 2000, Phillips et al. 2000). Einige dieser oxidierten Verbindungen werden ohne Metabolisierung direkt über die Lunge eliminiert. Erkrankte weisen demnach höhere Konzentrationen von bestimmten nicht metabolisierten flüchtigen organischen Verbindungen im Atem auf als Gesunde. Die Substanz Trichlorethylen, für die in unseren Untersuchungen ein positiver Alveolargradient ermittelt wurde, zählt zu diesen.

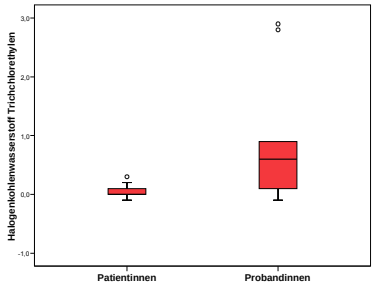
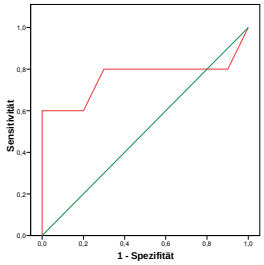
Um Patientinnen mit Mammakarzinom von gesunden Probandinnen unterscheiden zu können, wurden in unserer Studie so genannte Cut-Off-Werte für die jeweiligen Verbindungen ermittelt. Dabei war es Ziel, einen optimalen Cut-Off-Wert zu finden, mit dem

sowohl eine möglichst hohe Sensitivität als auch eine hohe Spezifität im Screening erreicht werden kann. Für die fünf VOC-Markersubstanzen unserer Studie sind jeweils zwei Cut-Off-Werte angegeben. Einer dieser zwei Trennwerte kennzeichnet eine hohe Sensitivität gegenüber einer niedrigeren Spezifität, der andere hingegen ein ausgewogeneres Verhältnis zwischen Sensitivität und Spezifität, wobei hier die Sensitivität geringer und die Spezifität höher ist als beim ersten Cut-Off Wert. Für 3-Methylhexan wurde ein Cut-Off von -0,55 [µg/m³] mit einer Sensitivität von 100% und einer relativ geringen Spezifität von 40% ermittelt. Der höhere Cut-Off-Wert liegt bei -0,05 [µg/m³] mit einer entsprechenden Sensitivität von 80% und eine Spezifität von 60%. Für die Verbindung Decen wurde ein Cut-Off von -0,125 [µg/m³] mit einer entsprechend hohen Sensitivität von 100% und einer geringen Spezifität von 40% ermittelt. Wird der Cut-Off-Wert hingegen bei -0,15 [µg/m³] festgelegt, so erreicht man eine Sensitivität von 90%, sowie eine Spezifität von 50%. Für das Terpen Caryophyllen wurde ein Cut-Off von -0,05 [µg/m³] ermittelt, der mit einer optimalen Sensitivität von 100% und einer Spezifität von 60% einhergeht. Wird der Cut-Off-Wert bei 0,05 [µg/m³] festgelegt, so erreicht man eine niedrigere Sensitivität von 70% aber eine höhere Spezifität von 80%. Für den Aromaten Naphthalin wurde in dieser Studie ein Cut-Off von 0,05 [µg/m³] ermittelt, mit einer entsprechend hohen Sensitivität von 90% und einer akzeptablen Spezifität von 70%. Wird der Cut-Off-Wert allerdings bei 0,15 [µg/m³] festgelegt, so erreicht man nur noch eine Sensitivität von 50%, aber eine Spezifität von 90%. Und auch beim Halogenkohlenwasserstoff Trichlorethylen wurde ein Cut-Off von 0,05 [µg/m³] ermittelt, der mit einer niedrigeren Sensitivität von 80% und einer Spezifität von 70% einhergeht. Wird der Cut-Off-Wert bei 0,4 [µg/m³] festgelegt, so erreicht man nur noch eine Sensitivität von 60%, es wird allerdings eine optimale Spezifität von 100% erreicht. Deutlich wird, dass Sensitivität und Spezifität invers miteinander verknüpft sind: Je höher die Sensitivität, desto geringer ist die Spezifität und vice versa. Zu diskutieren ist deshalb, welcher Verlust an Sensitivität oder Spezifität verantwortlich im Interesse der Patienten zu vertreten ist. Vorstellbar ist, bei der Verwendung des Atemscreeningtests die Sensitivität und Spezifität bewusst zu variieren. Beispielsweise lässt sich der Test so einstellen, dass er eine nahezu 100% Sensitivität aufweist, da man alle tatsächlich Erkrankten entdecken will. In diesem Fall könnte der Verlust an Spezifität dadurch ausgeglichen werden, dass alle Personen, die positiv reagieren, mit der aufwendigeren Mammographie mit sehr hoher Spezifität und Sensitivität nachgetestet werden. In Tabelle 45 sind die entsprechenden Cut-Off-Werte, die mit einer sehr hohen Sensitivität, aber nur mäßig hohen Spezifität

einhergehen, dargestellt. Die Atemanalyse könnte im klinischen Alltag als Initial-Screening mit einer nahezu 100% Sensitivität den bildgebenden Screeningverfahren vorgeschaltet werden.

Tabelle 46: VOC-Markersubstanzen und Cut-Off-Werte für das Mammakarzinom

VOC	Cut-Off-Wert	Sensitivität	Spezifität
 3-Methylhexan	 -0,55 µg/m^3	100%	40%
 Decen	 -0,125 µg/m^3	100%	40%
 Caryophyllen	 -0,05 µg/m^3	100%	60%
 Naphthalin	 0,05 µg/m^3	90%	70%

 Trichlorethylen	 0,05 µg/m^3	80%	70%

Insgesamt kann konstatiert werden, dass der Fortschritt unserer Studie die Ermittlung von Cut-Off Werten für VOC-Markersubstanzen ist und zudem die Entwicklung eines Verfahrens, das sich zur Bestimmung dieser Markersubstanzen eines dreidimensionalen Gradienten bedient, der das Verhältnis von den analysierten VOCs veranschaulicht. Die VOC-Differenzierung zeigt dabei sowohl das Verhältnis der genannten Substanzen untereinander an als auch ihre Herkunft aus exogenen bzw. endogenen Prozessen. Es besteht bei dieser Methode jedoch die Gefahr, dass die Bezugnahme auf die aktuelle Raumluftzusammensetzung zu Fehlern führt. Dies wäre z.B. der Fall, wenn die Atemluft eines Probandinnen nicht mit der Umgebungsluft im Raum der Probenahme im Gleichgewicht steht. Dann könnten ungewollt endogen produzierte Analyte subtrahiert werden bzw. aus anderen Quellen exogen aufgenommene Analyte nicht subtrahiert werden.

4.1.2 Bildungsprozess biogener flüchtiger organischer Substanzen

Derzeit existieren einige Hypothesen aber noch kein gesichertes Wissen um die Bildungsprozesse biogener flüchtiger organischer Substanzen. Als sicher gilt, dass ein veränderter Stoffwechsel mit einem charakteristischen Spektrum an VOCs im Atem einhergeht (Phillips et al. 2004). Dabei lassen sich mittels bestimmter VOC-Marker maligne von benignen Stoffwechselprozessen unterscheiden (Paoletti 1995). Hinsichtlich maligner Stoffwechselprozesse kursiert die Annahme, dass das VOC-Spektrum und die einzelnen VOC-Konzentrationen in engem Zusammenhang mit Größe und Ausmaß des Tumors stehen. Das bedeutet, je höher die Konzentrationen der VOCs sind (= positive Alveolargradient), desto weiter ist der Krebs fortgeschritten. Die in dieser Studie gemessenen flüchtigen Substanzen weisen jedoch größtenteils einen negativen Alveolargradienten für die ermittelten signifikanten VOCs im Atem der erkrankten Studienteilnehmerinnen auf. Wir vermuten, dass durch die gesteigerte Aktivität der Cytochrom-P450-Enzyme bei Karzinompatientinnen einige VOCs verstoffwechselt werden, da die

Induktion der Cyt-P450-Enzyme bereits zu Beginn der Krebsentstehung eintritt. Die Ergebnisse unsere Studie konnten diese Theorie erstmals wissenschaftlich untermauern. Dies erklärt die verminderte Konzentration der vier in dieser Studie identifizierten VOCs bei den Mammakarzinompatientinnen. Da die Cyt-P 450-Induktion bei Karzinomen als einer der ersten Stoffwechselalterationen einsetzt, ist ihre Detektion im Atem besonders attraktiv, da in den frühesten Karzinomstadien einsetzbar. Die Konzentrationen der VOCs in Bezug auf die Masse des Tumors und das Ausmaß des oxidativen Schadens wäre hierbei von sekundärer Bedeutung. Mit zunehmender Masse der Tumoren steigt dann die Konzentration einzelner VOCs, die durch die Tumoren produziert werden oder bei deren Stoffwechselprozessen anfallen. Durch ihre gesteigerte Masse können diese einzelnen VOCs intrakorporal nicht mehr abgebaut werden, so dass diese über die Lunge eliminiert werden und im Atem messbar sind. Somit ließen sich gesteigerte VOC-Werte in späteren Tumorstadien finden. Es ist anzunehmen, dass die Masse des Tumors mit den VOC-Werten in der Alveolarluft korreliert: Am Anfang der Krebsentstehung ist durch die Cytochrom-P450-Induktion bei Kranken ein reduziertes Spektrum einiger VOCs zu finden. Im Verlauf der Erkrankung spielen immer mehr die durch die Tumoren gebildeten Stoffwechselprodukte eine Rolle. Je nach Ausmaß und Lokalisation des oxidativen Schadens lassen sich verschiedene Kombinationen der organisch flüchtigen Substanzen eruieren.

Es ist daher davon auszugehen, dass der Atemtest auch Aussagen zu Größe und Ausmaß des Tumors liefern kann. In dieser Studie konnten aufgrund der geringen Fallzahl allerdings keine Aussagen zu histologischen Unterschieden und Differenzierungsgraden eines frühen und späten Krebsstadiums gemacht werden. Die Werte haben statistisch zu stark gestreut, um in dieser Hinsicht repräsentative und signifikante Unterschiede zu ermitteln. Tendenzen sind dennoch beschreibbar und sollten in einer zukünftigen Studie mit einem größeren Patientenkollektiv bestätigt werden.

4.2 Diskussion der Methode

4.2.1 Akkumulation der Analyten

Eine analytische Bewertung der Atemluftzusammensetzung ist erforderlich, um eine Aussage über das Spektrum und die Konzentrationen der interessierenden chemischen Verbindungen treffen zu können. Aufgrund der niedrigen Konzentrationen der organisch flüchtigen Substanzen werden für die Messung unterschiedliche Messtechniken in Kombination eingesetzt. Eine Substanzanreicherung ist dabei für einen empfindlichen und reproduzierbaren Nachweis unumgänglich. Das am häufigsten verwendete Anreicherungsverfahren ist die Adsorption, um aus gasförmigen Phasen gering konzentrierte Komponenten zu entfernen und sie an Fest- oder Flüssigphasen zu binden. Bei diesem Verfahren werden mehrere Liter Luft über ein Adsorbtionsröhrchen gesaugt, das bestimmte Spureninhaltsstoffe der Probe anreichert. Eine hohe Selektivität, große Sammelvolumina und vor allem eine einfache, Zeit sparende Analytik tragen dazu bei, dass die adsorptive Anreicherung zur Probenahme gasförmiger, organischer Luftinhaltsstoffe den anderen Probenahmetechniken überlegen ist (Figge, Rabel, Wieck 1987). Dabei hat sich die adsorptive Anreicherung an festen Adsorptionsmitteln mit anschließender Elution bzw. thermischer Desorption gegenüber den Absorptionsmethoden in Flüssigkeiten gut bewährt. In unserer Studie wurde die adsorptive Anreicherung mittels Tenax TA 60/80 in Verbindung mit Thermodesorption gewählt. Die Verwendung von Tenax TA 60/80, ein auf 2,6-Diphenyl-p-phenyloxid basierendes poröses Polymer mit einer maximalen Arbeitstemperatur von über 300 °C, einer spezifische Oberfläche von 750 m^2/g und einem Porendurchmesser von 5 nm, ist weit verbreitet, da das Adsorbens aufgrund seiner hohen Nachweisempfindlichkeit insbesondere für den Nachweis spezieller Einzelsubstanzen geeignet ist (Hallama et al 1997). Im Allgemeinen eignet es sich jedoch besonderes zur Anreicherung polarer und unpolarer organischer Substanzen mit Siedepunkten zwischen 60° und 300°. Weitere Gründe für die Wahl von Tenax TA 60/80 sind eine geringe Störanfälligkeit und Artefaktbildung. Und auch der Einfluss des Wassergehaltes einer Atemprobe auf das Adsorbens war ausschlaggebend für die Wahl, da Wasserdampf die Effektivität der Adsorption für organische Verbindungen während des Sammelns herabsetzt (Fabbri et al. 1987, Wood 1987, Ciccioli et al. 1992, Huang, Haghighat, Blondeau 2006). In einer Studie von Wolska et al. (1998) wurde belegt, dass Tenax TA, Tenax GR, Carbotrap und Carbotrap C nur sehr geringe Mengen an Wasser aufnehmen.

Nach der adsorptiven Anreicherung der Spurenelemente wurden die Analyten thermisch desorbiert. Die Thermodesorption als Desorptionsmethode wurde in der vorliegenden Studie aufgrund der hoch erzielbaren Nachweisempfindlichkeit und der Schnelligkeit der Analyse gewählt (Dettmer, Engewald 2002). Mittels dieser Methode gelangen die Analyten unverdünnt in das gaschromatographische System.

4.2.2 Quantitative und Qualitative Analyse der VOCs

Die quantitative und qualitative Analyse der im Atem vorkommenden organisch flüchtigen Substanzen erfolgte mittels Kapillar-Gaschromatographie in Verbindung mit Massenspektrometrie (GC-MS) als Standard-Nachweismethode. Diese Kombination ist ein anerkannter und bewährter Zugang zur Auftrennung des zu untersuchenden Stoffgemisches und zur Identifizierung und Quantifizierung der einzelnen Komponenten. Für die verwendeten GC-Systeme besteht allerdings derzeit noch keine generelle Einigung bezüglich der Verwendung von Ausatemluft. Daher kommen Flammenionisationsdetektoren (FID), Elektroneneinfangdetektoren (ECD) oder massenspektrometrische Detektoren (MSD) zum Einsatz. Alternativ wird für eine Reihe von Verbindungen auch Hochdruckflüssigchromatographie eingesetzt. Von den genannten Techniken bietet die GC/MS Kopplung die günstigsten Voraussetzungen für die Identifizierung und Quantifizierung von flüchtigen organischen Verbindungen und ist gleichermaßen für qualitative Screeninguntersuchungen und quantitative Bestimmungen von Luftanalysen geeignet (Hübschmann 1996). Der Vorteil der kombinierten GC/MS Methode ist, dass die chromatographische Trennung vor der Massenspektrometrie zu sauberen und besser interpretierbaren Spektren führt. Zu dem ermöglicht das massenspektrometrische Verfahren eine höchst spezifische Stoffidentifikation auf der Ebene der jeweiligen molekularen Struktur.

4.3 Fazit und Ausblick

Die Erforschung der flüchtigen organischen Ausatemmarker stellt in mehreren Anwendungsbereichen ein vielversprechendes Diagnostikum dar. Ihre Analyse hat ein enormes Potential zur Beobachtung von Entzündungen, oxidativem Stress, metabolischen Entgleisungen sowie bei bakteriellen und viralen Infektionen (Poly et al. 2008). Die Stärke der Atemanalyse liegt in ihrem nicht-invasiven Zugang und somit in ihrer beliebig wiederholbaren Durchführbarkeit. Eine wesentliche Schwierigkeit bei der Untersuchung der Exhala-

tionsluft besteht in dem Nachweis der extrem niedrigen Konzentrationen der organisch flüchtigen Bestandteile. In dieser Studie wurde versucht, die Analytik der gesuchten Substanzen im Atem zu standardisieren und im klinischen Alltag zu evaluieren. Die in dieser Arbeit verwendeten Messverfahren sind exakt, anwenderfreundlich und mehrfach reproduzierbar. Doch ist für die klinische Routine die Weiterentwicklung bekannter Probenahmetechniken und der im Labor bewährten Gaschromatographie-Massenspektrometrie-Analytik (GC-MS) zu einem mobilen GC-MS Messsystem notwendig. Die Analyse könnte dann mit Hilfe eines einfach zu handhabenden Schnelltests durchgeführt werden und innerhalb von 5-10 min abgeschlossen sein. Potentiell einsetzbar sind auch so genannte elektronische Nasen, Messgeräte, deren empfindlicher Sensor bei der Analyse von Gasgemischen auf winzige Mengen einer bestimmten Substanz reagiert. Bisher werden diese Apparate zur Messung von Luftschadstoffen oder zur Qualitätskontrolle in der Lebensmittelindustrie eingesetzt.

