

Aus der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin
des Universitätsklinikums Aachen – Medizinische Fakultät der Rheinisch-
Westfälischen Technischen Hochschule Aachen

DISSERTATION

Organische Spurengase in der Atemluft von Kindern und
Jugendlichen mit Mukoviszidose

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Johanna Maria Schmid

aus Krefeld

Gutachter: 1.: Priv.-Doz. Dr. med. M. Barker

2.: Prof. Dr. med. A. Schuster

3.: Prof. Dr. R. Koppmann

Datum der Promotion: 03.09.2010

Für meine Mutter, in Erinnerung,
und meinen Vater, in Dankbarkeit.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	4
1. Einleitung.....	5
1.1 Mukoviszidose	5
1.1.1 Pathophysiologie.....	5
1.1.2 Diagnose und Verlaufskontrolle.....	7
1.1.3 Therapie	8
1.1.4 Prognose	9
1.2 Organische Spurengase in der Atemluft	10
1.2.1 Mechanismus der Lipid-Peroxidation.....	10
1.2.2 Nachweis von Ethan und Pentan	12
1.2.3 Nachweis weiterer organischer Spurengase	12
1.2.4 Stickstoffmonoxid.....	13
1.3. Fragestellung.....	15
2. Methodik.....	16
2.1 Ort, Zeitpunkt, Voruntersuchungen	16
2.2 Probanden und Patienten.....	16
2.3 Lungenfunktion.....	18
2.3.1 Spirometrie	18
2.3.2 Messung des NO-Gehalts.....	20
2.4 Gewinnung der Atemprobe	20
2.5 Analyse der Atemproben	22
2.5.1 Gaschromatographische Trennung.....	22
2.5.2 Software-Auswertung	23
2.6 Methodische Vorversuche	25
2.6.1 Art und Lagerung des Probenbehälters.....	25
2.6.2 Wahl des Versuchsraumes	26
2.6.3. Konstanz der Atem- bzw. Raumluft.....	26
2.6.4 Chemische Substanzen	26

2.7 Statistische Auswertung.....	27
3. Ergebnisse	28
3.1 Vorversuche	28
3.1.1 Art und Lagerung des Probenbehälters.....	28
3.1.2 Wahl des Versuchsraumes	29
3.1.3 Konstanz der Atem- bzw. Raumluf.....	29
3.2 Durchführbarkeit und Akzeptanz des Messmanövers und der Vermessung	30
3.3 Daten der Atem- und Raumprobenanalyse	30
3.4 Daten der NO-Analyse.....	31
3.5 Einflussfaktoren	31
4. Diskussion	33
4.1 Flüchtige Spurengase	33
4.1.1 Pentan.....	33
4.1.2 Dimethylsulfid (DMS).....	36
4.1.3 2-Propanol.....	37
4.1.4 Weitere Kohlenwasserstoffe.....	38
4.1.5 Alkohole	40
4.1.6 Ketonkörper	40
4.1.7 Terpene	41
4.1.8 Stickstoffmonoxid (NO).....	41
4.2 Einflussfaktoren	42
4.2.1 Diabetes mellitus	42
4.2.2 Passivrauchen.....	43
4.2.3 Genetik.....	43
4.2.4 Nahrungsaufnahme.....	43
4.2.5 Körperliche Aktivität.....	44
4.3 Metabolismus flüchtiger Spurengase	44
4.3.1 Inhalation und Speicherung.....	45
4.3.2 Produktion	45
4.3.3 Abbau	46

4.4 Probenentnahme und –analyse.....	47
4.4.1 Atemmanöver	47
4.4.2 Probenbehälter	47
4.4.3 Analysesystem.....	48
4.5 Schlussfolgerung.....	50
5. Zusammenfassung.....	52
6. Literaturverzeichnis.....	54
7. Abbildungsverzeichnis	64
8. Tabellenverzeichnis.....	64
9. Anhang	65
Anhang 1: Fragebogen.....	65
Anhang 2: Antropodometrie der Testpersonen	67
Anhang 3: Gruppenspezifische Mittelwerte der Spurengase in Atem- und Raumluft.....	68
Anhang 4: VOC-Konzentrationen der Atemproben der Vergleichsgruppe, Angabe in ppb	69
Anhang 5: VOC-Konzentrationen der Atemproben der Patientengruppe, Angabe in ppb .	70
Anhang 6: Lebenslauf.....	71
Anhang 7: Publikationsliste	72
Anhang 8: Danksagung	73
Anhang 9: Selbständigkeitserklärung.....	74

Abkürzungsverzeichnis

ARDS	„acute respiratory distress syndrome“
BAL	Bronchoalveolarlavage
BMI	Body Mass Index
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CCl ₄	Tetrachlormethan
CF	Mukoviszidose (Cystische Fibrose)
CFTR	„cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“
COPD	chronisch-obstruktiven pulmonalen Erkrankungen
COS	Carbonylsulfid
CT	Computertomographie
CV	Variationskoeffizient („coefficient of variation“)
DMS	Dimethylsulfid
eNO	exhalierendes Stickstoffmonoxid
FEV ₁	expiratorische Einsekundenkapazität
FID	Flammenionisationsdetektor
FS	Fettsäure
FVC	forcierten Vitalkapazität
GC-System	Gaschromatographiesystem
i.v.	intravenös
ICAM-1	„inter-cellular adhesion molecule 1“
ICG	Institut für Chemie und Dynamik der Geosphäre
ID	Innendurchmesser
IL	Interleukin
LH	mehrfach ungesättigte Fettsäure
LOOH	Lipidperoxid
MEF ₂₅	maximale expiratorische Strömung bei 25% der Vitalkapazität
MEF ₅₀	maximale expiratorische Strömung bei 50% der Vitalkapazität
MFC	Massenfluss-Regler („mass flow controller“)
MS	Massenspektrometer
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
NSAR	nicht-steroidale Antirheumatika
PEP	„positive expiratory pressure“
PSA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PTR-MS	„transfer reaction-mass spectrometry“
R	Radikal
rhDNA I	Humane Desoxyribonuklease I
RWTH	Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule
SIFT-MS	„Selected Ion Flow Tube-Mass Spectrometry“
TDL	„Tunable Diode Laser“
TNF	Tumornekrosefaktor
UK	Universitätsklinikum
VOC	flüchtige organische Substanz („volatile organic compound“)
Δ[VOC]	alveolärer Gradient eines Spurengases

1. Einleitung

1.1 Mukoviszidose

Die Mukoviszidose oder auch Cystische Fibrose (CF) ist eine autosomal-rezessiv vererbare Multisystemerkrankung. Sie wurde erstmalig 1938 von D. Anderson als eigenständige Krankheit beschrieben, als „Zystische Fibrose des Pankreas“ [1]. Sie kommt in Europa mit einer Häufigkeit von ca. 1:2500 vor (mit unterschiedlicher Ausprägung zwischen ethnischen Gruppen) [2] und ist die häufigste letal endende Erbkrankheit.

1.1.1 Pathophysiologie

1989 konnte der zu Grunde liegende Gendefekt auf dem langen Arm des Chromosoms 7 identifiziert werden [3, 4]. Am häufigsten ist dabei die Mutation $\Delta F508$, darüber hinaus wurden bislang über 1600 weitere Mutationen beschrieben [5]. Der Defekt führt zu einem fehlerhaften Aufbau des Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR)-Proteins, das zum einen selbst als cAMP-regulierter Chloridkanal fungiert, zum anderen andere Membranionenkanäle reguliert. Die Störung des Wasser- und Elektrolyttransports beeinträchtigt besonders die Funktionen der exokrinen Drüsen im Organismus. Aus der erhöhten Viskosität des mukösen Sekretes resultiert eine Dyskrie, gefolgt von Entzündungsprozessen und Verlust der Organfunktion.