Insgesamt kann die Atemanalyse als ein neuer unabhängiger Verfahrensansatz zur Detektion des Mammakarzinoms betrachtet werden. Eine solche Methode macht die Mammographie natürlich nicht obsolet, sie könnte jedoch eine sinnvolle Ergänzung darstellen. Entscheidend für die Anwendung in der klinischen Praxis ist jedoch das weitere Herausarbeiten typischer und diskriminierender Analyten, die sich einzeln oder in Kombination als krankheits- oder entzündungsspezifisch erweisen. Hierfür sind zukünftige Studien notwendig, die bisherige Untersuchungsergebnisse bestätigen.

Für weitere Untersuchungen sollten aus dieser Arbeit folgende Schlüsse gezogen und im Versuchsaufbau beachtet werden: Die Ergebnisse der Pilotstudien müssen erst in größeren prospektiven Prüfungen bestätigt werden, bevor an einen breiten klinischen Einsatz zu denken ist. Die Auswahl der zu analysierenden VOCs sollte sich auf die bereits in dieser Studie signifikanten benannten VOCs beschränken bzw. diejenigen in die Analytik einbeziehen, die in der Tendenz signifikante Aussagen ermöglichen. Die in dieser Arbeit vorgestellte Methode bedient sich eines primär noninvasiven Zugangs zur Verifizierung eines Mammakarzinoms. Als Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen bietet sich der schematisch dargestellte Versuchsaufbau an. Überlegenswert wäre, das Patientenkollektiv in Untergruppen zu splitten, um jeweils eine VOC-Stoffklasse in einer Untersuchungsgruppe zu analysieren. Möglich ist zudem, eine kleinere Zahl von Parametern mit hoher Reproduzierbarkeit und Trennschärfe zwischen Kranken und Gesunden zu identifizieren und in klinischen Folgestudien detaillierter zu untersuchen. Einige interessante Parameter sind aus dieser Vorstudie bereits ersichtlich.

5 Zusammenfassung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Analyse von volatile organic compounds (VOCs), und ihrer veränderten Konzentrationen im Körper von Mammakarzinompatientinnen. Das Ziel dieser Pilotstudie war der Nachweis eines veränderten VOC-Spektrums im Atem von Patientinnen mit neu diagnostiziertem, primär nicht metastasiertem Mammakarzinom. Dazu wurde ein System zur Atemanalyse entwickelt und die Atemproben standardisiert entnommen. Laborchemisch gelang die Probenaufgabe schonend und reproduzierbar mittels Thermodesorption und Kryofokussierung. Die Trennung und der Nachweis der Analyte erfolgten per Gaschromatographie und Massenspektrometrie, einer zuverlässigen, nachweisstarken und reproduzierbaren Methode, die bereits in der Forschung mit Atemanalysen etabliert wurde. Erstmalig wurde der Einsatz der VOC-Atemanalyse im klinischen Setting evaluiert.

Die Ergebnisse unserer Studie zeigen, dass die exspiratorische Atemluft eine Vielzahl leichtflüchtiger, organischer Verbindungen im Spurenbereich enthält. Es konnten insgesamt zwischen 83 und 100 verschiedene Analyten pro Studienteilnehmerin identifiziert werden, zu denen Alkane, Alkene, Ketone, Halogenkohlenwasserstoffe, Ester, Ungesättigte Kohlenwasserstoffe, Terpene, Siloxane, Alkohole, Aldehyde und Aromaten gehören. Für jede Substanz wurde der alveoläre Gradient durch Subtraktion der Raumluftkonzentration von der Atemluftkonzentration gebildet. Bei den flüchtigen organischen Substanzen konnten nach qualitativer und quantitativer statistischer Analyse folgende Abhängigkeiten nachgewiesen werden: Einen deutlichen Unterschied zwischen Patientinnen der Kontroll- und Mammakarzinomgruppe zeigten einzelne Alkane, Alkene, Terpene, Halogenkohlenwasserstoffe und aromatische Verbindungen. Ein signifikanter Konzentrationsunterschied wurde für 3-Methylhexan, Decen, Caryophyllen, Naphthalin und Trichlorethylen gemessen. Die Konzentration von 3-Methylhexan, Decen, Caryophyllen und Naphthalin war im Atem von gesunden Probandinnen signifikant höher als im Atem der erkrankten Frauen. Hingegen war die Konzentration von Trichlorethylen im Atem der erkrankten Frauen signifikant höher.

Die Bedeutung dieser Ergebnisse liegt zunächst im Bereich der medizinischen Grundlagenforschung und der Entwicklung einer Referenz-Methodik zur weiteren Untersuchung exhalierter VOCs. Ein Teil der Befunde bleibt deskriptiv, solange die pathophysiologische Rolle spezifischer VOCs ungeklärt ist. Es ist anzunehmen, dass Veränderungen im Atem von Mammakarzinompatientinnen schon sehr frühzeitig zu detektieren

sind, da sich bei malignen Veränderungen auf der Molekularebene schon früh ganze Zellprozesse ändern: Es kommt zur Induktion des Cytochrom-P450-Systems und nachfolgend zu veränderten Stoffwechselprozessen. Diese Veränderungen führen zu einem signifikant differenten VOC-Spektrum im Atem. Daher könnte man die Methode besonders bei frühen Karzinomen, die in der Bildgebung noch nicht zu detektieren sind, heranziehen. Bei größeren Tumoren werden im Atem auch höhere VOC-Spektren gemessen, da es im Verlauf auch zur Produktion der VOCs kommt.

Diese Arbeit lässt den Schluss zu, dass chemische Analysen der Exhalationsluft auf flüchtige organische Substanzen im klinischen Alltag durchführbar sind und ein hohes Potential in der Diagnose des Mammakarzinoms besitzen. Somit stellen VOCs potentielle Marker für Brustkrebs dar. Ihre diesbezügliche Eignung wurde in dieser Studie mit der Quantifizierung organischer Spurenkomponenten unter Einsatz der hochsensitiven Methoden der Gaschromatographie und der Massenspektrometrie bestätigt. Validierte Messungen exhalierter VOCs könnten zukünftig für ein Bio-Monitoring auch außerhalb wissenschaftlicher Untersuchungen zur Verfügung stehen. Der Aufforderung des Arztes: „Bitte tief durchatmen!“ käme eine neue Bedeutung zu.

6 Literaturverzeichnis

1 Adler DD, Wahl RL. New methods for imaging the breast: techniques findings and potential. Am J Roentgenol 1995;164:19-30.

2 Antczak A, Nowak D, Shariati B, Krol M, Piasecka G, Kurmanowska Z. Increased hydrogen peroxide and thiobarbituric acid-reactive products in expired breath condensate of asthmatic patients. Eur Respir J 1997;19:1235-1241.

3 Barker M, Hengst M, Schmid J et al. Volatile organic compounds in the exhaled breath of young patients with cystic fibrosis. Eur Respir J 2006;27:929-936.

4 Beckmann MW, Fasching PA, Lux MP et al. Das familiäre Mammakarzinom-Syndrom. Med Welt 2001;52:385-390.

5 Beral V. Million Women Study Collaborators: Breast cancer and hormone replacement therapy in the Millon Women Study. Lancet 2003;362:419-27.

6 Berg JW, Hutter RVP. Breast cancer. Cancer 1995;75:257-269.

7 Brown RK, Kelly FJ. Evidence for increased oxidative damage in patients with cystic fibrosis. Pediatr Res. 1994;36(4):487-493.

8 Camel V, Caude M. Trace enrichment methods for the determination of organic pollutants in ambient air. J. Chromatogr. 1995;710:3-19.

9 Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status and survival in 24.740 breast cancer cases. Cancer 1989;63:181-187.

10 Chen X, Xu F, Wang Y et al. A study of the volatile organic compounds exhaled by lung cancer cells in vitro for breath diagnosis. Cancer 2007;110:835-44.

11 Chen CL, Weiss NS, Newcomb P, Barlow W, White E. Hormone replacement therapy in relation to breast cancer. JAMA 2002;287/6:734-41.

12 Chlebowski RT: Reducing the risk of breast cancer. Review article. New Engl J Med 2000;343/3:191-8.

13 Ciccioli P, Cecinato A, Brancaleoni E, Frattoni M. Use of carbon adsorption traps combined with HRGC-MS for the analysis of polar and non-polar C4-C14 hydrocarbons involved in photochemical smog formation. J. High Res. Chromatogr. 1992;15:75-84.

14 Colloborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and hormonal contraceptives: colloborate reanalysis of individual data on 53297 women with breast cancer and 100239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies. Lancet 1996;347:1713-27.

15 Colloborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and hormone replacemant therapy: colloborate reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52705 women with breast cancer and 108411 women without breast cancer. Lancet 1997;350:1047-59.

16 Colloborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Alcohol, tobacco and breast cancer colloborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58515 women with breast cancer and 95067 women without the disease. Br J Cancer 2002a;87/11:1234-45.

17 Danneker JR, Shaskan EG, Phillips M. A new highly sensitive assay for breath acetaldehyde: detection of endogenous levels in humans. Anal Biochem 1981;114:1-7.

18 Dettmer K, Engewald W. Adsorbent materials commonly used in air analysis for adsorptive enrichment and thermal desorption of volatile organic compounds. Analytical and Bioanalytical Chemistry 2002;373:490-500.

19 Dragonieri S, Schot R, Mertens BJ et al. An electronic nose in the discrimination of patients with asthma and controls. J Allergy Clin Immunol. 2007;120:856-62.

20 Dtsch Ärztebl 2007; 104(25): A 1804-7 [Heft 25].

21 Dtsch Ärztebl 2004; 101: A 2387-2390 [Heft 36].

22 Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4- hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. Free Radic Biol Med 1991;11:81-128.

23 Figge K, Rabel W, Wieck A: Adsorptionsmittel zur Anreicherung von organischen Luftinhaltsstoffen. Fresenius Z. Anal. Chem. 1987;327:261-278.

24 Goetzsche PC, Nielsen M. Screening for breast cancer with mammography. Cochrane Database of Systematic Reviews 2006, Issue 4.

25 Hallama R et al. Entwicklung und Vergleich von Methoden für die Analytik von flüchtigen organischen Verbindungen in der Arbeitsplatzatmosphäre. GIT Labor-Fachzeitschrift 1997:993-998.

26 Hankey BF, Curtis RE, Naughton MD, Boice JD, Flannery JT. A retrospective cohort analysis of second breast cancer risk for primary breast cancer patients with an assessment of the effect of radiation therapy. J Natl Cancer Inst 1983;70:797-804.

27 Harnann U, Haites N, Scott RJ, Maugard CM, Vasen H. Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. Am J Hum Gen 1998;62:676-689.

28 Horváth I, Donnelly LE, Kiss A, Paredi P, Kharitonov SA, Barnes PJ. Raises levels of exhaled carbon monoxide are associated with an increased expression of heme oxygenase-1 in airway macrophages in asthma: a new marker of oxidative stress. Thorax 1998;53:668-672.

29 Hoskins KF, Stopfer JE, Calzone KA et al. Assessment and counseling for women with a family history of breast cancer. A guide for clinicians. JAMA 1995;273:577-585.

30 Hotz P, Hoet P, Lauwerys R, Buchet JP. Development of a method to monitor low molecular mass hydrocarbons in exhaled breath of man: preliminary evaluation of its interest for detecting a lipidperoxidation process in vivo. Clin Chim Acta 1987;162:303-310.

31 Hübschmann HJ. Handbuch der GC/MS. Grundlagen und Anwendung. Weinheim; New York; Basel; Cambridge; Tokyo: Wiley-VCH Verlag, 1996.

32 Huang H, Haghighat F, Blondeau P. Volatile organic compound (VOC) adsorption on material: influence of gas phase concentration, relative humidity and VOC type. Indoor Air 2006;16(3):236-47.

33 Humad S, Zarling E, Clapper M, Skosey JL. Breath pentane excretion as a marker of disease activity in rheumatoid arthritis. Free Radic Res Commun 1988;5:101-6.

34 Iniesta C, de Castro Carpeño J, Carrasco JA et al. New screening method for lung cancer by detecting volatile organic compounds in breath. Clin Transl Oncol. 2007;9:364-8.

35 Jansson BO, Larsson BT. Analysis of organic compounds in human breath by gas chromatography-massspektrometry. J Lab Clin Med 1969;74:961-966.

36 Kalayci O, Besler T, Kilinc K, Sekerel BE, Saraclar Y. Serum levels of antioxidant vitamins (alpha tocopherol, beta carotene, and ascorbic acid) in children with bronchial asthma. Turkish J Pediatr 2000;42:17-21.

37 Kerlikowske K, Grady D, Barclay J, Sickles EA, Ernster V. Effect of age, breast density, and family history on the sensitivity of first screening mammography. JAMA 1996;276:33-43.

38 Kharitonov SA, Barnes PJ. Exhaled markers of pulmonary disease, Am J Respir Crit Care Med 2001;163:1693-722.

39 Kneepkens CMF, Ferreira C, Lepage G, Roy CC. The hydrocarbon breath test in the study of lipid peroxidation: principles and practice. Clin Invest Med 1992;15:163-86.

40 Krotozynski BK, Gabriel D, O`Neil H. Charakterisation of human expired air: A promising investigative and diagnostic technique. J Chromatogr Sci 1977;15:239-244.

41 Levin H. Building materials and indoor air quality. Occup Med State Art Rev 1989;4:667-93.

42 Lewis NS. Comparisons between mammalian and artificial olfaction based on arrays of carbon black-polymer composite vapor detectors. Acc Chem Res. 2004;37:663-72.

43 Lynch HT, Fusaro RM, Lynch J. Hereditary cancer in adults. Cancer Detect Prev 1995;19:219-233.

44 Manolis A. The diagnostic potential of breath analysis. Clin Chem 1983;29:5-15.

45 Marnett LJ. Oxyradicals and DNA damage. Carcinogenesis 2000;21:361-370.

46 McCulloch M, Jezierski T, Broffman M, Hubbard A, Turner K, Janecki T. Diagnostic accuracy of canine scent detection in early- and late-stage lung and breast cancers. Integr Cancer Ther 2006;5:30-9.

47 Mettlin C. Breast cancer risk factors. Contributions to planning breast cancer control. Cancer 1992;69:1904-1910.

48 Miekisch W, Schubert JK, Noeldge-Schomburg GFE. Diagnostic potential of breath analysis-focus on volatile organic compounds. Clin Chim Acta 2004;347:25-39.

49 Moretti M, Phillips M, Abouzeid A, Cataneo RN, Greenberg J. Increased breath markers of oxidative stress in normal pregnancy and in preeclampsia. Am J Obstet Gynecol 2004;190:1184-90.

50 Ozarus R, Tahan V, Turkmen S et al. Changes in malondialdehyde levels in bronchoalveolar fluid and serum by the treatment of asthma with inhaled steroid and beta2-agonist. Respirology 2000;5:289-292.

51 Paredi P, Kharitonov SA, Barnes PJ. Elevation of exhaled ethane concentration in asthma. Am J Respir Crit Care Med 2000;162:1450-54.

52 Pauling L et al. Quantitative analysis of urine vapor and breath by gas-liquid partition chromatography. Proc Nat Acad Sci USA 1971;68:374-76.

53 Paoletti P. Application of biomarkers in population studies for respiratory non-malignant diseases. Toxicology 1995;101:99-105.

54 Phillips M, Sabas M, Greenberg J. Increased pentane and carbon disulfide in the breath of patients with schizophrenia. J Clin Pathol 1993;46:861-64.

55 Phillips M, Greenberg J, Awad J. Metabolic and environmental origins of volatile organic compounds in breath. J Clin Pathol 1994;47:1052-53.

56 Phillips M, Erickson GA, Sabas M, Smith JP, Greenberg J. Volatile organic compounds in the breath of patients with schizophrenia. J Clin Pathol 1995:48(5):466-9.

57 Phillips M. Method for the collection and assay of volatile organic compounds in breath. Anal Biochem 1997;247:272-78.

58 Phillips M, Gleeson K, Hughes JM. Volatile organic compounds in breath as markers of lung cancer: a cross-sectional study. Lancet 1999;353:1930-33.

59 Phillips M, Herrera J, Krishnan S. Variation in volatile organic compounds in the breath of normal humans. Journal of Chromatography B 1999;729:75-88.

60 Phillips M, Cataneo RN, Greenberg J, Gunawardena R, Naidu A, Rahbari- Oskoui F. Effect of age on the breath methylated alkane contour, a display of apparent new markers of oxidative stress. J Lab Clin Med 2000;136(3):243-9.

61 Phillips M, MD, FACP. Volatile markers of breast cancer in the breath. The Breast Journal 2003;9(3):184-91.

62 Phillips M, Cataneo RN, Cummin AR. Detection of lung cancer with volatile markers in the breath. Chest 2003;123:2115-23.

63 Phillips M, Boehmer JP, Cataneo RN, Cheema T, Eisen HJ, Fallon JT, Fisher PE, Gass A, Greenberg J, Kobashigawa J, Mancini D, RayburnB, Zucker MJ. Heart allograft rejection: detection with breath alkanes in low levels (the HARDBALL study). J Heart Lung Transplant 2004:23(6):701-8.

64 Phillips M. Volatile biomarkers of pulmonary tuberculosis in the breath. Tuberculosis (Edinb.) 2007;87(1):44-52.

65 Pleil JD, Lindstrom AB. Exhaled human breath measurement method for assessing exposure to halogenated volatile organic compounds. Clin Chem 1997;43(5):723-30.

66 Poly D, Carboqnani P, Corradi M et al. Exhaled volatile organic compounds in patients with non-small cell lung cancer: cross sectional and nested short-term follow-up study. Respir Res 2005;6:71.

67 Poly D, Goldoni M, Caglieri A et al. Breath analysis in non small cell lung cancer patients after surgical tumour resection. Acta Biomed 2008;79 Suppl 1:64-72.

68 Rieder J, Lirk P, Ebenbichler C, Gruber G, Prazeller P, Lindinger W, Amann A. Analysis of volatile organic compounds: possible applications in metabolic disorders and cancer screening. Wien Klin Wochenschr 2001;113(5-6):181-5.

69 Riely CA, Cohen G, Lieberman M. Ethane evolution: a new index of lipid peroxidation. Science 1974;183:208-10.

70 Risby TH, Sehnert SS. Clinical Application of Breath Biomarkers of Oxidative Stress Status. Free Radic Biol Med 1999;27:1182-92.

71 RKI (2003) Krebskrankheiten. Robert-Koch-Institut Berlin, http://www.rki.de/KREBS, Stand März 2003.

72 Rosen PP. Breast pathology diagnosis by needle core biopsy. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia; Baltimore; New York, 1999:65-251.

73 Rosenberg RD, Hunt WC. Effects of age, breast density, ethnicity, and estrogen replacement therapy on screening mammographic sensitivity and cancer stage at diagnosis: review of 183, 134 screening mammograms in Albuquerque, New Mexico, Radiology 1998;209(2):511-8.

74 Schleibinger H, Lausmann D, Brattig C, Mangler M, Eis D, Ruden H. Emission patterns and emission rates of MVOC and the possibility for predicting hidden mold damage? Indoor Air 2005;9:98-104.

75 Schmutzhard J, Rieder J, Deibl M. Pilot study: volatile organic as a diagnostic marker for head and neck tumors, Head Neck 2008;30(6):743-9.

76 Schram J. Analytik luftgetragener Schadstoffe; Skript; Fachhochschule Niederhein, Fachbereich Chemie; Krefeld 1995.

77 Schuetzle D, Prater T J, Ruddell SR. Sampling and Analysis of Emissions from Stationary Sources, Odour and Total Hydrocarbons; Journal of the Air Pollution Control Association 1975;9:925-932.

78 Seer (Surveillance, Epidemiology and End Results) Program: www.seer.cancer.gov. National Cancer Institute, Cancer Statistics Branch 2003.

79 Sondik EJ. Breast cancer trends. Cancer 1994;74:995-999.

80 Tangermann A, Meuwese-Arends MT, vanTongeren JH. A new sensitive assay for measuring volatile sulphur compounds in human breath by Tenax trapping and gas chromatography and its application in liver cirrhosis. Clin Chim Acta 1983;130:103-10.

81 Tassopoulos CN, Barnett D, Fraser TR. Breath-acetone and blood-sugar measurements in diabetes. Lancet 1969;1:1282-86.

82 Tavassoli FA. Pathology of the breast. Appleton & Lange, Norwalk, Conneticut 1992;52-309.

83 Wallace LA, Pellizzari ED, Leaderer BP, Zelon H, Sheldon LS. Emissions of volatile organic compounds from building materials and consumer products. Atmos Environ 1987;21:385-93.

84 Weitz ZW, Birnbaum AJ, Sobotka PA, Zarling EJ, Skosey JL. High breath pentane concentrations during acute myocardial infarction. Lancet 1991;337:933-5.

85 Wilkens K, Mikrobial VOC (MVOC) in buildungs, their properties and potential use. Proceedings of the 9thInternational Conference on Indoor Air Quality and Climate. Monterey, California USA, ppt 431.

86 Wolska L, Olszewska C, Zygmunt B, Namiesnik J. Volatile and semivolatile organo-halogen trace analysis in surface water by direct aqueous injection GC-ECD, Chemosphere 1998;37:2645-2651.

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klassifizierung von flüchtigen organischen Verbindungen 6
Tabelle 2: Durchführung der Probenahme 19
Tabelle 3: Desorption mittels Thermodesorption 19
Tabelle 4: GC/MS Bestimmungen der VOC 19
Tabelle 5: Alkankohlenwasserstoffe 20
Tabelle 6: Alkenkohlenwasserstoffe 20
Tabelle 7: Ungesättigte Kohlenwasserstoffe 20
Tabelle 8: Halogenkohlenwasserstoffe 21
Tabelle 9: Terpene 21
Tabelle 10: Siloxane 21
Tabelle 11: Ester einwertiger Alkohole 21
Tabelle 12: Aromaten 21
Tabelle 13: Ketone 21
Tabelle 14: Alkohole/ Aldehyde 21
Tabelle 15: Verbrauchsmaterialien der VOC-Analyse 22
Tabelle 16: Geräte und Instrumente der VOC-Analyse 22
Tabelle 17: Weitere verwendete Materialien 22
Tabelle 18: Charakteristika der Patientinnen (n=10) und Probandinnen (n=10) 25
Tabelle 19: Alter und BMI der Patientinnen (n=10) und Probandinnen (n=10) 26
Tabelle 20: Diagnosen der Patientinnen (n=10) 26
Tabelle 21: Häufigkeitsverteilung beim Grading 29
Tabelle 22: Häufigkeitsverteilung der Patientinnen in den gruppierten Tumorstadien 29
Tabelle 23: Gegenstand der Untersuchung 30
Tabelle 24: Identifizierte VOCs aller Atemproben 30
Tabelle 25: Darstellung der absoluten Häufigkeiten der Alveolargradienten – Alkane 32
Tabelle 26: Darstellung der absoluten Häufigkeiten der Alveolargradienten – Alkene 33
Tabelle 27: Darstellung der absoluten Häufigkeiten der Alveolargradienten – Aromatische Kohlenwasserstoffe 34
Tabelle 28: Darstellung der absoluten Häufigkeiten der Alveolargradienten – Halogenkohlenwasserstoffe 35
Tabelle 29: Darstellung der absoluten Häufigkeiten der Alveolargradienten – Terpene 36

Tabelle 30: Darstellung der absoluten Häufigkeiten der Alveolargradienten – Alkohole und Aldehyde 37
Tabelle 31: Summenformel, Strukturformel und CAS-Nummer der signifikanten VOCs 38
Tabelle 32: Deskriptive Statistik für 3-Methylhexan 39
Tabelle 33: ROC-Analyse für 3-Methylhexan 40
Tabelle 34: Deskriptive Statistik für Decen 41
Tabelle 35: Deskriptive Statistik für Decen 42
Tabelle 36: Deskriptive Statistik für Caryophyllen 43
Tabelle 37: ROC-Analyse für Caryophyllen 44
Tabelle 38: Deskriptive Statistik für Naphthalin 45
Tabelle 39: ROC-Analyse für Naphthalin 46
Tabelle 40: Deskriptive Statistik für Trichlorethylen 47
Tabelle 41: ROC-Analyse für Trichlorethylen 48
Tabelle 42: Übersicht der VOC-Kombination zur Erkennung eines Lungenkarzinoms (M. Phillips et al. 2003) 52
Tabelle 43: VOCs in der Atemluft der Probandinnen (Diana et al. 2005) 52
Tabelle 44: Übersicht der VOC-Kombination zur Erkennung eines Mammakarzinoms (Philipps et al., 2003) 53
Tabelle 45: Übersicht der VOC-Kombination zur Erkennung eines Mammakarzinoms 55
Tabelle 46: VOC-Markersubstanzen und Cut-Off-Werte für das Mammakarzinom 57

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Probenahme mit Gasmaus, Prüfröhrchen und automatischer Pumpe 12
Abbildung 2: Spülung der Gasmaus 13
Abbildung 3: Pumpvorgang 13
Abbildung 4: Ausatmungsvorgang 14
Abbildung 5: Schematischer Ablauf von Probenahme und Analytik 15
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Probenahme 16
Abbildung 7: Modifiziertes Funktionsblockdiagramm der VOC-Analyse 17
Abbildung 8: Box-Whisker-Plot für das Alter der Patientinnen und Probandinnen 26
Abbildung 9: Box-Whisker-Plot für den BMI der Patientinnen und Probandinnen 26
Abbildung 10: Überblick über die histologischen Typen 28
Abbildung 11: Überblick über die prozentuale Verteilung des Grading 28
Abbildung 12: Überblick über die Verteilung der Tumorstadien im Gesamtkollektiv 29
Abbildung 13: Box-Whisker-Plot für die Konzentrationen von 3-Methylhexan bei den Patientinnen und den gesunden Probandinnen 39
Abbildung 14: ROC-Kurve für die Konzentrationswerte von 3-Methylhexan in der Atemluft von Patientinnen mit Mammakarzinom 40
Abbildung 15: Box-Whisker-Plot für die Konzentrationen von Decen bei den Patientinnen und den gesunden Probandinnen 41
Abbildung 16: ROC-Kurve für die Konzentrationswerte von Decen in der Atemluft von Patientinnen mit Mammakarzinom 42
Abbildung 17: Box-Whisker-Plot Konzentrationen von Caryophyllen bei den Patientinnen und den gesunden Probandinnen 43
Abbildung 18: ROC-Kurve für die Konzentrationswerte von Caryophyllen in der Atemluft von Patientinnen mit Mammakarzinom 44
Abbildung 19: Box-Whisker-Plot für die Konzentrationen von Naphthalin bei den Patientinnen und den gesunden Probandinnen 45
Abbildung 20: ROC-Kurve für die Konzentrationswerte von Naphthalin in der Atemluft von Patientinonen mit Mammakarzinom 46
Abbildung 21: Box-Whisker-Plot für die Konzentrationen von Trichlorethylen bei den Patientinnen und den gesunden Probandinnen 47

Abbildung 22: ROC-Kurve für die Konzentrationswerte von Trichlorethylen in der Atemluft von Patientinnen mit Mammakarzinom _____48

9 Ergänzendes Datenmaterial

9.1 Qualitative Analyse

In den Tabellen 1-10 sind die Alveolargradienten und ihre prozentualen Anteile bezüglich der identifizierten VOCs im Atem von Patientinnen mit Mammakarzinom und gesunden Probandinnen zusammengefasst dargestellt. Die ermittelten signifikanten Markersubstanzen für das Mammakarzinom und deren Werte sind grün hinterlegt.

Tabelle 1: Darstellung der absoluten Häufigkeiten der Alveolargradienten - Alkane

Alkan		Gruppe		Gesamt
		Probandinnen	Patientinnen	
n-Hexan	Negativer Alveolargradient	7(70%)	4(40%)	11(55%)
	VOC-Konstant	0(0%)	0(0%)	0(0%)
	Positiver Alveolargradient	3(30%)	6(60%)	9(45%)
n-Heptan	Negativer Alveolargradient	5(50%)	6(60%)	11(55%)
	VOC-Konstant	1(10%)	0(0%)	1(5%)
	Positiver Alveolargradient	4(40%)	4(40%)	8(40%)
n-Oktan	Negativer Alveolargradient	8(80%)	6(60%)	14(70%)
	VOC-Konstant	1(10%)	0(0%)	1(5%)
	Positiver Alveolargradient	1(10%)	4(40%)	5(25%)
n-Nonan	Negativer Alveolargradient	2(20%)	5(50%)	7(35%)
	VOC-Konstant	5(50%)	1(10%)	6(30%)
	Positiver Alveolargradient	3(30%)	4(40%)	7(35%)
n-Dekan	Negativer Alveolargradient	1(10%)	3(30%)	4(20%)
	VOC-Konstant	1(10%)	1(10%)	2(10%)
	Positiver Alveolargradient	8(80%)	6(60%)	14(70%)
n-Undekan	Negativer Alveolargradient	0(0%)	3(30%)	3(15%)
	VOC-Konstant	1(10%)	1(10%)	2(10%)
	Positiver Alveolargradient	9(90%)	6(60%)	15(75%)
n-Dodekan	Negativer Alveolargradient	0(0%)	5(50%)	5(25%)
	VOC-Konstant	2(20%)	1(10%)	3(15%)
	Positiver Alveolargradient	8(80%)	4(40%)	12(60%)
n-Tridekan	Negativer Alveolargradient	9(90%)	4(40%)	13(65%)
	VOC-Konstant	1(10%)	6(60%)	7(35%)
	Positiver Alveolargradient	0(0%)	0(0%)	0(0%)
n-Tetradekan	Negativer Alveolargradient	4(40%)	7(70%)	11(55%)
	VOC-Konstant	1(10%)	0(0%)	1(5%)
	Positiver Alveolargradient	5(50%)	3(30%)	8(40%)
n-Pentadekan	Negativer Alveolargradient	3(30%)	8(80%)	11(55%)
	VOC-Konstant	5(50%)	0(0%)	5(25%)
	Positiver Alveolargradient	2(20%)	2(20%)	4(20%)
n-Hexadekan	Negativer Alveolargradient	4(40%)	8(80%)	12(60%)