Betroffene Organsysteme sind besonders Pankreas, Kolon, Leber, Schweiß- und Keimdrüsen sowie Lunge. Der Defekt der exokrinen Pankreasfunktion führt zu Verdauungsstörung und somit zu Malnutrition. Über 40% der Patienten erkranken im Erwachsenenalter an CF-Diabetes mellitus durch Verlust der endokrinen Pankreasfunktion [6]. Im Gastrointestinaltrakt treten häufig Obstruktionen mit Invaginationen als Folge der fehlenden Verdünnung des Darminhaltes auf. Bei Neugeborenen kann dies zum Mekoniumileus führen, der in 5-10% der Fälle als erstes Symptom der Erkrankung auftritt. Die gestörte hepatische Sekretion kann zur Cholestase, zu Gallensteinen und zur biliären Leberzirrhose mit portaler Hypertension führen. Im Schweiß läßt sich typischerweise ein erhöhter Chloridgehalt nachweisen. An CF erkrankte Männer leiden zu 99% an Infertilität [7].

Wurde die Infektanfälligkeit der Lunge zunächst als Folge der Malnutrition angesehen, beschrieben DI SANT' AGNESE ET AL diese 1953 erstmals als unabhängigen Teil der Multisystemerkrankung [8]. Die Lungenbeteiligung hat einen zentralen Einfluss auf den Verlauf und die Schwere der Erkrankung, der Großteil der Patienten stirbt an ihren Folgen [9]. Der epitheliale CFTR-Kanal beeinflusst weitere Na^+ - und Cl^- -Ionenkanäle. Durch diesen veränderten Ionentransport, besonders durch die verminderte Sekretion von Cl^- (passiv gefolgt von H_2O), verringert sich das Volumen des Lungensekrets [10]. Es kommt zur erhöhten Viskosität, Verlegung der Bronchiolen und Bronchien mit zähem Mukus und verminderter Clearance.

Dieser Mechanismus führt weiterhin zu einer erhöhten Anfälligkeit für Infektionen. Bis zu 80% aller CF-Patienten infizieren sich im Verlauf mit *Pseudomonas aeruginosa* (PSA) [11]. Der Keim hat maßgeblichen Einfluss auf den Krankheitsverlauf und kann zu einer Verschlechterung der Lungenfunktion und terminal zum Tode führen [12]. Die rezeptorvermittelte erleichterte Adhäsion des Erregers an Epithelzellen [12, 13] und Bildung eines Biofilms im hypoxischen Lungensekret [14, 15] erschwert den körpereigenen Abwehrmechanismus. Nach Infektion wird überschießend das Zytokin Interleukin (IL) -8 sezerniert.

Des Weiteren kann es zur Besiedlung mit *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas*, atypischen Mykobakterien oder Pilzen - im Falle von *Aspergillus* bei ca. 50% - kommen [16-18].

vorliegen

In der Bronchoalveolarlavage (BAL) von Mukoviszidosepatienten läßt sich eine erhöhte Zellzahl mit stark vermehrtem Auftreten von neutrophilen Granulozyten als Immunantwort auf die Infektion nachweisen [19, 20]. Diese setzen Proteasen und Oxidantien [9] frei, welche Epithelzellen zersetzen können und so zum Epithelschaden mit Bronchiektasen führen. Der Zerfall der Neutrophilen erhöht den DNA-Gehalt im Sputum und damit erneut dessen Viskosität [9]. Des weiteren kommen unter anderem IL 6, -8, Leukotrien B₄, Tumornekrosefaktor (TNF)- α , α 1-Protease-Inhibitor und Immunglobuline in erhöhter Konzentration im Plasma und in der BAL vor [9, 19, 21-23]. Neutrophile Granulozyten werden durch Elastasen und Zytokine angelockt, es resultiert ein Circulus vitiosus mit einer chronischen Entzündung als Folge [9]. Diskutiert wird über den Einfluss des Gendefektes auf die Immunantwort der Epithelzellen. In einigen Studien wird über eine verminderte Abgabe von protektiven Zytokinen wie IL-10, sowie über eine vermehrte Bildung von proinflammatorischen Adhäsionsmolekülen (ICAM-1) berichtet [21, 24].

Durch das veränderte Sekret mit Obstruktion der Atemwege und chronischer Entzündung kommt es zum Umbau des Lungengewebes mit Bronchiektasen und Belüftungsstörungen mit respiratorischer Insuffizienz, pulmonaler Hypertonie und Cor pulmonale.

1.1.2 Diagnose und Verlaufskontrolle

Folgende Kriterien dienen der Diagnosefindung: Anzeichen für Dysfunktion von Chloridkanälen (Cl-Konzentration im Schweiß > 60 mEq/l [25]), positive Familienanamnese, pulmonale Erkrankungen übereinstimmend mit CF und Zeichen einer Pankreasinsuffizienz.

Das Alter bei Erstdiagnose liegt im Mittel bei ca. 11 Monaten, zur früheren Erkennung wird auch in Deutschland die Einführung eines zweistufigen Neugeborenen-Screenings mit Bestimmung des immunreaktiven Trypsinlevels im Fersenblut und Bestätigung mittels CFTR-DNA-Test diskutiert [26]. Meist führt jedoch die klinische Symptomatik auf die Verdachtsdiagnose CF, die mittels Schweißtest und Nachweis der exokrinen Pankreasinsuffizienz bestätigt wird. In Zweifelsfällen können auch elektrophysiologische Messungen der transepithelialen Potentialdifferenz an der Nase oder einem frischen Rektumbiopsat hilfreich sein [27].

Im Verlauf der Krankheit kann mittels Spirometrie, Bodyplethysmographie und Gasauswaschverfahren der Lungenfunktionsstatus erhoben werden. Hier spielen besonders die Parameter zur Beurteilung von obstruktiver Ventilationsstörung, Überblähung und Verteilungsstörung eine Rolle. Zur Verlaufskontrolle können weiterhin radiologische Scores aufgestellt werden, Beispiele sind die CT-Scores nach Bhalla [28] oder Brody [29]. Mittels Computertomographie werden CF-typische strukturelle Veränderungen der Lunge wiedergegeben, hierzu gibt es inzwischen auch vielversprechende Ansätze mittels Kernspintomographie [30]. Die Bronchoskopie ermöglicht eine Beurteilung der zentralen Atemwege und dient zur Gewinnung einer BAL oder ermöglicht die Biopsieentnahme zur Beurteilung des Entzündungsstatus. Dieser kann indirekt auch durch Bestimmung von Laborparametern im Blut angenähert werden. Zur genauen Identifizierung pathogener Keime und ihres Resistenz-Spektrums wird das Sputum analysiert. Man erhält es spontan oder durch Induktion mit hypertoner NaCl-Lösung.

Zusammenfassend sind die genannten Untersuchungen zwar hilfreich bei der Erstdiagnose und der Verlaufskontrolle, objektive Aussagen zur Entzündungsaktivität, besonders der Lungen, sind damit aber nicht möglich. Die Lungenfunktionsdiagnostik ist kostengünstig und einfach in der

Durchführung, misst aber nur indirekte Parameter. CT-Untersuchungen ermöglichen die bildliche Darstellung pulmonaler Strukturschäden, deren Ursache konnte jedoch bis jetzt nicht eindeutig mit dem pulmonalen Entzündungsstatus in Zusammenhang gebracht werden [31]. Blutwerte spiegeln eher den Allgemeinzustand des Patienten wider als den Lokalbefund. Untersuchungen bzw. Eingriffe wie Bronchoskopie oder Biopsieentnahme ermöglichen zwar eine direkte Begutachtung des Lungengewebes, sind aber in ihrer Durchführung sehr invasiv und auf Grund von Risiken bei der Durchführung nicht zur dauerhaften Routinekontrolle geeignet. Dies gilt auch für die Computertomographie, da neben der hohen Strahlenbelastung häufig die Sedierung der jungen Patienten notwendig ist.

1.1.3 Therapie

Die Behandlung der Mukoviszidose ist symptomatisch und richtet sich nach der Beteiligung der Organe. MATTHEWS ET AL. erarbeiteten drei Säulen der CF-Therapie: Optimierung der Ernährung, Clearance der Atemwege und medikamentöse Behandlung des Lungeninfekts [32].