	VOC-Konstant	2(20%)	0(0%)	2(10%)
	Positiver Alveolargradient	4(40%)	2(20%)	6(30%)
n-Heptadekan	Negativer Alveolargradient	2(20%)	4(40%)	6(30%)
	VOC-Konstant	8(80%)	2(20%)	10(50%)
	Positiver Alveolargradient	0(0%)	4(40%)	4(20%)
n-Oktadekan	Negativer Alveolargradient	1(10%)	2(20%)	3(15%)
	VOC-Konstant	2(10%)	1(10%)	3(15%)
	Positiver Alveolargradient	7(70%)	7(70%)	14(70%)
n-Nonadekan	Negativer Alveolargradient	5(50%)	4(40%)	9(45%)
	VOC-Konstant	0(0%)	3(30%)	3(15%)
	Positiver Alveolargradient	5(50%)	3(30%)	8(40%)
Eicosan	Negativer Alveolargradient	2(20%)	4(40%)	6(30%)
	VOC-Konstant	6(60%)	4(40%)	10(50%)
	Positiver Alveolargradient	2(20%)	2(20%)	4(20%)
2-Methylpentan	Negativer Alveolargradient	8(80%)	7(70%)	15(75%)
	VOC-Konstant	1(10%)	0(0%)	1(5%)
	Positiver Alveolargradient	1(10%)	3(30%)	4(20%)
3-Methylpentan	Negativer Alveolargradient	4(40%)	5(50%)	9(45%)
	VOC-Konstant	0(0%)	1(10%)	1(5%)
	Positiver Alveolargradient	6(60%)	4(40%)	10(50%)
Methylcyclopentan	Negativer Alveolargradient	3(30%)	2(20%)	5(25%)
	VOC-Konstant	0(0%)	0(0%)	0(0%)
	Positiver Alveolargradient	7(70%)	8(80%)	15(75%)
Cyclohexan	Negativer Alveolargradient	8(80%)	4(40%)	12(60%)
	VOC-Konstant	0(0%)	0(0%)	0(0%)
	Positiver Alveolargradient	2(20%)	6(60%)	8(40%)
2-Methylhexan	Negativer Alveolargradient	3(30%)	7(70%)	10(50%)
	VOC-Konstant	0(0%)	0(0%)	0(0%)
	Positiver Alveolargradient	7(70%)	3(30%)	10(50%)
3-Methylhexan	Negativer Alveolargradient	2(20%)	6(60%)	8(40%)
	VOC-Konstant	2(20%)	1(10%)	3(15%)
	Positiver Alveolargradient	6(60%)	3(30%)	9(45%)
Isooctan	Negativer Alveolargradient	3(30%)	6(60%)	9(45%)
	VOC-Konstant	0(0%)	0(0%)	0(0%)
	Positiver Alveolargradient	7(70%)	4(40%)	11(55%)
Methylcyclohexan	Negativer Alveolargradient	4(40%)	4(40%)	8(40%)
	VOC-Konstant	2(20%)	0(0%)	2(10%)
	Positiver Alveolargradient	4(40%)	6(60%)	10(50%)
2,3 Dimethylheptan	Negativer Alveolargradient	0(0%)	3(30%)	3 (15%)
	VOC-Konstant	7(70%)	4(40%)	11(55%)
	Positiver Alveolargradient	3(30%)	3(30%)	6(30%)
2,2,4,6,6-Pentamethylheptan	Negativer Alveolargradient	0(0%)	1(10%)	1(5%)
	VOC-Konstant	1(10%)	1(10%)	2(10%)
	Positiver Alveolargradient	9(90%)	8(80%)	17(85%)
2,2,4,4,6,8,8- Hepta-methylnonan	Negativer Alveolargradient	6(60%)	6(60%)	12(60%)
	VOC-Konstant	3(30%)	2(20%)	5(25%)

	Positiver Alveolargradient	1(10%)	2(20%)	3(15%)
Gesamt		10 (100%)	10 (100%)	20 (100%)

Tabelle 2: Darstellung der absoluten Häufigkeiten der Alveolargradienten - Alkene

Alken		Gruppe		Gesamt
		Probandinnen	Patientinnen	
Hepten	Negativer Alveolargradient	4(40%)	2(20%)	6(30%)
	VOC-Konstant	1(10%)	5(50%)	6(30%)
	Positiver Alveolargradient	5(50%)	3(30%)	8(40%)
Octen	Negativer Alveolargradient	4(40%)	7(70%)	11(55%)
	VOC-Konstant	6(60%)	0(0%)	6(30%)
	Positiver Alveolargradient	0(00%)	3(30%)	3(15%)
Nonen	Negativer Alveolargradient	2(20%)	2(20%)	2(20%)
	VOC-Konstant	8(80%)	5(50%)	13(65%)
	Positiver Alveolargradient	0(0%)	3(30%)	3(15%)
Decen	Negativer Alveolargradient	1(10%)	4(40%)	5(25%)
	VOC-Konstant	4(40%)	2(20%)	6(30%)
	Positiver Alveolargradient	5(50%)	4(40%)	9(45%)
Undecen	Negativer Alveolargradient	6(60%)	5(50%)	11(55%)
	VOC-Konstant	2(20%)	3(30%)	5(25%)
	Positiver Alveolargradient	2(20%)	2(20%)	4(20%)
Dodecen	Negativer Alveolargradient	1(10%)	3(30%)	4(20%)
	VOC-Konstant	6(60%)	4(40%)	10(50%)
	Positiver Alveolargradient	3(30%)	3(30%)	6(30%)
Tridecen	Negativer Alveolargradient	4(40%)	3(30%)	7(35%)
	VOC-Konstant	3(30%)	1(10%)	4(20%)
	Positiver Alveolargradient	3(30%)	6(60%)	9(45%)
Gesamt		10(100%)	10(100%)	20(100%)

Tabelle 3: Darstellung der absoluten Häufigkeiten der Alveolargradienten – Ungesättigte Kohlenwasserstoffe

Ungesättigter Kohlenwasserstoff		Gruppe		Gesamt
		Probandinnen	Patientinnen	
4-Vinylcyclohexen	Negativer Alveolargradient	0(0%)	0(0%)	0(0%)
	VOC-Konstant	8(20%)	10(100%)	18 (90%)
	Positiver Alveolargradient	2(20%)	0(0%)	2(10%)
trimeres Isobuten	Negativer Alveolargradient	0(0%)	2(20%)	2(10%)
	VOC-Konstant	7(70%)	5(50%)	12(60%)
	Positiver Alveolargradient	3(30%)	3(30%)	6(30%)
Linalool	Negativer Alveolargradient	4(40%)	1(10%)	5(25%)
	VOC-Konstant	2(20%)	3(30%)	5(25%)
	Positiver Alveolargradient	4(40%)	6(60%)	10(50%)
4-Phenylcyclohexen	Negativer Alveolargradient	0(0%)	0(0%)	0(0%)
	VOC-Konstant	10(100%)	10(100%)	20(100%)

	Positiver Alveolargradient	0(0%)	0(0%)	0(0%)
Gesamt		10(100%)	10(100%)	20(100%)

Tabelle 4: Darstellung der absoluten Häufigkeiten der Alveolargradienten – Aromaten

Aromat		Gruppe		Gesamt
		Probandinnen	Patientinnen	
n-Hexan	Negativer Alveolargradient	7(70%)	7(70%)	14(70%)
	VOC-Konstant	1(10%)	2(20%)	3(15%)
	Positiver Alveolargradient	2(20%)	1(10%)	3(15%)
Toluol	Negativer Alveolargradient	7(70%)	3(30%)	10(50%)
	VOC-Konstant	0(0%)	0(0%)	0(0%)
	Positiver Alveolargradient	3(30%)	7(70%)	10(50%)
Ethylbenzol	Negativer Alveolargradient	0(0%)	2(20%)	2(10%)
	VOC-Konstant	1(10%)	2(20%)	3(15%)
	Positiver Alveolargradient	9(90%)	6(60%)	15(75%)
m/p-Xylol	Negativer Alveolargradient	0(0%)	3(30%)	3(15%)
	VOC-Konstant	1(10%)	0(0%)	1(5%)
	Positiver Alveolargradient	9(90%)	7(70%)	16(80%)
o-Xylol	Negativer Alveolargradient	0(0%)	4(40%)	4(20%)
	VOC-Konstant	1(10%)	1(10%)	2(10%)
	Positiver Alveolargradient	9(90%)	5(50%)	14(70%)
Styrol	Negativer Alveolargradient	2(20%)	1(10%)	3(15%)
	VOC-Konstant	3(30%)	0(0%)	3(15%)
	Positiver Alveolargradient	5(50%)	9(90%)	14(70%)
1,3,5-Trimethylbenzol	Negativer Alveolargradient	0(0%)	2(20%)	2(10%)
	VOC-Konstant	1(10%)	2(20%)	3(15%)
	Positiver Alveolargradient	9(90%)	6(60%)	15(75%)
1,2,4- Trimethylbenzol	Negativer Alveolargradient	0(0%)	4(40%)	4(20%)
	VOC-Konstant	0(0%)	0(0%)	0(0%)
	Positiver Alveolargradient	10(100%)	6(60%)	16(80%)
1,2,3-Trimethylbenzol	Negativer Alveolargradient	0(0%)	1(10%)	1(5%)
	VOC-Konstant	3(30%)	5(50%)	8(40%)
	Positiver Alveolargradient	7(70%)	4(40%)	11(45%)
Isopropylbenzol	Negativer Alveolargradient	0(0%)	1(10%)	1(5%)
	VOC-Konstant	5(50%)	0(0%)	5(25%)
	Positiver Alveolargradient	3(30%)	5(50%)	8(40%)
n-Propylbenzol	Negativer Alveolargradient	0(0%)	3(30%)	3(15%)
	VOC-Konstant	4(40%)	1(10%)	5(25%)
	Positiver Alveolargradient	6(60%)	6(60%)	12(60%)
3,4 Ethyltoluol	Negativer Alveolargradient	0(0%)	3(30%)	3(15%)
	VOC-Konstant	0(0%)	2(20%)	2(10%)
	Positiver Alveolargradient	10(100%)	5(50%)	15(75%)
2-Ethyltoluol	Negativer Alveolargradient	0(0%)	4(40%)	4(20%)
	VOC-Konstant	3(30%)	2(20%)	5(25%)
	Positiver Alveolargradient	7(70%)	4(40%)	11(45%)

1-Methyl-4-Isopropylbenzol	Negativer Alveolargradient	0(0%)	4(40%)	4(20%)
	VOC-Konstant	6(60%)	0(0%)	6(30%)
	Positiver Alveolargradient	4(40%)	6(60%)	10(50%)
Indan	Negativer Alveolargradient	0(0%)	2(20%)	2(10%)
	VOC-Konstant	7(70%)	5(50%)	12(60%)
	Positiver Alveolargradient	3(30%)	3(30%)	6(30%)
1,2,4,5-Tetramethylbenzol	Negativer Alveolargradient	0(0%)	1(10%)	1(5%)
	VOC-Konstant	8(80%)	8(80%)	16(80%)
	Positiver Alveolargradient	2(20%)	1(10%)	3(15%)
1,3-/1,4-Diisopropylbenzol	Negativer Alveolargradient	0(0%)	0(0%)	0(0%)
	VOC-Konstant	10(100%)	10(100%)	10(200%)
	Positiver Alveolargradient	0(0%)	0(0%)	0(0%)
1,2,3,4-Tedrahydro-naphthalin	Negativer Alveolargradient	0(0%)	1(10%)	1(5%)
	VOC-Konstant	10(100%)	7(70%)	17(85%)
	Positiver Alveolargradient	0(0%)	2(20%)	2(10%)
Naphthalin	Negativer Alveolargradient	0(0%)	1(10%)	1(5%)
	VOC-Konstant	1(10%)	6(60%)	7(35%)
	Positiver Alveolargradient	9(90%)	3(30%)	12(60%)
2-Methylnaphthalin	Negativer Alveolargradient	0(0%)	0(0%)	0(0%)
	VOC-Konstant	10(100%)	7(70%)	17(85%)
	Positiver Alveolargradient	0(0%)	3(30%)	3(15%)
1-Methylnaphthalin	Negativer Alveolargradient	0(0%)	3(30%)	3(15%)
	VOC-Konstant	10(100%)	7(70%)	17(85%)
	Positiver Alveolargradient	0(0%)	0(0%)	0(0%)
Gesamt		10(100%)	10(100%)	20(100%)

Tabelle 5: Darstellung der absoluten Häufigkeiten der Alveolargradienten - Halogen-kohlenwasserstoffe

Halogenkohlenwasserstoff		**Gruppe**		
		Probandinnen	**Patientinnen**	**Gesamt**
Cis-1,2-Dichlorethen	Negativer Alveolargradient	0(0%)	1(10%)	1(5%)
	VOC-Konstant	9(90%)	9(90%)	18(90%)
	VOC-Abgabe	1(10%)	0(0%)	1(5%)
Trichlormethan	Negativer Alveolargradient	5(50%)	2(20%)	7(35%)
	VOC-Konstant	0(0%)	4(40%)	4(20%)
	Positiver Alveolargradient	5(50%)	4(40%)	9(45%)
1,1,1-Trichlorethan	Negativer Alveolargradient	3(30%)	5(50%)	8(40%)
	VOC-Konstant	6(60%)	4(40%)	10(50%)
	Positiver Alveolargradient	1(10%)	1(10%)	2(10%)
1,2-Dichlorethan	Negativer Alveolargradient	3(30%)	3(30%)	6(30%)
	VOC-Konstant	7(70%)	5(50%)	12(60%)
	Positiver Alveolargradient	0(0%)	2(20%)	2(10%)
Tetrachlormethan	Negativer Alveolargradient	6(60%)	8(80%)	14(70%)
	VOC-Konstant	3(30%)	0(0%)	3(15%)
	Positiver Alveolargradient	1(10%)	2(20%)	3(15%)

Trichlorethylen	Negativer Alveolargradient	1(10%)	2(20%)	3(15%)
	VOC-Konstant	6(60%)	0(0%)	6(30%)
	Positiver Alveolargradient	3(30%)	8(80%)	11(55%)
Perchlorethylen	Negativer Alveolargradient	0(0%)	2(20%)	2(10%)
	VOC-Konstant	7(70%)	1(10%)	8(40%)
	Positiver Alveolargradient	3(30%)	7(70%)	10(50%)
Chlorbenzol	Negativer Alveolargradient	0(0%)	0(0%)	0(0%)
	VOC-Konstant	10(100%)	8(80%)	18(90%)
	Positiver Alveolargradient	0(0%)	2(20%)	2(10%)
1,3-Dichlorbenzol	Negativer Alveolargradient	0(0%)	2(20%)	2(10%)
	VOC-Konstant	0(0%)	0(0%)	0(0%)
	Positiver Alveolargradient	10(100%)	8(80%)	18(90%)
1,4-Dichlorbenzol	Negativer Alveolargradient	0(0%)	0(0%)	0(0%)
	VOC-Konstant	5(50%)	6(60%)	11(55%)
	Positiver Alveolargradient	5(50%)	4(40%)	9(45%)
1,2-Dichlorbenzol	Negativer Alveolargradient	0(0%)	0(0%)	0(0%)
	VOC-Konstant	10(100%)	10(100%)	20(100%)
	Positiver Alveolargradient	0(0%)	0(0%)	0(0%)
Gesamt		10(100%)	10(100%)	20(100%)

Tabelle 6: Darstellung der absoluten Häufigkeiten der Alveolargradienten –Terpene

Terpen		**Gruppe**		**Gesamt**
		Probandinnen	**Patientinnen**	
a-Pinen	Negativer Alveolargradient	2(20%)	2(20%)	4(20%)
	VOC-Konstant	1(10%)	0(0%)	1(5%)
	Positiver Alveolargradient	7(70%)	8(80%)	15(75%)
b-Pinen	Negativer Alveolargradient	2(20%)	1(10%)	3(15%)
	VOC-Konstant	2(20%)	3(30%)	5(25%)
	Positiver Alveolargradient	6(60%)	6(60%)	12(60%)
Delta-3-Caren	Negativer Alveolargradient	2(20%)	1(10%)	3(15%)
	VOC-Konstant	0(0%)	0(0%)	0(0%)
	Positiver Alveolargradient	8(80%)	9(90%)	17(85%)
a-Terpinen	Negativer Alveolargradient	0(0%)	0(0%)	0(0%)
	VOC-Konstant	10(100%)	10(100%)	20(100%)
	Positiver Alveolargradient	0(0%)	0(0%)	0(0%)
Limonen	Negativer Alveolargradient	1(10%)	1(10%)	2(10%)
	VOC-Konstant	0(0%)	0(0%)	0(0%)
	Positiver Alveolargradient	9(90%)	9(90%)	18(90%)
Eucalyptol	Negativer Alveolargradient	2(20%)	1(10%)	3(15%)
	VOC-Konstant	0(0%)	0(0%)	0(0%)
	Positiver Alveolargradient	8(80%)	9(90%)	17(85%)
Campher	Negativer Alveolargradient	0(0%)	1(10%)	1(5%)
	VOC-Konstant	3(30%)	1(10%)	4(20%)
	Positiver Alveolargradient	7(70%)	8(80%)	15(75%)
Borneol	Negativer Alveolargradient	1(10%)	4(40%)	5(25%)

	VOC-Konstant	3(30%)	2(20%)	5(25%)
	Positiver Alveolargradient	6(60%)	4(40%)	10(50%)
Verbenon	Negativer Alveolargradient	1(10%)	1(10%)	2(10%)
	VOC-Konstant	5(50%)	1(10%)	6(30%)
	Positiver Alveolargradient	4(640%)	8(80%)	12(60%)
Vanillin	Negativer Alveolargradient	0(0%)	5(50%)	5(25%)
	VOC-Konstant	10(100%)	5(50%)	15(75%)
	Positiver Alveolargradient	0(0%)	0(00%)	0(0%)
Isolongifolen	Negativer Alveolargradient	1(100%)	2(20%)	3(15%)
	VOC-Konstant	7(70%)	5(50%)	12(60%)
	Positiver Alveolargradient	2(20%)	3(30%)	5(25%)
Longifolen	Negativer Alveolargradient	2(20%)	6(60%)	8(40%)
	VOC-Konstant	4(40%)	1(10%)	5(25%)
	Positiver Alveolargradient	4(40%)	3(30%)	7(35%)
Caryophyllen	Negativer Alveolargradient	0(0%)	6(60%)	6(30%)
	VOC-Konstant	3(30%)	2(20%)	5(25%)
	Positiver Alveolargradient	7(70%)	2(20%)	9(45%)
Gesamt		10(100%)	10(100%)	20(100%)

Tabelle 7: Darstellung der absoluten Häufigkeiten der Alveolargradienten - Siloxane

Siloxan		Gruppe		Gesamt
		Probandinnen	Patientinnen	
b-Pinen	Negativer Alveolargradient	2(20%)	1(10%)	3(15%)
	VOC-Konstant	2(20%)	3(30%)	5(25%)
	Positiver Alveolargradient	6(60%)	6(60%)	12(60%)
Delta-3-Caren	Negativer Alveolargradient	2(20%)	1(10%)	3(15%)
	VOC-Konstant	0(0%)	0(0%)	0(0%)
	Positiver Alveolargradient	8(80%)	9(90%)	17(85%)
b-Pinen	Negativer Alveolargradient	2(20%)	1(10%)	3(15%)
	VOC-Konstant	2(20%)	3(30%)	5(25%)
	Positiver Alveolargradient	6(60%)	6(60%)	12(60%)
Gesamt		10(100%)	10(100%)	20(100%)

Tabelle 8: Darstellung der absoluten Häufigkeiten der Alveolargradienten – Ester einwertiger Alkohole

Ester einwertiger Alkohole		Gruppe		Gesamt
		Probandinnen	Patientinnen	
Vinylacetat	Negativer Alveolargradient	3(30%)	5(50%)	8(40%)
	VOC-Konstant	5(50%)	1(10%)	6(30%)
	Positiver Alveolargradient	2(20%)	4(40%)	6(30%)
Ethylacetat	Negativer Alveolargradient	0(0%)	2(20%)	2(10%)
	VOC-Konstant	0(0%)	0(0%)	0(0%)
	Positiver Alveolargradient	10(100%)	8(80%)	18(90%)

Isopropylacetat	Negativer Alveolargradient	0(0%)	0(0%)	0(0%)
	VOC-Konstant	10(100%)	10(100%)	20(100%)
	Positiver Alveolargradient	0(0%)	0(0%)	0(0%)
n-Propylacetan	Negativer Alveolargradient	4(40%)	3(30%)	7(35%)
	VOC-Konstant	0(0%)	2(20%)	2(10%)
	Positiver Alveolargradient	6(60%)	5(50%)	11(55%)
Methacrylsäure-methylester	Negativer Alveolargradient	1(10%)	0(0%)	1(5%)
	VOC-Konstant	1(10%)	2(20%)	3(15%)
	Positiver Alveolargradient	8(80%)	8(80%)	16(80%)
Butylformiat	Negativer Alveolargradient	4(40%)	1(10%)	5(25%)
	VOC-Konstant	3(30%)	3(30%)	6(30%)
	Positiver Alveolargradient	3(30%)	6(60%)	9(45%)
Isobutylacetat	Negativer Alveolargradient	0(0%)	1(10%)	1(5%)
	VOC-Konstant	1(10%)	2(20%)	3(15%)
	Positiver Alveolargradient	9(90%)	7(70%)	16(80%)
n-Butylacetat	Negativer Alveolargradient	0(0%)	1(10%)	1(5%)
	VOC-Konstant	0(0%)	0(0%)	0(0%)
	Positiver Alveolargradient	10(100%)	10(100%)	20(100%)
Methylbenzoat	Negativer Alveolargradient	0(0%)	1(10%)	1(5%)
	VOC-Konstant	9(90%)	7(70%)	16(80%)
	Positiver Alveolargradient	1(10%)	2(20%)	3(15%)
Gesamt		10(100%)	10(100%)	20(100%)

Tabelle 9: Darstellung der absoluten Häufigkeiten der Alveolargradienten - Ketone

Keton		**Gruppe**		Gesamt
		Probandinnen	**Patientinnen**	
Methylethyketon	Negativer Alveolargradient	6(60%)	4(40%)	10(50%)
	VOC-Konstant	0(0%)	0(0%)	0(0%)
	Positiver Alveolargradient	4(40%)	6(60%)	10(50%)
Methylisobutylketon	Negativer Alveolargradient	0(0%)	2(20%)	2(10%)
	VOC-Konstant	0(0%)	2(20%)	2(10%)
	Positiver Alveolargradient	10(100%)	6(60%)	16(80%)
Cyclohexanon	Negativer Alveolargradient	0(0%)	2(20%)	2(10%)
	VOC-Konstant	0(0%)	0(0%)	0(0%)
	Positiver Alveolargradient	10(100%)	8(80%)	18(90%)
Benzophenon	Negativer Alveolargradient	0(0%)	1(10%)	1(5%)
	VOC-Konstant	10(100%)	8(80%)	18(90%)
	Positiver Alveolargradient	0(0%)	1(10%)	1(5%)
Gesamt		10(100%)	10(100%)	20(100%)

Tabelle 10: Darstellung der absoluten Häufigkeiten der Alveolargradienten – Alkohole und Aldehyde

Alkohol+Aldehyd		Gruppe		Gesamt
		Probandinnen	Patientinnen	
Isobutanol	Negativer Alveolargradient	4(40%)	0(0%)	4(20%)
	VOC-Konstant	4(40%)	10(100%)	14(70%)
	Positiver Alveolargradient	2(20%)	0(00%)	10 (50%)
n-Butanol	Negativer Alveolargradient	1(10%)	2(20%)	3(15%)
	VOC-Konstant	3(30%)	0(0%)	3(15%)
	Positiver Alveolargradient	6(60%)	8(80%)	14(70%)
2-Ethyl-1-hexanol	Negativer Alveolargradient	1(10%)	1(10%)	2(10%)
	VOC-Konstant	4(40%)	0(0%)	4(20%)
	Positiver Alveolargradient	5(50%)	9(90%)	14(70%)
Butanal	Negativer Alveolargradient	6(60%)	1(10%)	7(35%)
	VOC-Konstant	0(0%)	2(20%)	2(10%)
	Positiver Alveolargradient	4(40%)	7(70%)	11(55%)
Pentanal	Negativer Alveolargradient	3(30%)	1(10%)	4(20%)
	VOC-Konstant	2(20%)	2(20%)	4(20%)
	Positiver Alveolargradient	5(50%)	7(70%)	12(60%)
Hexanal	Negativer Alveolargradient	0(0%)	1(10%)	1(5%)
	VOC-Konstant	1(10%)	0(0%)	1(5%)
	Positiver Alveolargradient	9(90%)	9(90%)	18(90%)
Heptanal	Negativer Alveolargradient	0(0%)	1(10%)	1(5%)
	VOC-Konstant	0(0%)	0(0%)	0(0%)
	Positiver Alveolargradient	10(100%)	9(90%)	19(95%)
Octanal	Negativer Alveolargradient	1(10%)	1(10%)	2(10%)
	VOC-Konstant	3(30%)	0(0%)	3(15%)
	Positiver Alveolargradient	6(60%)	9(90%)	15(75%)
Nonanal	Negativer Alveolargradient	3(30%)	1(10%)	4(20%)
	VOC-Konstant	1(10%)	0(0%)	1(5%)
	Positiver Alveolargradient	6(60%)	9(90%)	15(75%)
Decanal	Negativer Alveolargradient	5(50%)	2(20%)	7(35%)
	VOC-Konstant	0(0%)	1(10%)	1(5%)
	Positiver Alveolargradient	5(50%)	7(70%)	12(60%)
Benzaldehyd	Negativer Alveolargradient	1(10%)	3(30%)	4(20%)
	VOC-Konstant	6(60%)	3(30%)	9(45%)
	Positiver Alveolargradient	3(30%)	4(40%)	7(35%)
Gesamt		10(100%)	10(100%)	20(100%)

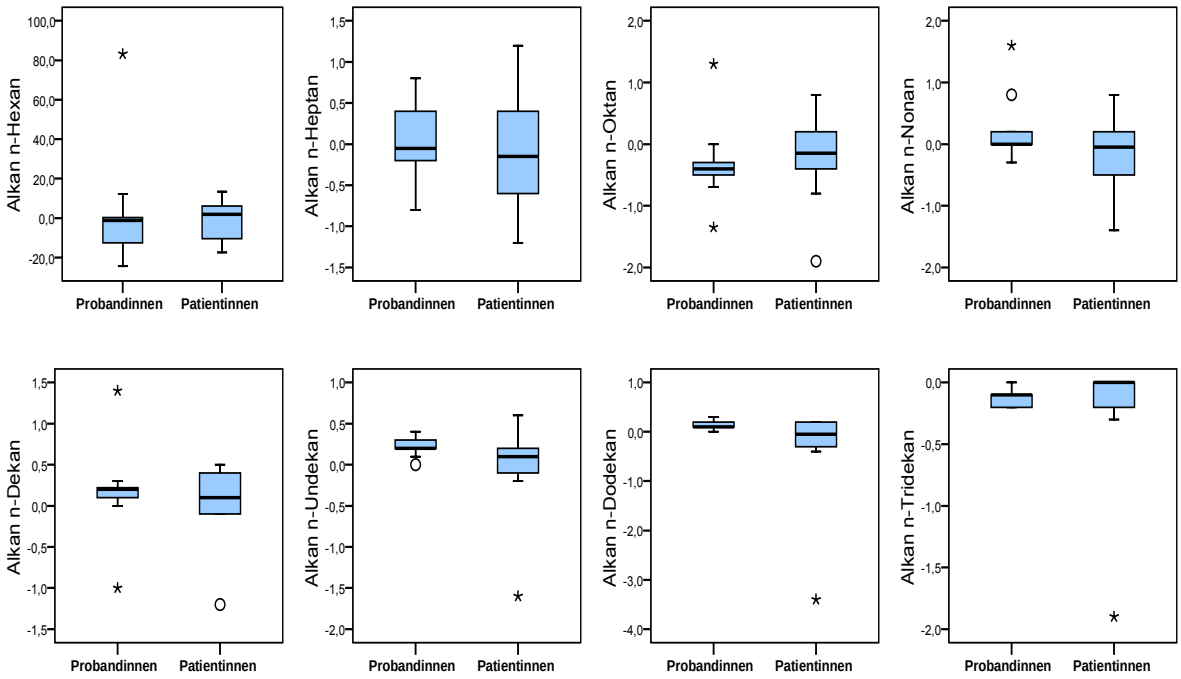
9.2 Quantitative Analyse

Zur besseren Übersichtlichkeit sind die Ergebnisse der deskriptiven Analysen in den Tabellen 11-20 und in den graphischen Box-Blots der jeweiligen Stoffklasse veranschaulicht. Die Angabe der Ergebnisse erfolgt in Mikrogramm Substanz pro Kubikmeter Luft (µg/m³).

Tabelle 11: Verteilung der Alkankohlenwasserstoffe

Gruppe	Alkan	n	Mittelwert [µg/m³]	Standard-abweichung [µg/m³]	Minimum [µg/m³]	Maximum [µg/m³]
Probandinnen	n-Hexan	10	2,685	30,3859	-24,4	83,2
	n-Heptan	10	0,000	0,5292	-0,8	0,8
	n-Oktan	10	-0,315	0,6692	-1,4	1,3
	n-Nonan	10	0,220	0,5633	-0,3	1,6
	n-Dekan	10	0,182	0,5713	-1,0	1,4
	n-Undekan	10	0,230	0,1252	0,0	0,4
	n-Dodekan	10	0,130	0,1059	0,0	0,3
	n-Tridekan	10	-0,120	0,0632	-0,2	0,0
	n-Tetradekan	10	-0,170	0,7587	-1,5	0,6
	n-Pentadekan	10	-0,060	0,1955	-0,5	0,2
	n-Hexadekan	10	-0,110	0,3381	-0,8	0,2
	n-Heptadekan	10	-0,040	0,0843	-0,2	0,0
	n-Oktadekan	10	0,140	0,1713	-0,1	0,5
	n-Nonadekan	10	0,440	1,7665	-0,8	5,4
	Eicosan	10	0,460	1,5269	-0,2	4,8
	2-Methylpentan	10	-0,550	2,7505	-3,9	6,3
	3-Methylpentan	10	2,160	6,5162	-3,5	17,9
	Methylcyclopentan	10	9,490	15,7500	-2,0	39,3
	Cyclohexan	10	0,180	6,1405	-6,5	15,4
	2-Methylhexan	10	0,100	0,7513	-1,2	1,7
	3-Methylhexan	10	0,210	0,4748	-0,4	1,4
	Isooctan	10	0,180	0,7569	-1,3	1,3
	Methylcyclohexan	10	0,060	0,5232	-1,0	1,0
	2,3 Dimethylheptan	10	0,035	0,0669	0,0	0,2
	2,2,4,6,6-Pentamethylheptan	10	0,200	0,1054	0,0	0,4
	2,2,4,4,6,8,8-Heptamethylnonan	10	-0,080	0,1135	-0,3	0,1
Patientinnen	n-Hexan	10	-0,225	9,8126	-17,4	13,4
	n-Heptan	10	-0,110	0,7078	-1,2	1,2
	n-Oktan	10	-0,210	0,7490	-1,9	0,8
	n-Nonan	10	-0,110	0,6674	-1,4	0,8
	n-Dekan	10	0,030	0,4809	-1,2	0,5
	n-Undekan	10	-0,050	0,5855	-1,6	0,6
	n-Dodekan	10	-0,360	1,0885	-3,4	0,2

	n-Tridekan	10	-0,250	0,5893	-1,9	0,0
	n-Tetradekan	10	-1,900	3,3688	-10,6	1,3
	n-Pentadekan	10	-0,370	0,5187	-1,7	0,1
	n-Hexadekan	10	-0,810	1,1513	-3,6	0,3
	n-Heptadekan	10	-0,040	0,3098	-0,8	0,3
	n-Oktadekan	10	8,900	27,9690	-0,3	88,5
	n-Nonadekan	10	0,000	0,4110	-0,6	0,8
	Eicosan	10	-0,025	0,1439	-0,2	0,3
	2-Methylpentan	10	-1,380	2,0477	-4,3	1,7
	3-Methylpentan	10	0,250	2,9934	-3,8	6,9
	Methylcyclopentan	10	8,060	14,0709	-9,7	40,5
	Cyclohexan	10	0,330	2,4896	-4,0	3,9
	2-Methylhexan	10	-0,520	0,7811	-1,5	0,6
	3-Methylhexan	10	-0,350	0,5563	-1,5	0,2
	Isooctan	10	-0,510	0,8412	-1,7	0,4
	Methylcyclohexan	10	-0,110	0,9207	-1,8	1,0
	2,3 Dimethylheptan	10	0,030	0,1033	-0,1	0,2
	2,2,4,6,6-Pentamethylheptan	10	0,130	0,2791	-0,6	0,4
	2,2,4,4,6,8,8-Heptamethylnonan	10	-0,210	0,4677	-1,5	0,1