Patienten werden auf eine hochkalorische Ernährung eingestellt und erhalten fettlösliche Vitamine und Pankreasenzyme. Diabetes mellitus wird mit Insulinpräparaten behandelt. Bei Leberbeteiligung wird z.B. Ursodeoxycholsäure eingesetzt.

Die Krankengymnastik spielt eine entscheidende Rolle in der Verbesserung der pulmonalen Sekretclearance. Dabei stehen mehrere Therapiemöglichkeiten zur Auswahl, die der Patient sowohl alleine als auch mit Unterstützung durchführen kann. Die Lagerungs- und die autogene Drainage sind zwei Beispiele. Außerdem stehen technische Hilfsmittel wie der „Flutter“ oder PEP-Systeme (positive expiratory pressure) zur Verfügung.

Medikamentös kann sowohl inhalativ als auch oral oder intravenös behandelt werden.

Die Inhalationstherapie setzt eine ausreichende Lungenfunktion voraus, ermöglicht aber die lokale Applikation der Substanzen. Verwendet werden hypertone NaCl-Lösungen [33, 34], β -Sympathomimetika [35, 36], Steroide und Antibiotika (siehe unten). Humane Desoxyribonuklease I (rhDNA I) zur Viskositätminderung des Sputums stellt eine weitere inhalative Therapieoption dar [37].

Orale Mukolytika wie N-Acetylcystein werden aufgrund der positiven Resonanz bei Patienten trotz fragwürdiger Wirksamkeit häufig verwendet [38].

Der Einsatz von Antibiotika ist unumgänglich in der medikamentösen Therapie der CF. Bei akuter Exazerbation des Infekts hat sich die parenterale Gabe bewährt, je nach Erregerspektrum und Resistenzbildung meist mit einer Kombination aus β -Laktamen und Aminoglykosiden. In der Dauertherapie bei PSA Besiedlung werden zum einen Tobramycin und Colistin inhalativ [33, 34], zum anderen Azithromycin oral [39] eingesetzt. Die Antibiotika-Prophylaxe gegen *Staphylokokkus aureus* wird jenseits des ersten Lebensjahres nicht mehr empfohlen, da erhöhte Infektraten mit PSA während der Behandlung beobachtet wurden [40].

Neben Antibiotika finden auch antiinflammatorisch wirkende Medikamente wie Kortikosteroide oder nicht-steroidale Antirheumatika (NSAR, z.B. Ibuprofen) ihre Anwendung in der CF-Therapie. Oral verabreicht, verlangsamen sie den Abfall der Lungenfunktion [41-44]. Allerdings müssen auch hier die Nebenwirkungen beachtet werden, besonders Kortikosteroide haben negativen Einfluss auf Wachstum, Knochendichte und Glukosetoleranz [44].

Des Weiteren richtet sich die Forschung auf eine mögliche Gentherapie oder eine Impfung gegen PSA [45]. Als letzte Therapieoption bei massiver pulmonaler Ausprägung der Krankheit kann eine Lungentransplantation durchgeführt werden.

1.1.4 Prognose

Starb ein Großteil der Patienten in den 1930er Jahren noch im ersten Lebensjahr, wird ein Patient heute im Durchschnitt über 30 Jahre alt. Einfluss auf die Prognose hat nicht nur die genetische Form und der Zeitpunkt bzw. die Art der Erstdiagnose [46, 47], sondern auch der Verlauf der Erkrankung. Routinemäßig gemessene Parameter können eine Orientierung zum Verlauf geben. So erhöhen die Besiedlung mit PSA (mikrobiologische Sputumanalyse), der Abfall von FEV₁ (Lungenfunktionsdiagnostik) [48] und ein schlechter Ernährungszustand (Body Mass Index (BMI)-Bestimmung) [49] jeweils die Mortalität. CT-Scores korrelieren mit klinischen Zeichen der Exazerbation [50]. Durch eine optimale Verlaufskontrolle können somit die genannten Einflussfaktoren frühzeitig erkannt und behandelt und so die Prognose positiv beeinflusst werden.

1.2 Organische Spurengase in der Atemluft

Seit Jahrhunderten ist bekannt, dass sich Krankheiten durch den veränderten Geruch des Patienten äußern können, zum Beispiel bei Diabetes, Leber- oder Nierenversagen. Trotzdem existieren nur wenige routinemäßig eingesetzten Nachweisverfahren. Die gängigste Methode ist sicherlich der Nachweis von Ethanol als Zeichen für Alkoholkonsum [51, 52]. Andere Beispiele sind der ^{13}C -Atemtest bei *Helicobacter-pylorii*-Besiedlung des Magens oder der H_2 -Atemtest bei Laktasemangel [53].

Seit den 1970er Jahren, nachdem durch PAULING ET AL. zum ersten Mal die Atemluft eines gesunden Menschen mittels Gaschromatographie untersucht wurde [54], bemüht sich die Forschung um den Nachweis der genauen Zusammensetzung und um die Ermittlung von Normwerten der Inhaltsstoffe und ihrer genauen Herkunft. Trotz intensiver Arbeit konnten diese Fragen noch nicht endgültig geklärt werden.

PAULING ET AL. wiesen in einer Probe 250 Stoffe nach [54], KROTOSZYNSKI ET AL. untersuchten 28 gesunde Probanden und ermittelten 102 Inhaltstoffe der Atemluft mit den drei Hauptbestandteilen Isopren, Aceton und Acetonitril [55]. Nach einer Zusammenstellung von KNEEPKENS ET AL. [56] variieren die publizierten Standardwerte für Konzentration bzw. Exkretionsrate erheblich. Werte für Ethan oder Pentan liegen beispielsweise zwischen $0,36\pm 0,09$ und $0,88\pm 0,20$ bzw. $0,59\pm 0,41$ und $3,7\pm 1,2$ nmol/l. Bei Messungen über sechs Monate bei 20 Probanden mittels Massenspektrometrie konnten Mittelwerte für Isopren (118 ± 68 ppb), Methanol ($450\pm 1,62$ ppb), Propanol (18ppb) und Aceton ($411\pm 1,58$ ppb) ermittelt werden [57-59].

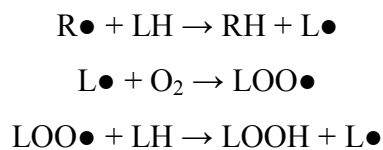
Ethan und Pentan sind die am häufigsten untersuchten Stoffe. Diese flüchtigen Kohlenwasserstoffe (VOCs=volatile organic compounds) scheinen fast ausschließlich bei der Peroxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren (Linolen- /Linol- /Arachidonsäure bzw. deren Derivate) zu entstehen [56, 60, 61].

1.2.1 Mechanismus der Lipid-Peroxidation

Die Bildung freier Radikale findet fortlaufend im menschlichen Körper statt, zum Beispiel in der Atmungskette [56]. Trotzdem kann ihre Wirkung verheerend sein durch ihre Fähigkeit, nahezu

alle chemischen Verbindungen zu oxidieren und dadurch das betroffene Gewebe in Aufbau und Funktion schwer zu schädigen. Dieser Vorgang wird auch oxidativer Stress genannt. Radikale entstehen unter anderem enzymgesteuert, durch Autooxidation von Hämoglobin und Glutathion oder durch physikalische Kräfte wie UV-Licht und Röntgenstrahlen. Sie sind extrem reaktiv und gehen Verbindungen mit DNA, Proteinen, Kohlenhydraten und Lipiden ein [62]. Durch Granulozyten gebildet, erfüllen sie wichtige Aufgaben in der Immunabwehr. Zum größten Teil versucht der Organismus jedoch, Bildung und mögliche Schäden zu verhindern oder zu reparieren durch Antioxidantien wie Glutathion, α -Tocopherol (Vitamin E) oder Enzyme zur DNA-Reparatur [56, 63].