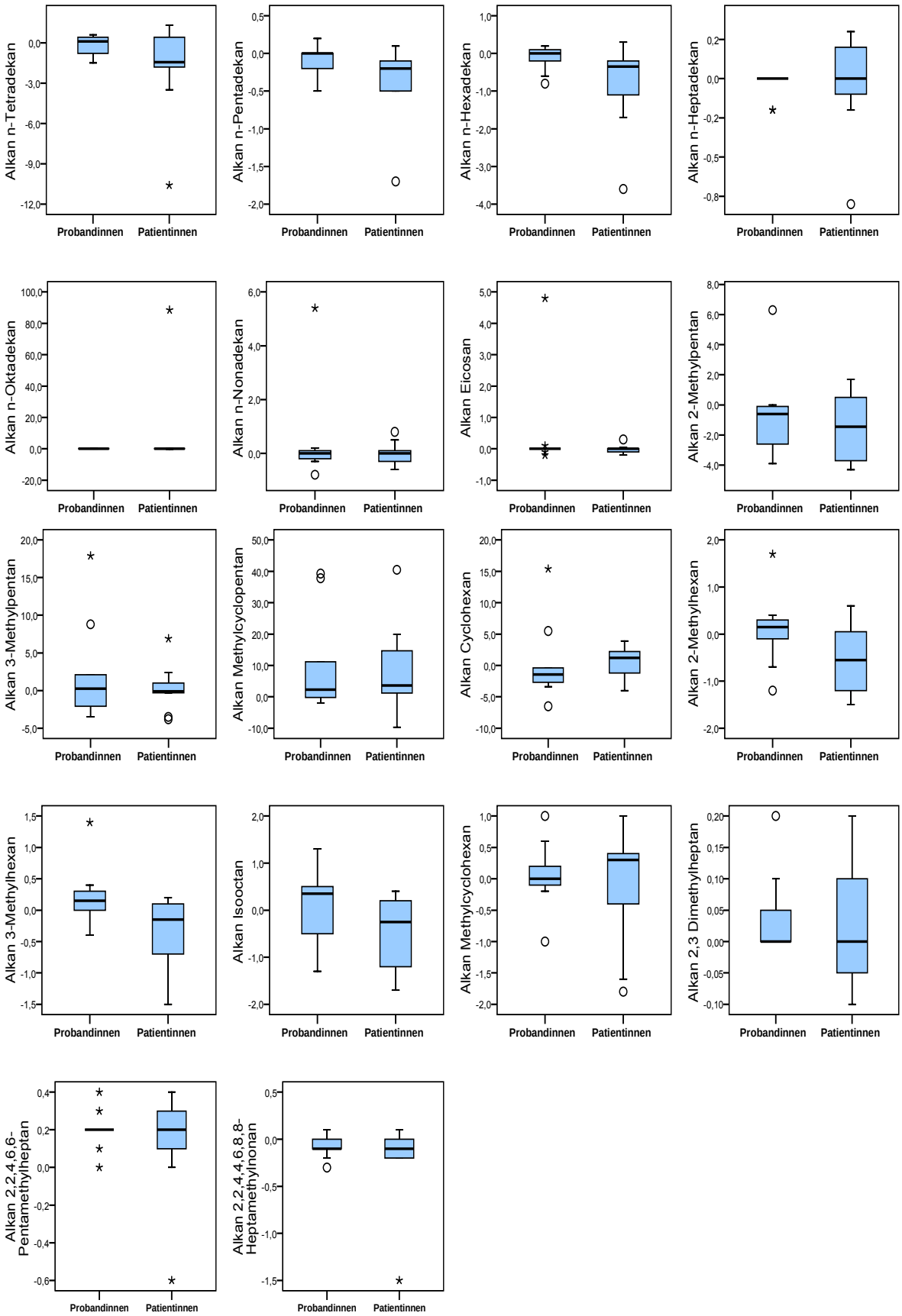

Alkan n-Tetradekan
Alkan n-Pentadekan
Alkan n-Hexadekan
Alkan n-Heptadekan
Alkan n-Oktadekan
Alkan n-Nonadekan
Alkan Eicosan
Alkan 2-Methylpentan
Alkan 3-Methylpentan
Alkan Methylcyclopentan
Alkan Cyclohexan
Alkan 2-Methylhexan
Alkan 3-Methylhexan
Alkan Isooctan
Alkan Methylcyclohexan
Alkan 2,3 Dimethylheptan
Alkan 2,2,4,6,6-Pentamethylheptan
Alkan 2,2,4,4,6,8,8-Heptamethylnonan
Probandinnen
Patientinnen

Tabelle 12: Verteilung der Alkenkohlenwasserstoffe

Gruppe	Alken	n	Mittelwert [µg/m³]	Standard-abweichung [µg/m³]	Minimum [µg/m³]	Maximum [µg/m³]
Probandinnen	Hepten	10	0,090	0,2331	-0,2	0,5
	Octen	10	-0,605	0,8261	-2,2	0,0
	Nonen	10	-0,160	0,4115	-1,3	0,0
	Decen	10	0,145	0,1707	-0,1	0,4
	Undecen	10	-0,060	0,1075	-0,2	0,1
	Dodecen	10	-0,010	0,1853	-0,5	0,2
	Tridecen	10	0,030	0,1874	-0,2	0,5
Patientinnen	Hepten	10	0,060	0,1776	-0,1	0,5
	Octen	10	-0,060	1,5987	-1,5	2,6
	Nonen	10	0,490	1,6038	-1,3	3,4
	Decen	10	-0,065	0,2473	-0,4	0,3
	Undecen	10	-0,040	0,1350	-0,3	0,2
	Dodecen	10	-0,020	0,1619	-0,4	0,2
	Tridecen	10	0,100	0,3464	-0,4	0,7

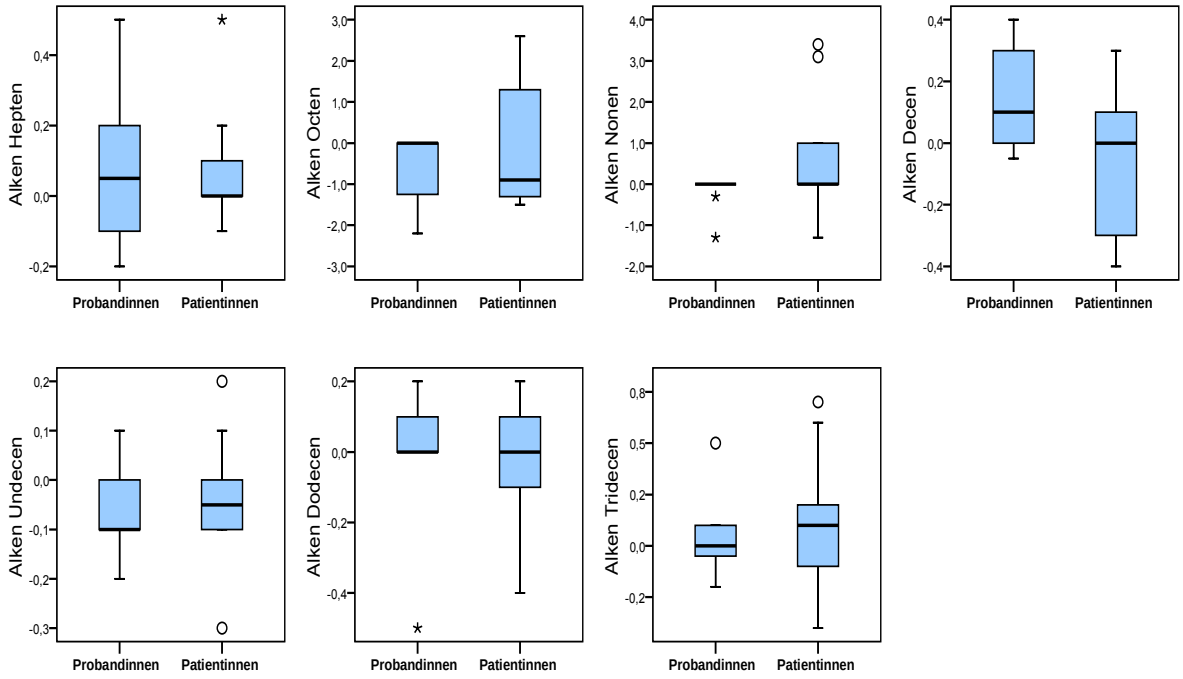


Tabelle 13: Verteilung der Ketone

Gruppe	Keton	n	Mittelwert [µg/m³]	Standard-abweichung [µg/m³]	Minimum [µg/m³]	Maximum [µg/m³]
Probandinnen	Methylethyketon	10	-5,480	9,3968	-18,3	7,6
	Methylisobutylketon	10	0,250	0,1080	0,1	0,4
	Cyclohexanon	10	1,070	0,8314	0,3	2,4

	Benzophenon	10	0,000	0,0000	0,0	0,0
Patientinnen	Methylethyketon	10	-1,210	11,5632	-27,3	18,4
	Methylisobutylketon	10	-1,450	5,1866	-16,2	0,4
	Cyclohexanon	10	-27,730	92,2351	-290,2	2,6
	Benzophenon	10	0,000	0,0236	-0,1	0,1

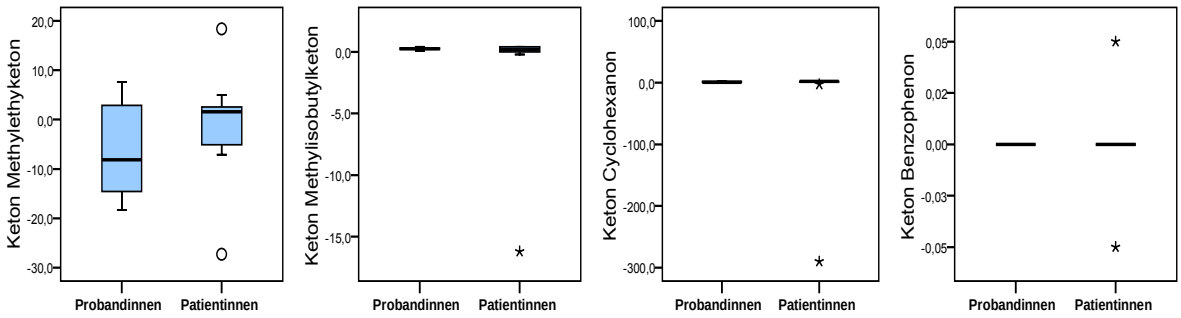


Tabelle 14: Verteilung der Halogenkohlenwasserstoffe

Gruppe	Halogenkohlen-wasserstoff	n	Mittelwert [µg/m³]	Standard-abweichung [µg/m³]	Minimum [µg/m³]	Maximum [µg/m³]
Probandinnen	cis-1,2-Dichlorethen	10	0,005	0,0158	0,0	0,1
	Trichlormethan	10	0,090	0,2331	-0,1	0,5
	1,1,1-Trichlorethan	10	-0,020	0,0632	-0,1	0,1
	1,2-Dichlorethan	10	-0,030	0,0483	-0,1	0,0
	Tetrachlormethan	10	-0,080	0,1033	-0,2	0,1
	Trichchlorethylen	10	0,050	0,1179	-0,1	0,3
	Perchlorethylen	10	0,060	0,1075	0,0	0,3
	Chlorbenzol	10	0,000	0,0000	0,0	0,0
	1,3-Dichlorbenzol	10	0,430	0,3199	0,1	0,9
	1,4-Dichlorbenzol	10	0,025	0,0264	0,0	0,1
	1,2-Dichlorbenzol	10	0,000	0,0000	0,0	0,0
Patientinnen	cis-1,2-Dichlorethen	10	-0,005	0,0158	-0,1	0,0
	Trichlormethan	10	0,040	0,4835	-1,1	0,7
	1,1,1-Trichlorethan	10	-0,060	0,0966	-0,2	0,1
	1,2-Dichlorethan	10	-0,045	0,1343	-0,3	0,1
	Tetrachlormethan	10	-0,135	0,7394	-1,1	1,7
	Trichchlorethylen	10	0,870	1,1096	-0,1	2,9
	Perchlorethylen	10	0,110	0,2514	-0,3	0,4
	Chlorbenzol	10	0,010	0,0211	0,0	0,1
	1,3-Dichlorbenzol	10	0,665	1,0499	-1,6	2,2
	1,4-Dichlorbenzol	10	0,025	0,0354	0,0	0,1
	1,2-Dichlorbenzol	10	0,000	0,0000	0,0	0,0

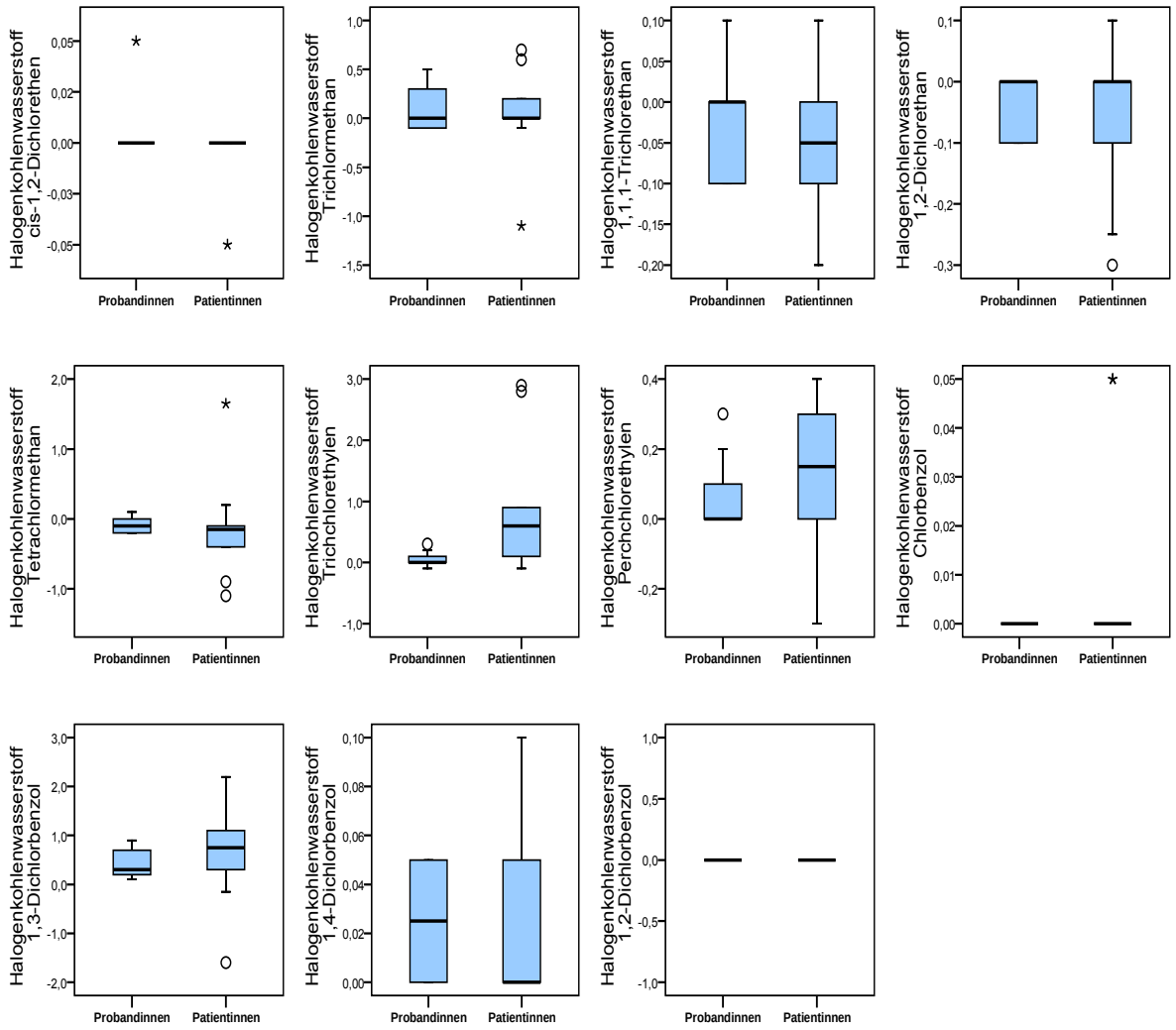


Tabelle 15: Verteilung der Ester einwertiger Alkohole

Gruppe	Ester einwertiger Alkohole	n	Mittelwert [µg/m³]	Standardabweichung [µg/m³]	Minimum [µg/m³]	Maximum [µg/m³]
Probandinnen	Vinylacetat	10	-0,185	0,4429	-1,1	0,3
	Ethylacetat	10	1,590	1,4731	0,1	4,6
	Isopropylacetat	10	0,000	0,0000	0,0	0,0
	n-Propylacetat	10	0,810	1,4539	-0,3	3,5
	Methacrylsäuremethylester	10	0,200	0,3432	-0,2	1,1
	Butylformiat	10	-0,010	0,0907	-0,1	0,2
	Isobutylacetat	10	0,120	0,0789	0,0	0,3
	n-Butylacetat	10	1,310	0,5626	0,2	2,0
	Methylbenzoat	10	0,010	0,0316	0,0	0,1
Patientinnen	Vinylacetat	10	-1,555	4,7942	-15,0	1,5
	Ethylacetat	10	0,930	0,8367	-0,4	2,4
	Isopropylacetat	10	0,000	0,0000	0,0	0,0
	n-Propylacetat	10	0,490	1,7256	-0,6	5,4
	Methacrylsäuremethylester	10	0,490	0,6297	0,0	2,1

	Butylformiat	10	0,065	0,1107	-0,2	0,3
	Isobutylacetat	10	0,090	0,1792	-0,3	0,4
	n-Butylacetat	10	0,940	0,8771	-1,2	2,1
	Methylbenzoat	10	0,005	0,0685	-0,2	0,1

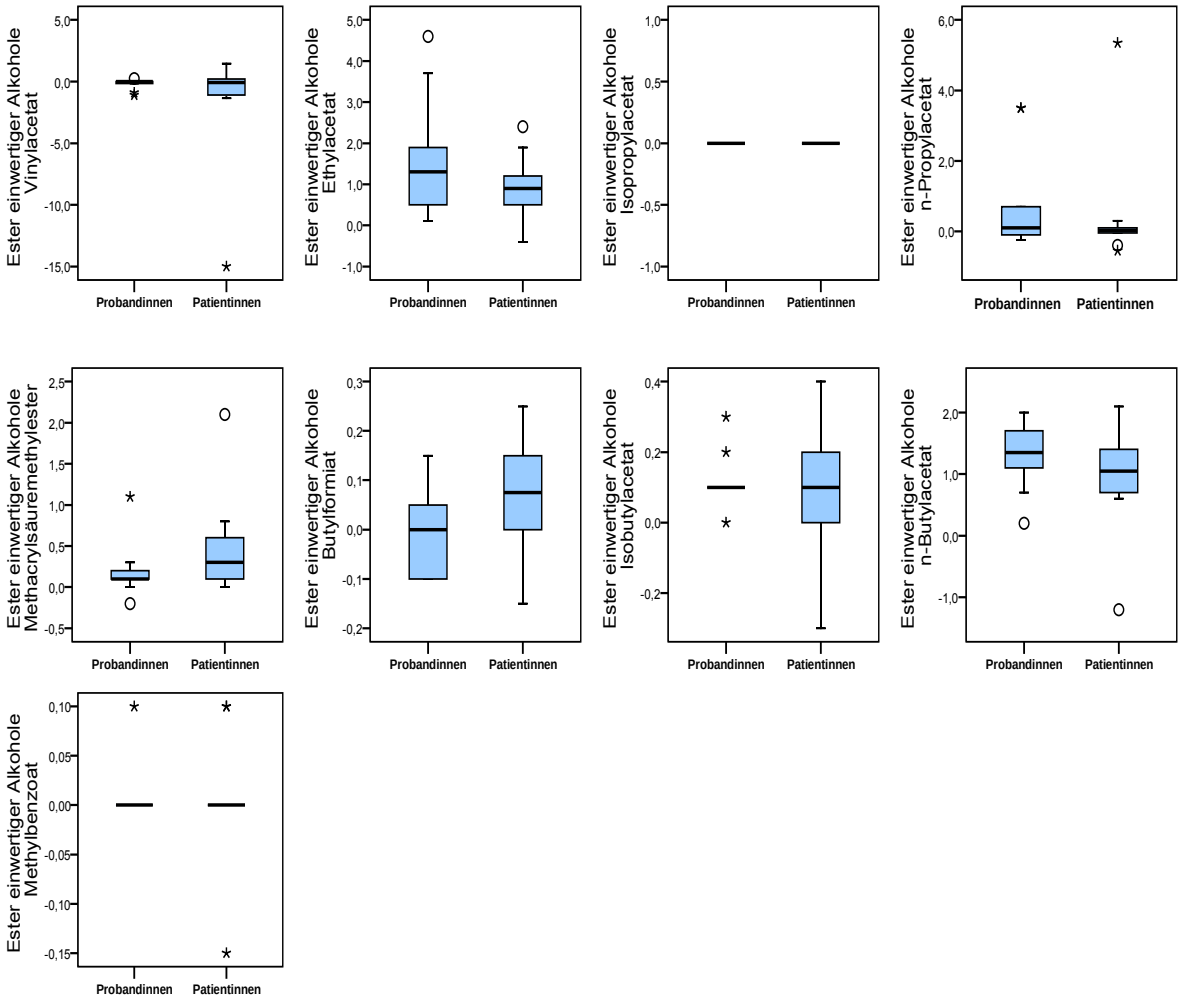


Tabelle 16: Verteilung der Ungesättigten Kohlenwasserstoffe

Gruppe	Ungesättigter Kohlenwasserstoff	n	Mittelwert [µg/m³]	Standard-abweichung [µg/m³]	Minimum [µg/m³]	Maximum [µg/m³]
Probandinnen	4-Vinylcyclohexen	10	0,010	0,0211	0,0	0,1
	trimeres Isobuten	10	0,040	0,0699	0,0	0,2
	Linalool	10	-0,020	0,1476	-0,2	0,2
	4-Phenylcyclohexen	10	0,000	0,0000	0,0	0,0
Patientinnen	4-Vinylcyclohexen	10	0,000	0,0000	0,0	0,0
	trimeres Isobuten	10	,000	0,0943	-0,2	0,1
	Linalool	10	-0,610	2,2467	-7,0	0,2
	4-Phenylcyclohexen	10	0,000	0,0000	0,0	0,0

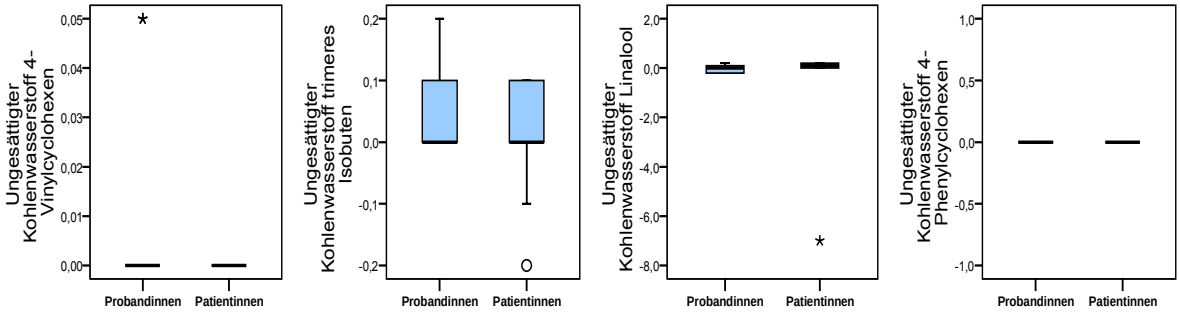


Tabelle 17: Verteilung der Terpenkohlenwasserstoffe

Gruppe	Terpen	n	Mittelwert [µg/m³]	Standard-abweichung [µg/m³]	Minimum [µg/m³]	Maximum [µg/m³]
Probandinnen	a-Pinen	10	1,110	1,9244	-0,4	5,4
	b-Pinen	10	0,120	0,2658	-0,3	0,6
	Delta-3-Caren	10	0,620	0,6909	-0,1	2,0
	a-Terpinen	10	0,000	0,0000	0,0	0,0
	Limonen	10	1,190	1,1532	-0,7	3,7
	Eucalyptol	10	0,450	0,5855	-0,6	1,1
	Campher	10	0,080	0,0632	0,0	0,2
	Borneol	10	0,090	0,2470	-0,4	0,6
	Verbenon	10	0,050	0,0972	-0,1	0,2
	Vanillin	10	0,000	0,0000	0,0	0,0
	Isolongifolen	10	0,015	0,0474	-0,1	0,1
	Longifolen	10	0,020	0,2700	-0,6	0,3
	Caryophyllen	10	0,070	0,0483	0,0	0,1
Patientinnen	a-Pinen	10	0,650	1,7456	-2,9	3,5
	b-Pinen	10	0,100	0,3018	-0,6	0,5
	Delta-3-Caren	10	0,600	0,9043	-1,4	1,9
	a-Terpinen	10	0,000	0,0000	0,0	0,0
	Limonen	10	0,520	1,3847	-2,7	3,0
	Eucalyptol	10	0,650	1,1227	-2,3	1,8
	Campher	10	0,070	0,1829	-0,4	0,3
	Borneol	10	0,030	0,2595	-0,4	0,6
	Verbenon	10	0,060	0,2066	-0,5	0,2
	Vanillin	10	-0,055	0,0832	-0,3	0,0
	Isolongifolen	10	0,020	0,0587	-0,1	0,1
	Longifolen	10	-0,510	1,3042	-4,1	0,5
	Caryophyllen	10	-1,230	2,5430	-6,1	0,2

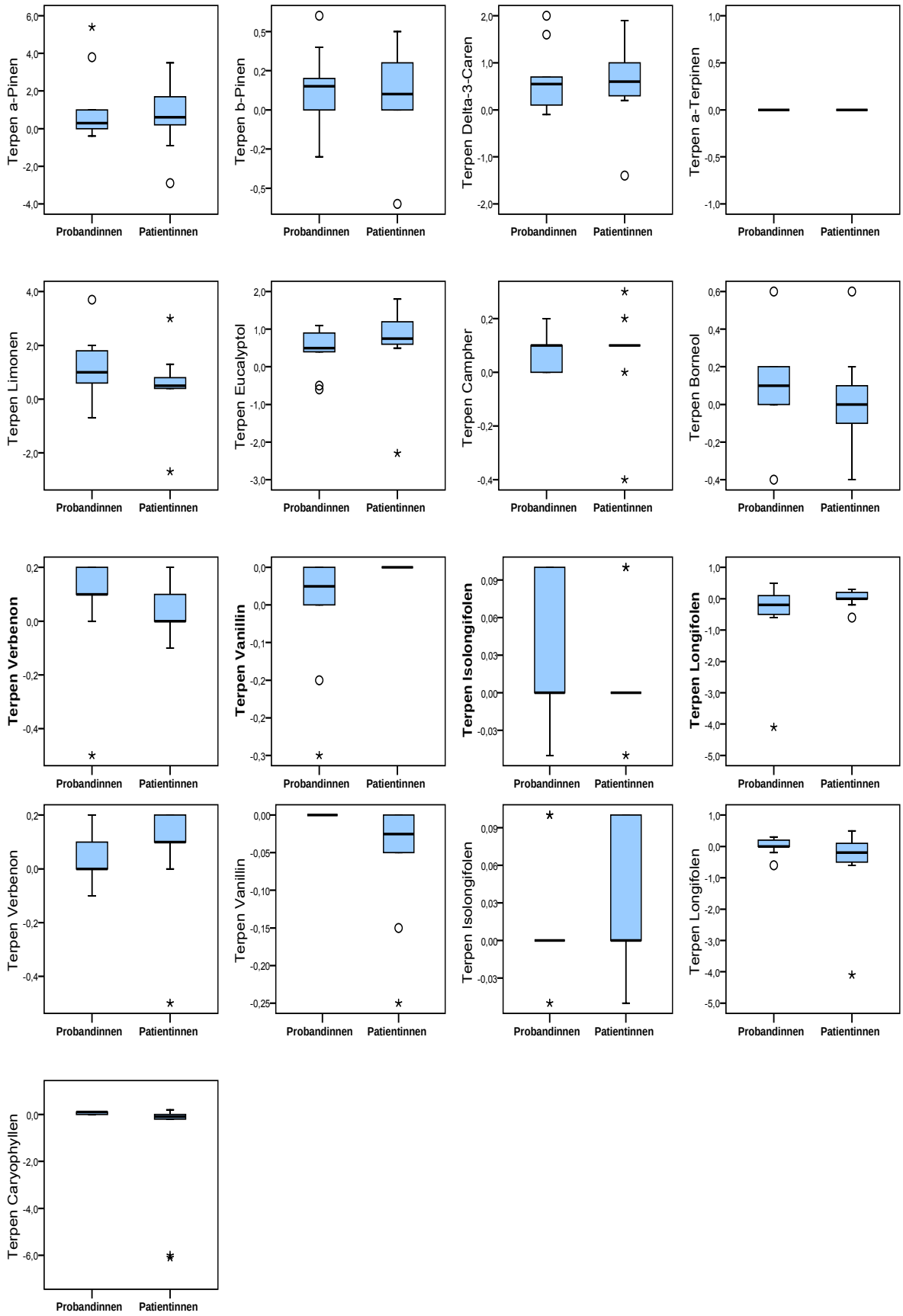

Terpen a-Pinen
Terpen b-Pinen
Terpen Delta-3-Caren
Terpen a-Terpinen
Terpen Limonen
Terpen Eucalyptol
Terpen Campher
Terpen Borneol
Terpen Verbenon
Terpen Vanillin
Terpen Isolongifolen
Terpen Longifolen
Terpen Verbenon
Terpen Vanillin
Terpen Isolongifolen
Terpen Longifolen
Terpen Caryophyllen
Probandinnen
Patientinnen

Tabelle 18: Verteilung der Siloxane

Gruppe	Siloxan	n	Mittelwert [µg/m³]	Standard-abweichung [µg/m³]	Minimum [µg/m³]	Maximum [µg/m³]
Probandinnen	Hexamethylcyclotrisiloxan	10	7,750	5,1870	1,6	17,0
	Octamethylcyclotetrasiloxan	10	2,760	2,7889	-1,7	9,1
	Decamethylcyclopentasiloxan	10	-47,210	50,7301	-175,7	-1,9
Patientinnen	Hexamethylcyclotrisiloxan	10	10,780	9,5644	-1,5	27,3
	Octamethylcyclotetrasiloxan	10	3,050	3,5230	-3,0	10,3
	Decamethylcyclopentasiloxan	10	-29,320	67,7330	-205,2	16,4

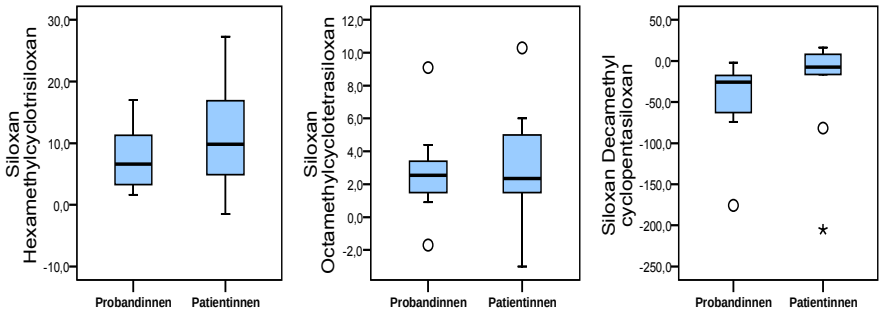


Tabelle 19: Verteilung der Alkohole

Gruppe	Alkohol	n	Mittelwert [µg/m³]	Standard-abweichung [µg/m³]	Minimum [µg/m³]	Maximum [µg/m³]
Probandinnen	Isobutanol	10	-0,310	1,1900	-1,5	2,0
	n-Butanol	10	2,000	2,4037	-1,0	6,0
	2-Ethyl-1-hexanol	10	1,000	1,4142	-1,0	3,0
	Butanal	10	-0,700	2,2632	-3,0	3,0
	Pentanal	10	1,500	2,8771	-1,0	8,0
	Hexanal	10	15,500	20,8819	0,0	63,0
	Heptanal	10	3,300	3,0930	1,0	9,0
	Octanal	10	2,100	2,6437	-1,0	6,0
	Nonanal	10	2,800	5,2239	-3,0	12,0
	Decanal	10	-0,100	2,2336	-3,0	3,0
	Benzaldehyd	10	0,200	0,6325	-1,0	1,0
Patientinnen	Isobutanol	10	0,000	0,0000	0,0	0,0
	n-Butanol	10	2,800	2,9740	-2,0	7,0
	2-Ethyl-1-hexanol	10	1,100	2,2336	-5,0	3,0
	Butanal	10	1,600	2,9515	-4,0	7,0
	Pentanal	10	3,200	3,2592	-1,0	9,0
	Hexanal	10	12,200	10,6542	-8,0	30,0
	Heptanal	10	4,100	4,1486	-6,0	8,0
	Octanal	10	5,700	6,7503	-10,0	14,0
	Nonanal	10	8,400	24,6270	-57,0	32,0