Wie oben bereits erwähnt, greifen freie Radikale auch mehrfach ungesättigte Fettsäuren (LH) an, ein wichtiges Strukturmolekül in Membranen. Die Reaktion wird Lipid-Peroxidation genannt. Dabei reagiert ein Radikal ($R\bullet$) mit einem Kohlenstoffatom einer Doppelbindung und bildet unter Verwendung eines Sauerstoffmoleküls (O_2) und einer weiteren Fettsäure (FS) ein Lipidperoxid (LOOH). Die Reaktion geht mit der Bildung eines FS-Radikals einher, das weiter reagieren kann. Ein Kreislauf mit Produktion vieler Lipidperoxide ist die Folge.



Die Funktion der veränderten FS ist schwer beeinträchtigt, es kommt unter anderem zu Membranschäden der Zellen. [56, 62].

Lipid-Peroxidation kann in Körperflüssigkeiten durch Zwischen- oder Endprodukte mittels Chemilumineszenz, Flüssigkeitschromatographie oder Reaktion mit Thiobarbitursäure nachgewiesen werden. Beispiele für diese Biomarker sind Malondialdehyd, n-Hexanal oder n-Nonanal in Blut-, Sputum- oder Urinproben [64-66]. Erniedrigte Konzentrationen von mehrfach ungesättigten Fettsäuren können dazu im Blut gemessen werden [66].

Hinweise für die Lipid-Peroxidation lassen sich auch bei CF-Patienten finden. Mögliche Ursache sind die chronische Infektion mit erhöhtem oxidativen Stress des Lungengewebes oder die verminderte Resorption von Antioxidantien im Darm. Im Plasma der Patienten traten erhöhte Werte für Hydroperoxide bzw. erniedrigte Werte für β -Carotin und Glutathionperoxidase auf

[67-69]. Weitere Biomarker konnten im Sputum nachgewiesen werden, mit erhöhtem Level bei Exazerbation [70].

1.2.2 Nachweis von Ethan und Pentan

Erhöhte Werte für Pentan wurden bei entzündlich bedingten Erkrankungen wie Colitis ulcerosa, Morbus Crohn [71, 72] oder rheumatoider Arthritis [73] sowie für ischämisch bedingte Krankheitsbilder wie dem akuten Myokardinfarkt [74] ermittelt. Auch Ethan trat vermehrt bei entzündlichen Magendarmkrankungen [71, 75] und Sklerodermie [75] auf. Bei Patienten mit Alkohol-induzierter Lebererkrankung konnten erhöhte Konzentrationen beider Stoffe in Atemproben nachgewiesen werden [76, 77].

Änderungen der Atemzusammensetzung bei pulmonalen Erkrankungen wurden in der Vergangenheit mehrfach beobachtet. Bei Patienten mit akutem Asthma wiesen OLOPADE ET AL. vermehrt Pentan nach [78], PAREDI ET AL. gelang dieser Nachweis für Ethan, mit positiver Korrelation zu Stickstoffmonoxid (NO) und Trapped-air-Volumina (Lungengasvolumina, die nicht an der Ventilation teilnehmen), negativer Korrelation zum forciert expiratorischen Volumen in einer Sekunde (FEV₁-Wert) und Abfall nach Steroidbehandlung [79]. Ethan ist daneben bei Zigarettenkonsum [66, 80] und chronisch-obstruktiven pulmonalen Erkrankungen (COPD) [81, 82] in der Atemluft erhöht, Pentan tritt vermehrt beim „Acute Respiratory Distress Syndrome“ (ARDS) [83, 84] und beim Schlafapnoe-Syndrom [85] auf.

PAREDI ET AL. konnten in Atemproben von CF-Patienten vermehrt Ethan nachweisen. Die Ergebnisse standen in Korrelation zum gemessenen Kohlenmonoxid (CO), mit Obstruktionsparametern der Lungenfunktion und mit Steroidtherapie [86].

1.2.3 Nachweis weiterer organischer Spurengase

Methan tritt mit hoher Konzentration in der Atemluft auf und soll beinahe ausschließlich im Darm bei der bakteriellen Fermentation entstehen [66]. Acetongeruch in der Atemluft ist bekannt als Zeichen für die diabetische Ketoazidose. Es entsteht aus Acetoacetat, einem Ketonkörper, und konnte vermehrt bei ketonhaltiger Diät bei Ratten nachgewiesen werden [87]. Der Isoprengehalt unterliegt einem zirkadianen Rhythmus [66] und wird durch die Cholesterinsynthese beeinflusst, je nach Hemmung oder Steigerung mit verminderter bzw. erhöhter Konzentration [66, 88]. Er steigt zudem bei Beginn körperlicher Anstrengung an [89].

Während pulmonaler Exazerbation von CF wurde ein Abfall von Isopren registriert [64]. Bei Patienten mit einem Lungenkarzinom konnten erhöhte Werte für mehrere VOCs ermittelt werden, die im Zusammenhang mit dem Verlauf der Erkrankung standen und deren Nachweis als potentiell Screeningverfahren eingesetzt werden könnte [90, 91].

1.2.4 Stickstoffmonoxid

Die Messung von Stickstoffmonoxid (NO) in der Atemluft steht ebenfalls für die medizinische Diagnostik zur Verfügung.

Stickstoffmonoxid wird durch die NO-Synthase (NOS) - von der mindestens drei Isoformen bekannt sind - aus L-Arginin freigesetzt [92]. Inflammatorische Zytokine erhöhen über vermehrter Expression von NOS2 die Synthese von NO. Daher dient NO als Entzündungsmediator im Körper [93] und eignet sich so als Marker von Entzündungsreaktionen [94]. Daneben wird NO aus S-Nitrosothiol freigegeben und bildet sich bei Protonierung von Nitriten [82]. Im Respirationstrakt kommt es in hoher Konzentration im Nasopharynx und in den Nasennebenhöhlen vor und scheint eher epithelialen als endothelialen Ursprungs zu sein [82]. Die Konzentration von NO ist abhängig von der Flow-Rate und akkumuliert beim Luftanhalten. Diese Aspekte sind bei der Messung zu berücksichtigen, außerdem sollte gegen einen Widerstand geatmet werden, um durch Druck den Nasenraum abzuschließen und so Kontaminationen zu verhindern [95]

Seit Gustafsson et al 1991 erstmals NO in der menschlichen Atemluft nachwies, wurde es im Zusammenhang mit verschiedenen Erkrankungen untersucht. Erhöhte Konzentrationen konnten bei atopischem Asthma beobachtet werden, mit Anstieg bzw. Abfall bei vermehrter bzw. verminderter Allergenbelastung [96, 97]. Unter Therapie sank der Atemluftgehalt signifikant ab [98]. Da ebenfalls ein positiver Zusammenhang zwischen der Konzentration von eosinophilen Granulozyten in der BAL und im Blut besteht, könnte die systematische Messung von NO zusammen mit anderen Parametern eine Möglichkeit zur Vorhersage von Atemwegsobstruktion und zur Therapiekontrolle dienen [99-101]. Patienten mit Bronchiektasen, Lungenkarzinom, Rhinitis oder Schlafapnoe-Syndrom atmen ebenfalls vermehrt NO aus [82, 85].

Im Gegensatz dazu konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass NO bei Mukoviszidose-Patienten in normaler oder verminderter Menge exhaliiert wird [102, 103]. Nasal gemessen, standen verminderte Werte im Zusammenhang mit Pankreasinsuffizienz und PSA-Besiedlung [104].

1.3. Fragestellung

In der angeführten Literatur über den Nachweis von flüchtigen Kohlenwasserstoffen in der Atemluft unterscheiden sich die Arbeitsmethoden der Gruppen im Versuchsaufbau, in der Durchführung, in der Art der Probenauswertung am Gaschromatographen, in der statistischen Auswertung mit oder ohne Berücksichtigung der Raumluft und nicht zuletzt in der Wahl der untersuchten Stoffe. Trotz intensiver Forschung in den letzten Jahrzehnten wurde keine standardisierte reproduzierbare Messmethode entwickelt. Es existieren nur wenige Arbeiten zu veränderten Atemgasen bei Mukoviszidose, in denen nur einzelne Einflussfaktoren - wie Krankheitsstadium oder medikamentöse Therapie - berücksichtigt werden.