	Decanal	10	3,700	11,1560	-23,0	17,0
	Benzaldehyd	10	0,100	1,1972	-2,0	2,0

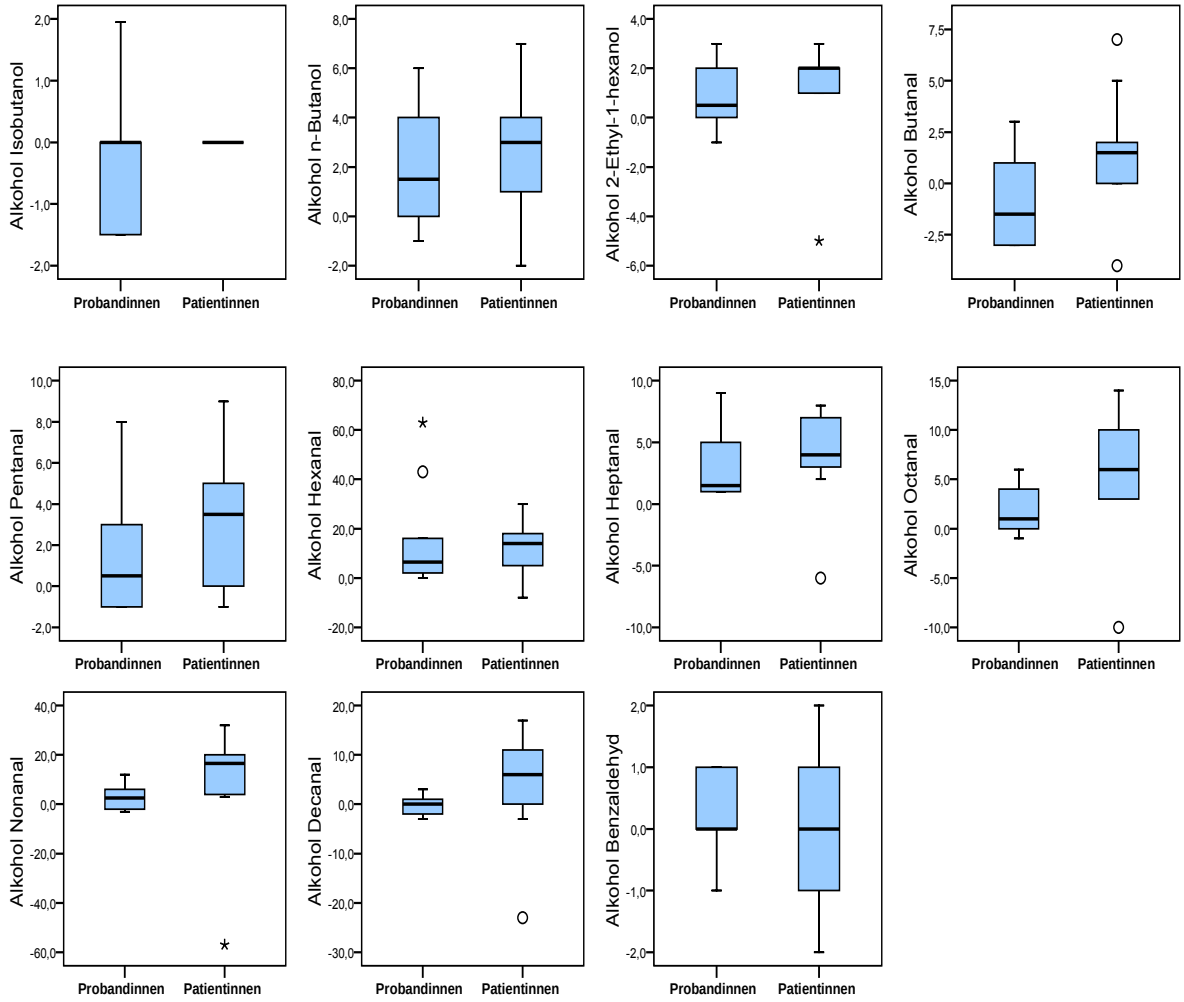
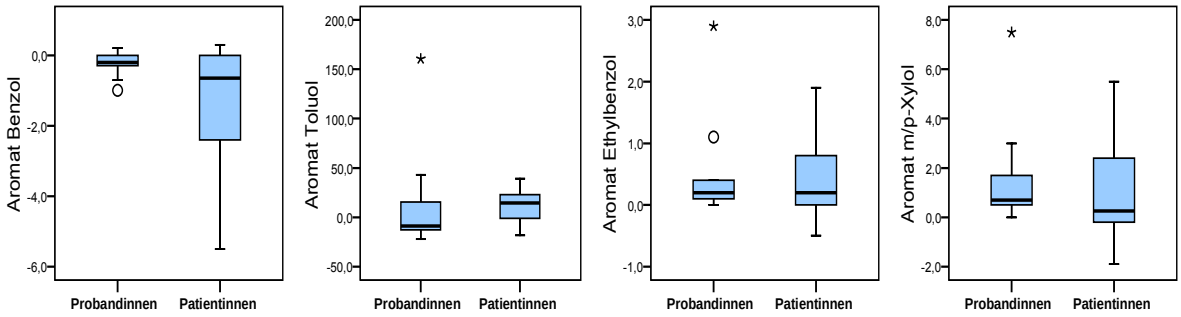
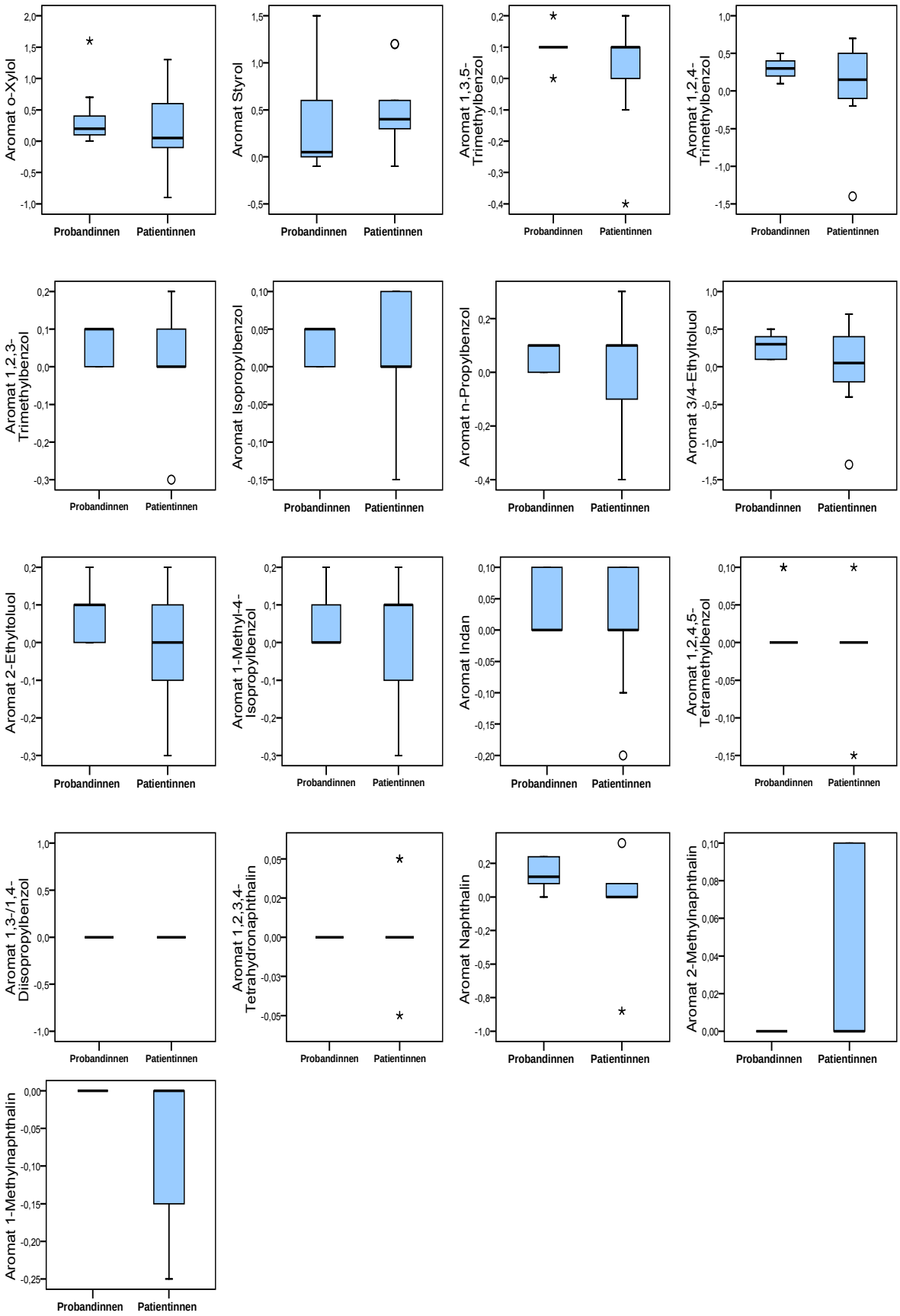


Tabelle 20: Verteilung der Aromatischen Kohlenwasserstoffe

Gruppe	Aromat	n	Mittelwert [µg/m³]	Standard-abweichung [µg/m³]	Minimum [µg/m³]	Maximum [µg/m³]
Probandinnen	Benzol	10	-0,250	0,3719	-1,0	0,2
	Toluol	10	13,300	55,1329	-22,1	160,6
	Ethylbenzol	10	0,550	0,8810	0,0	2,9
	m/p-Xylol	10	1,580	2,2513	0,0	7,5
	o-Xylol	10	0,370	0,4739	0,0	1,6
	Styrol	10	0,290	0,5087	-0,1	1,5
	1,3,5-Trimethylbenzol	10	0,100	0,0471	0,0	0,2
	1,2,4-Trimethylbenzol	10	0,290	0,1197	0,1	0,5
	1,2,3-Trimethylbenzol	10	0,070	0,0483	0,0	0,1
	Isopropylbenzol	10	0,035	0,0242	0,0	0,1
	n-Propylbenzol	10	0,060	0,0516	0,0	0,1

	3/4-Ethyltoluol	10	0,280	0,1549	0,1	0,5
	2-Ethyltoluol	10	0,080	0,0632	0,0	0,2
	1-Methyl-4-Isopropylbenzol	10	0,050	0,0707	0,0	0,2
	Indan	10	0,030	0,0483	0,0	0,1
	1,2,4,5-Tetramethylbenzol	10	0,020	0,0422	0,0	0,1
	1,3-/1,4-Diisopropylbenzol	10	0,000	0,0000	0,0	0,0
	1,2,3,4-Tetrahydronaphthalin	10	0,000	0,0000	0,0	0,0
	Naphthalin	10	0,170	0,1059	0,0	0,3
	2-Methylnaphthalin	10	0,000	0,0000	0,0	0,0
	1-Methylnaphthalin	10	0,000	0,0000	0,0	0,0
Patientinnen	Benzol	10	-1,370	1,7664	-5,5	0,3
	Toluol	10	12,100	17,0980	-18,3	39,2
	Ethylbenzol	10	0,410	0,7031	-0,5	1,9
	m/p-Xylol	10	1,060	2,1246	-1,9	5,5
	o-Xylol	10	0,200	0,6128	-0,9	1,3
	Styrol	10	0,500	0,4137	-0,1	1,2
	1,3,5-Trimethylbenzol	10	0,020	0,1687	-0,4	0,2
	1,2,4-Trimethylbenzol	10	0,060	0,5948	-1,4	0,7
	1,2,3-Trimethylbenzol	10	0,030	0,1418	-0,3	0,2
	Isopropylbenzol	10	0,020	0,0753	-0,2	0,1
	n-Propylbenzol	10	0,010	0,1969	-0,4	0,3
	3/4-Ethyltoluol	10	0,010	0,5666	-1,3	0,7
	2-Ethyltoluol	10	0,000	0,1563	-0,3	0,2
	1-Methyl-4-Isopropylbenzol	10	0,010	0,1524	-0,3	0,2
	Indan	10	0,000	0,0943	-0,2	0,1
	1,2,4,5-Tetramethylbenzol	10	-0,005	0,0599	-0,2	0,1
	1,3-/1,4-Diisopropylbenzol	10	0,000	0,0000	0,0	0,0
	1,2,3,4-Tetrahydronaphthalin	10	0,005	0,0284	-0,1	0,1
	Naphthalin	10	-0,025	0,3156	-0,9	0,4
	2-Methylnaphthalin	10	0,030	0,0483	0,0	0,1
	1-Methylnaphthalin	10	-0,055	0,0926	-0,3	0,0




Aromat o-Xylol
Aromat Styrol
Aromat 1,3,5-Trimethylbenzol
Aromat 1,2,4-Trimethylbenzol
Aromat 1,2,3-Trimethylbenzol
Aromat Isopropylbenzol
Aromat n-Propylbenzol
Aromat 3/4-Ethyltoluol
Aromat 2-Ethyltoluol
Aromat 1-Methyl-4-Isopropylbenzol
Aromat Indan
Aromat 1,2,4,5-Tetramethylbenzol
Aromat 1,3-/1,4-Diisopropylbenzol
Aromat 1,2,3,4-Tetrahydronaphthalin
Aromat Naphthalin
Aromat 2-Methylnaphthalin
Aromat 1-Methylnaphthalin
Probandinnen
Patientinnen

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Achim Schneider für die Überlassung des Themas, seinem Interesse am Fortgang dieser Arbeit und für seine konstruktiven Vorschläge zur Verbesserung der Arbeit, welche mir besonders in der Endphase eine große Hilfe und Motivation waren.

Den Ärztinnen und Schwestern der Berliner Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe, Charité Campus Mitte, danke ich für Ihre Mitarbeit und freundliche Unterstützung in der Rekrutierung der Studienteilnehmerinnen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Mandy Mangler. Die Arbeit an der vorliegenden Dissertation nahm ihren Anfang mit einer Hausarbeit, die ich im August 2006 mit Ihrer Betreuung anfertigte. Einige Teile dieser Studie haben Eingang in die Dissertation gefunden. Mit konstruktiver Kritik, Hilfsbereitschaft und Geduld hat sie sich jederzeit meiner fachlichen Probleme angenommen und mir über alle Phasen des Zweifels hinweggeholfen. Durch ihre engagierte Betreuung und ihre stetige Bereitschaft zur Diskussion stand sie mir mit ihrer ehrlichen und aufmunternden Art zur Seite und trug so wesentlich zur Arbeit bei.

Für die Aufstellung der Datensätze und die Beantwortung vieler technischer Fragen danke ich Herrn Dieter Marchl und seinen Mitarbeitern aus dem Analyselabor Berlin sehr herzlich.

Für die Hilfe und Unterstützung in der Formatierung der Arbeit möchte ich meinem Mann Alexander Höner besonders danken. Er war mir in jeder Phase der Bearbeitung eine große Stütze.

Ich bedanke mich bei meinen Eltern, die mir das Studium ermöglichen und mir mit ihrer finanziellen und moralischen Unterstützung in allen Phasen dieser Arbeit beistanden. Ihr Verständnis des Arztberufes und dessen persönliche Umsetzung sind mir Inspiration und Vorbild.

Meiner Großmutter danke ich für ihre gedankliche Unterstützung, ihre aufmunternden Worte und die Durchsicht der Arbeit hinsichtlich Grammatik und sprachlicher Korrektur.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Cornelia Freitag-Höner, geboren in Berlin, an Eides Statt, dass die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Atemanalyse als Screeningmethode für das Mammakarzinom“ von mir selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Berlin, den 19.02.2009

Cornelia Freitag-Höner

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen
in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikation

Cornelia Freitag, Mandy Mangler, Malgorzata Lanowska, Dorothee Grund, Achim Schneider. Volatile organic compounds (VOCs) in der Atemluft zur Früherkennung des Mammakarzinoms. Senologie. Zeitschrift für Mammadiagnostik und- therapie 2007;3:P30;27. Jahrestag der Deutschen Gesellschaft für Senologie 2007.