Ziel dieser Arbeit ist es, Unterschiede in Atemluftproben von CF-Patienten und gesunden Probanden im Kindes- und Jugendalter zu identifizieren und Korrelationen zu genannten Einflussfaktoren zu untersuchen.

Zum anderen soll die Reproduzierbarkeit der Messung auf dem verwendeten Gaschromatographiesystem (GC-System) überprüft werden mit Evaluation des Parameterspektrums und möglicher Störfaktoren.

Zusammenfassend geht die Arbeit also folgenden Fragen nach:

1. Ergeben Messungen von organischen Spurengasen in der Atemluft auf einem atmosphärischen GC-System reproduzierbare Ergebnisse?
2. Welche Einflussfaktoren beim Versuchsaufbau und der Durchführung liegen vor und welches Parameterspektrum der Atemluft sollte untersucht werden?
3. Unterscheidet sich die Atemluft von Kindern und Jugendlichen mit Mukoviszidose im Vergleich zu einer äquivalenten gesunden Vergleichsgruppe hinsichtlich der Konzentration von organischen Spurengasen?
4. Inwieweit werden Konzentrationen von organischen Spurengasen in der Atemluft von CF-Patienten durch andere Faktoren wie dem Krankheitsverlauf, der pulmonalen bakteriellen Besiedlung, der Medikamenteneinnahme oder den Lebensumständen beeinflusst?

2. Methodik

2.1 Ort, Zeitpunkt, Voruntersuchungen

Die Messungen wurden in der Bibliothek der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin des UK Aachen durchgeführt. Der fensterlose Raum wurde durch eine zentrale Klimaanlage belüftet, Spender zur alkoholischen Händedesinfektion standen nicht zur Verfügung.

Die ca. 60-minütigen Messungen erfolgten meist nachmittags. Nach einem Aufklärungsgespräch über Versuchsablauf, mögliche Risiken und Speicherung der Probandendaten wurde das Einverständnis schriftlich festgehalten. Als mögliche Risiken wurden hierbei Unwohlsein während der Messung oder Ansaugen der Zunge an das Mundstück erwähnt.

Danach fand eine kurze körperliche Untersuchung statt, dabei wurde der Rachenraum inspiziert und die Lunge abgehört. Außerdem wurde eine aktuelle Anamnese durchgeführt mit Fragen über Allergien, vorherige Erkrankungen, aktives und passives Rauchen, Medikamenteneinnahme, den Tagesablauf vor der Messung und mit Erfassung von Größe und Körpergewicht. Die Antworten wurden auf einem standardisierten Fragebogen dokumentiert (siehe Anhang 1). Bei der Patientengruppe wurde außerdem das Vorliegen einer bakteriellen Besiedlung der Lunge, eines CF-Diabetes und einer Leberbeteiligung sowie der Genotyp festgehalten. Dann folgte die Lungenfunktionsprüfung und anschließend die Probenentnahme und NO-Messung.

Studienprotokoll, Probandeninformation und Einwilligungserklärung waren am 17.05.2003 von der Ethikkommission an der medizinischen Fakultät der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule (RWTH) Aachen die Studie genehmigt worden.

2.2 Probanden und Patienten

Insgesamt nahmen jeweils 20 gesunde bzw. an Mukoviszidose erkrankte Testpersonen freiwillig an der Studie teil. CF-Patienten wurden zum einen im Rahmen einer regelmäßigen Kontrolle in der pneumologisch-allergologischen Spezialambulanz oder während eines stationären Aufenthalts in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der RWTH rekrutiert, zum anderen

wurden sie durch das Luisenhospital Aachen und durch die Kinderarztpraxis Dr. Döhmen/Dr. Friedrichs vermittelt. Die gesunden Probanden wurden auf privater Ebene angesprochen.

55% der Testpersonen jeder Gruppe waren weiblichen Geschlechts. Es konnte kein signifikanter Unterschied in Alter, Körpergröße- und Gewicht festgestellt werden. Allerdings lag in der Patientengruppe im Durchschnitt der Body Mass Index (korrigiert unter Einbeziehung von Alter und Geschlecht, BMI_SDS [105, 106]) unter dem der Probandengruppe. Die Patienten wiesen dazu eine deutlich eingeschränkte Lungenfunktion mit obstruktiver Ventilationsstörung auf (BMI_SDS, FEV₁ und MEF₅₀: p=0,001).

Tabelle 1: Patienten- und Probandendaten (Mittelwert, Minimum-Maximum)

	Probanden	Patienten
N	20	20
Männlich (%)	45	45
Alter (Jahre)	14,3 (9-23)	17,2 (7-29)
Größe (cm)	162 (132-186)	158 (125-180)
Gewicht (kg)	53,8 (28-83)	46 (24-64)
BMI (SD-Score)	0,25 (-0,9-1,5)	-0,80 (-2,5-0,4)
FEV ₁ (% Soll)	109 (85-138)	65 (21-105)
MEF ₅₀ (% Soll)	103 (71-149)	43 (5-103)

Genauere Daten der einzelnen Testpersonen sind Anhang 2 zu entnehmen.

Die Testpersonen wiesen folgende gemeinsame Charakteristika auf: guter bis zufriedenstellender Allgemeinzustand (bei CF-Patienten besonders im Hinblick auf die Belastung durch das Beatmen der Probenbehälter), Mindestalter von sechs Jahren, Verständnis und Fähigkeit zur Umsetzung des Versuchs. Gemeinsame Ausschlusskriterien stellten ein Nikotinkonsum und ein Infekt der oberen Luftwege in den letzten vier Wochen dar. Gesunde Probanden durften keine die Luftwege betreffenden Allergien vorweisen. Die an CF erkrankten Testpersonen werden im folgenden Text Patienten genannt. Bei ihnen musste die Diagnose der Mukoviszidose gesichert sein. Alle hatten bereits zuvor Lungenfunktionsprüfungen durchgeführt.

Den Testpersonen wurde eine Probennummer zugeteilt, die schriftlich auf dem Anamnesebogen festgehalten wurde. Im weiteren Text wird diese Nummerierung übernommen.

Bei je neun CF-Patienten lag die Genmutation $\Delta F508$ in homo- bzw. heterozygoter Form vor. Bei 16 Patienten lag eine chronische Atemwegsinfektion mit *Pseudomonas aeruginosa* vor. Insgesamt wurden 14 Patienten mit Antibiotika behandelt, zwei in oraler Form (Ciprofloxacin), sieben inhalativ (Tobramycin, Colistin) und fünf Patienten intravenös. Inhalative Steroide nahmen sieben, langwirksame β -Sympathomimetika neun Patienten. Fünf Patienten wurden zum Untersuchungszeitpunkt wegen einer pulmonalen Exazerbation mit Symptomzunahme und Lungenfunktionsabfall behandelt. Bei sechs wurde ein CF-Diabetes mit Insulin behandelt. In der Vergleichsgruppe waren vier Probanden zu Hause passiv Nikotin ausgesetzt (durch mindestens eine rauchende Person, die im gleichen Haushalt wohnt), in der CF-Gruppe war das bei neun Patienten der Fall.

2.3 Lungenfunktion

2.3.1 Spirometrie

Zur Verfügung standen zum einen ein Spirometer (FlowScreen[®], Fa. E. Jaeger, Würzburg) und zum anderen ein Ganzkörperplethysmograph (MasterScreen[®] Version 4.3, Fa. E. Jaeger, Würzburg) der Spezialambulanz des Universitätsklinikums (UK) Aachen. Nach Kriterien der American Thoracic Society und der European Respiratory Society [107] führten die Testpersonen eine forcierte Spirometrie durch. In der Studie berücksichtigt wurden die maximale expiratorische Strömung bei 50% der noch auszuatmenden forcierten Vitalkapazität (MEF₅₀) und die relative Ein-Sekunden-Kapazität, also das forcierte expiratorische Volumen in einer Sekunde in Relation zum Sollwert (FEV₁%) [108].

Die folgende Darstellung zweier Lungenfunktionsmessungen zeigt beispielhaft das Ergebnis eines Probanden und eines CF-Patienten.

Abbildung 1: Spirometrie

- a) gesunder Proband (14 Jahre, weiblich)
- b) CF-Patient (17 Jahre, männlich)

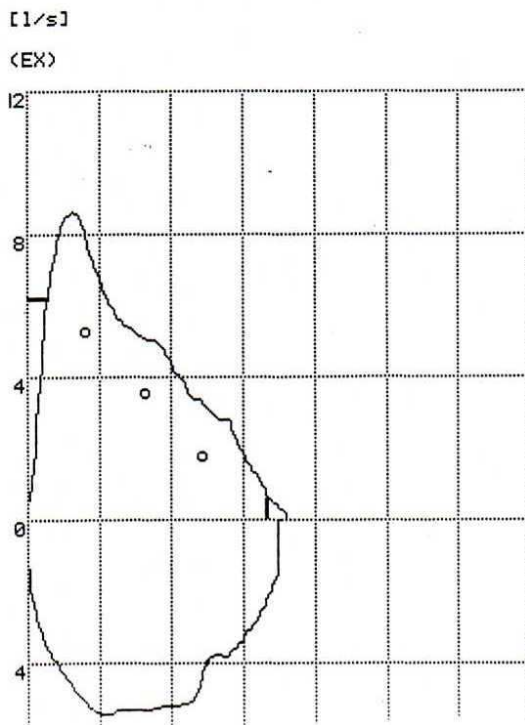
a)

PARAMETER	BASIS	SOLL	%SOLL
UC	3.56	3.31	107.
FUC	3.68	3.31	111.
FEV 1	3.36	2.78	120.
FEV 1%VC	91.3	84.4	108.
PEF	8.64	6.27	137.
MEF 50	4.97	3.87	128.
MIF 50	5.25	8.14	64.4
MEF 25	2.84	1.99	142.
MMEF 25/75	4.48		
FIU 1	0.00		

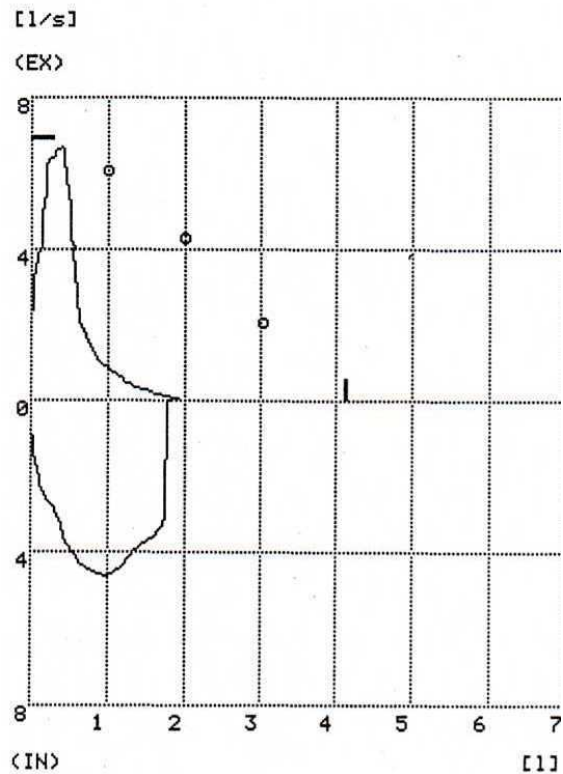
b)

PARAMETER	BASIS	SOLL	%SOLL
UC	1.84	4.13	44.4
FUC	2.12	4.13	51.2
FEV 1	1.40	3.43	40.8
FEV 1%VC	66.0	84.4	78.1
PEF	6.68	7.03	94.9
MEF 50	0.85	4.30	19.7
MIF 50	4.57	11.9	38.1
MEF 25	0.25	2.22	11.2
MMEF 25/75	0.71		
FIU 1	0.00		

FLUSS/VOLUMEN-KURVE



FLUSS/VOLUMEN-KURVE



Graphik a) zeigt die normale Fluss-Volumenkurve eines gesunden Individuums.

Graphik b) hingegen gibt ein Beispiel für den Kurvenverlauf eines CF-Patienten mit fortgeschrittener Lungenerkrankung. Die Parameter der obstruktiven Ventilationsstörung, unter anderem FEV₁%, MEF₅₀ und MEF₂₅, sind in diesem Fall vermindert. Die beiden Letztgenannten geben dabei die Limitation der mitt- und endexpiratorischen Flüsse wieder.

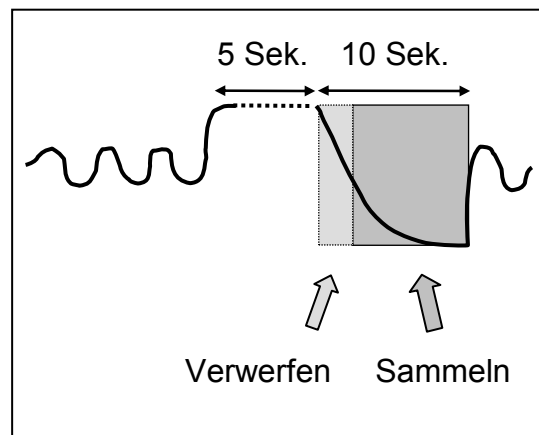
2.3.2 Messung des NO-Gehalts

Nach den Empfehlungen der ERS/ATS Arbeitsgruppe [95] wurde die exhalierete Konzentration an Stickstoffmonoxid (eNO) als Plateauwert bei Ausatmung mit einem Fluss von 50 ml/sec bestimmt. Hierzu diente der Analysator LR-5000 (Logan Research Ltd., Rochester, UK), welcher dem Chemilumineszenz-Sensor mundstücknah einen konstanten Probenfluss von 250 ml/min zuführte (Ansprechzeit 300 msec, Genauigkeit ± 1 ppb). Die Probanden atmeten dabei gegen einen elektronisch geregelten Widerstand, der über einen weiten Munddruck-Bereich für eine konstante Flussrate von 50ml/sec sorgte. Der Plateau-Wert wurde grafisch festgelegt und eNO als Mittelwert aus drei Manövern angegeben.

2.4 Gewinnung der Atemprobe

Verwendet wurden Silco-Steel[®] Behälter mit einem Fassungsvermögen von 6l. Vor jeder Messung wurden die Behälter im Forschungszentrum Jülich auf eine Temperatur von 120°C erhitzt, auf einen Druck von <40 mbar evakuiert und auf verbliebene Kohlenwasserstoffe im Gaschromatographen hin überprüft. Zur Messung wurde ein Mundstück mit integriertem Magnetventil und einem Barometer verwendet, das in der Werkstatt des Forschungszentrums Jülich entwickelt worden war.

Nach einer 10minütigen Ruhezeit in der Bibliothek nahm die Testperson vor dem Probenbehälter mit Mundstück Platz. Sie wurde aufgefordert, nach einem tiefen Atemzug die Luft für 5 sec. anzuhalten und dann möglichst gleichmäßig für mindestens 10 sec. in den Behälter zu atmen. Zur Orientierung diente eine Stoppuhr. Die Atemluft des Probanden wurde über das Magnetventil zunächst für 2 sec. in die Umgebungsluft entlassen, die restliche Luft wurde im Behälter aufgefangen. Das Manöver wurde ca. dreimal wiederholt, bis ein Behälterdruck von 300 mbar erreicht wurde. Dem Probanden war es möglich, per Druck der Hand des Versuchsleiters die Messung vorzeitig abubrechen. Dabei wurde das Ventil vor Abgang des Probanden vom Mundstück geschlossen, um Raumluftbeimengungen zu vermeiden.

Abbildung 2: Mundstück, Ventil und Probenbehälter (9jährige Probandin)**Abbildung 3: Schematische Darstellung des Atemmanövers**

Insgesamt wurden pro Testperson drei Probenbehälter gefüllt, jeweils in einem Abstand von ca. 15 Minuten. Zwischen dem Beatmen des zweiten und dritten Probenbehälters nahm der Versuchsleiter eine Raumluftprobe durch Öffnen des Ventils der Behälter. Dabei wurde darauf geachtet, dass sich niemand in der unmittelbaren Nähe zum Probenbehälter aufhielt. Das Ventil wurde so lange offengehalten, bis keine Raumluft mehr hörbar durch den Unterdruck im Probenbehälter angesogen wurde.

2.5 Analyse der Atemproben

Nach der jeweiligen Messung erfolgte der Transport der Behälter in das Forschungszentrum Jülich in einem Zeitraum von höchstens 24 Stunden nach der Probenentnahme. Vor Ort wurde der Druck in den Probenbehältern gemessen und im Anschluss auf einen Wert von drei Bar mit ultrareiner synthetischer Luft aufgepumpt. Zur Probenanalyse wurde ein Gaschromatograph HP 5890 Serie II[®] (Fa. Hewlett-Packard) mit einer unpolaren Kapillarsäule (DB1, Fa. J&W) verwendet.

2.5.1 Gaschromatographische Trennung

Die gaschromatographische Messung der Kohlenwasserstoffe dauerte ca. 70 min. Zunächst wurde das zu vermessende Gas mit einem Fluss von 50ml/min angesogen und dann durch eine Kühlfalle von -25°C zur Entfernung des im Gas vorhandenen Wassers geleitet. Anschließend wurde die Probe durch eine Anreicherungsschleife geleitet, die das Gas zunächst auf ca. -190°C abkühlte, wodurch auch die leicht siedenden C_2 -Kohlenwasserstoffe kondensierten. Danach wurde es auf 80°C erwärmt und dann mit dem Trägergas (H_2) in die Trennsäule (DB-1 Kapillarsäule, Innendurchmesser (ID) 0.32mm, Filmdicke 0.32 μm , 60m Länge, Fa. J&W Filson) injiziert. Die Starttemperatur betrug -50°C . Da eine unpolare stationäre Phase verwendet wurde, bestimmte der unterschiedliche Siedepunkt der Kohlenwasserstoffe des Gases die jeweilige Retentionszeit. Der Gasstrom am Säulenende wurde mit einem Verhältnis von 50:1 aufgeteilt zwischen einem Flammenionisationsdetektor (FID) zur quantitativen Detektion der eluierten Substanzen und einem Massenspektrometer (MS) zur genauen Identifikation.

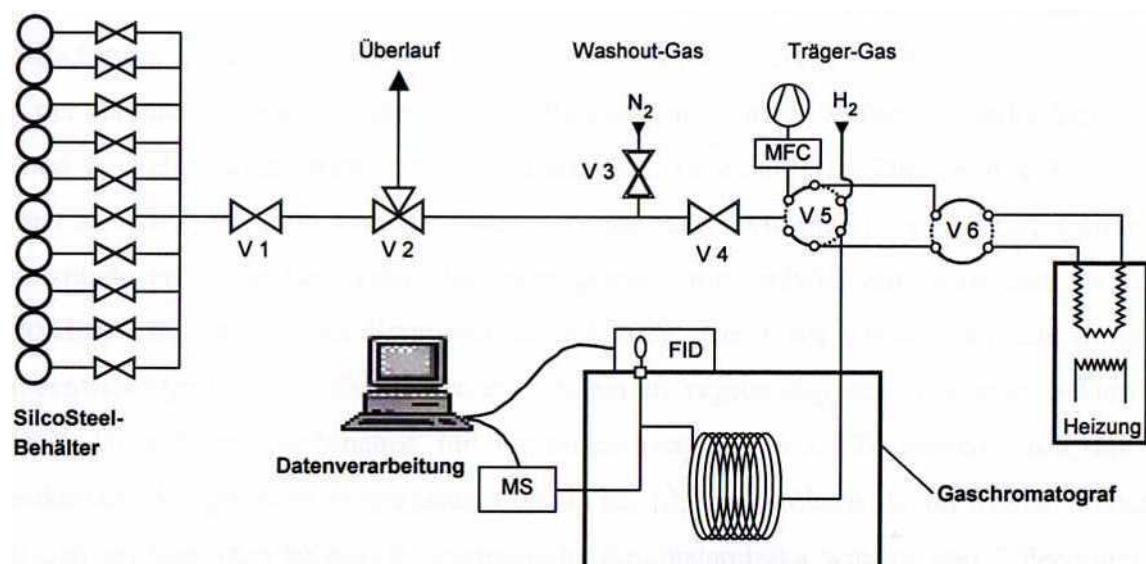
Tabelle 2: Betriebsparameter des verwendeten Gaschromatographen

Gasfluss	Trägergas (H ₂) bei 50°C	6,3ml/min
Zeiten	Probenanreicherung	10min
	Rückspülzeiten	51min
Temperaturen	Starttemperatur	-50°C
	Anreicherungstemperatur	Ca. -190°C
	Desorptionstemperatur	80°C
	Probeneinlass, Ventile	80°C
	FID	200°C
Temperaturprogramm	-50°C (3min) → 200°C (7min) bei 5°C/min	

Über ein Interface (PE-Nelson 9770, Fa. Nelson) wurden die Signale des Flammenionisationsdetektors aufgezeichnet. Dabei wurden die Analogsignale des Detektors digitalisiert und gespeichert.

Abbildung 4: Aufbau des Gaschromatographen

V1-V6: Ventilsystem; FID: Flammenionisationsdetektor, MS: Massenspektrometer; MFC: Massenfluss-Regler



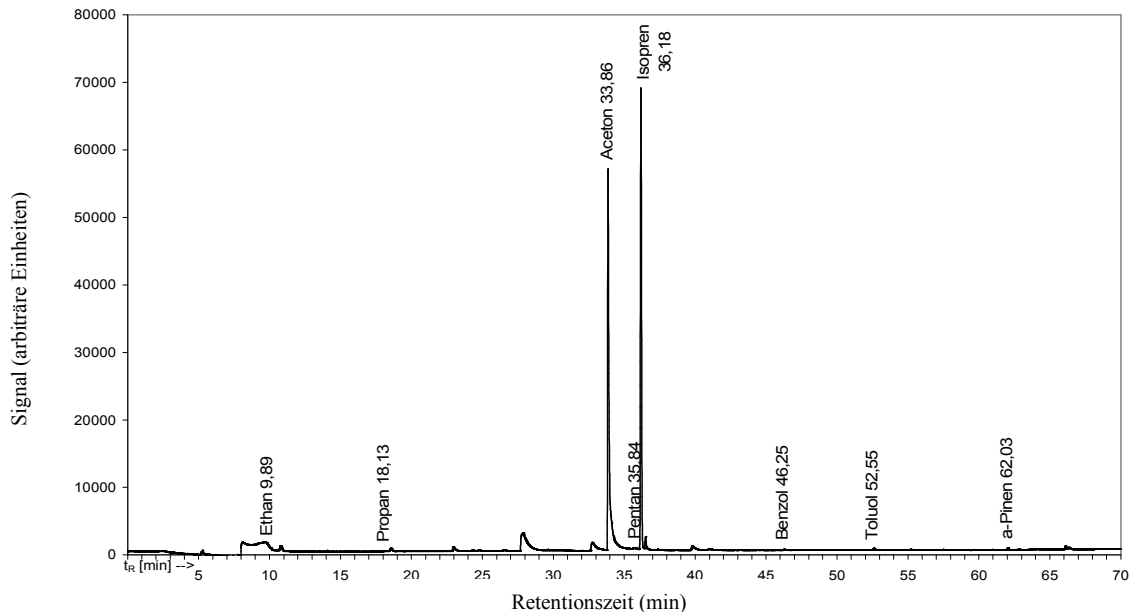
2.5.2 Software-Auswertung

Zur Auswertung der erhaltenen Daten wurde das Nelson-System-Programm (Modell 2600 Chromatography Software) verwendet. Der Flächeninhalt jedes Peaks wurde manuell ermittelt.

Prüfgasgemische dienten zur Identifizierung der einzelnen Kohlenwasserstoffe durch Orientierung an den spezifischen Retentionszeiten.

In den folgenden Chromatogrammen sind einige der in dieser Studie ausgewerteten Kohlenwasserstoffe mit ihren Retentionszeiten gesondert gekennzeichnet.

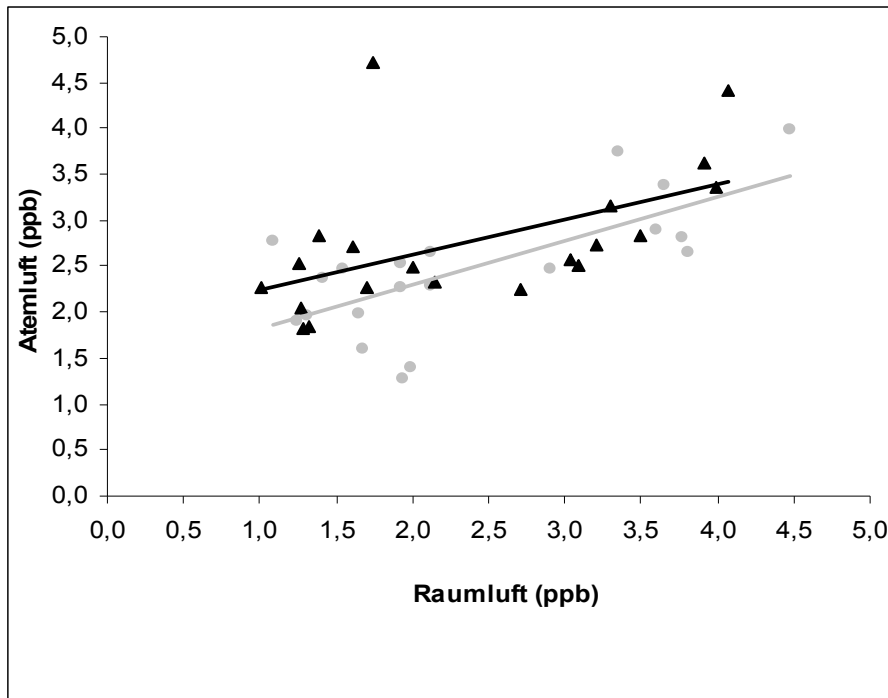
Abbildung 5: Chromatogramm einer Atemgasprobe, 6l-SilcoSteel-Behälter, weibliche gesunde Probandin



Die ermittelten Werte für die Flächeninhalte wurden dann in Relation zur Verdünnung der abgegebenen Probe, zur Molmasse und zum Kalibrierfaktor des entsprechenden Kohlenwasserstoffes gesetzt. Man erhielt das Volumen-Mischungsverhältnis in ppb (entspr. 10^{-9} Teilchen) für die einzelnen Inhaltsstoffe.

Zur weiteren statistischen Bearbeitung wurden die Mittelwerte der einzelnen Gaskonzentrationen der Atemproben mittels linearer Regressionsanalyse in Zusammenhang mit den jeweiligen mittleren Konzentrationen der Raumluftproben gestellt. Dabei wiesen Ethan ($r=0,63$), Propan ($r=0,72$), Pentan ($r=0,6$) und Methanol ($r=0,59$) eine signifikante lineare Korrelation (je $p<0,001$) auf. Dem folgenden Diagramm kann beispielhaft die Regressiongerade für Ethan entnommen werden.

Abbildung 6: Korrelation von Ethankonzentration in Raumluft und Atemluft bei CF-Patienten (Dreiecke) und gesunden Probanden (Kreise)



Für jedes Gas wurde der alveoläre Gradient als Differenz zwischen Atemluft und Raumluft errechnet: $\Delta[\text{VOC}] = [C_{\text{VOC Atem}} - C_{\text{VOC Raum}}]$. Dabei wird von einem Fließgleichgewicht, dem Steady-State zwischen Zellen, Blutkreislauf, Lungengewebe und Atemluft ausgegangen. Somit gibt $\Delta[\text{VOC}]$ die endogene Produktion bzw. Absorption des jeweiligen Gases wider.

2.6 Methodische Vorversuche

Im Forschungszentrum Jülich wurden vor dem eigentlichen Messbeginn zunächst eine Reihe von Probemessungen durchgeführt, um die optimalen Bedingungen für den Messablauf und den Messaufbau zu ermitteln.

2.6.1 Art und Lagerung des Probenbehälters

Es standen zwei Probenbehälter zur Verfügung, ein 6l-Behälter der Marke Silco-Steel[®] und ein 2l-Behälter der Marke Summa[®]. Sie wurden im Hinblick auf Lagerungsstabilität der zu vermessenden Gase über einen Zeitraum von 24, 48 und 72h verglichen. Hierzu wurden je zwei 2l-Behälter und drei 6l-Behälter im Versuchslabor der Abteilung ICG-II des Forschungszentrums Jülich beatmet und vermessen. Im gleichen Versuchsaufbau wurde

verglichen zwischen Behältern, die unmittelbar nach der Beatmung auf 3 bar Überdruck mit ultrareiner synthetischer Luft aufgepumpt wurden und solchen, bei denen dies erst direkt vor der Vermessung geschah.

2.6.2 Wahl des Versuchsraumes

Zur Probenentnahme standen zwei mögliche Räume zur Verfügung, die Bibliothek der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin und ein Untersuchungszimmer in der pneumologisch-allergologischen Spezialambulanz. Beide Räume waren fensterlos und wurden durch die gleiche Klimaanlage versorgt. Zwei Luftproben pro Raum, jeweils zur gleichen Zeit entnommen, wurden miteinander verglichen.

2.6.3. Konstanz der Atem- bzw. Raumluf

Zur Beurteilung der Konstanz von Atem- und Raumluf während eines Tages wurden in einem Zeitraum von 4 Stunden (14:00 Uhr bis 18:05 Uhr) jeweils 10 Proben der Atemluft einer gesunden Testperson und der Raumluf der Bibliothek entnommen. Während der gesamten Messzeit fastete die Testperson und befand sich in der Bibliothek.

2.6.4 Chemische Substanzen

Zu messende Substanzen mussten zum einen in ausreichend hoher Konzentration vorkommen, damit sie über die Nachweisgrenze von ca. 0,05 ppb fielen und ausgewertet werden konnten. Zum anderen mussten die Peaks dieser Kohlenwasserstoffe in den Chromatogrammen eindeutig zugeordnet werden, es durfte zu keiner Überlagerung mit anderen Stoffen kommen. Dazu gab die Fachliteratur Beispiele zur Orientierung von bereits vermessenen Stoffen (siehe Einleitung). Zudem wurden die Erfahrungen, die während der Vorversuchsreihe bei der Auswertung der Chromatogramme gemacht wurden, zum erheblichen Teil mit einbezogen. Folgende Substanzen wurden im Rahmen dieser Studie bestimmt:

Aceton, α -Pinen, Benzol, Dimethylsulfid (DMS), Ethan, Ethanol, Isopren, Limonen, Methanol, n-Pentan, Propan, Eukalyptol, Toluol und 2-Propanol.

2.7 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung der Daten wurde das Software-Programm „SPSS für Windows“, Version 12.0.1 verwendet. Nach Prüfung der Daten auf Normalverteilung mit dem Kolmogorov-Smirnov-Z-Test wurden der Mann-Whitney-U-Test oder der t-Test zum Gruppenvergleich durchgeführt. Der χ^2 -Test diente zur Bestimmung der systematischen Abhängigkeit der ermittelten Daten bei dichotomen Variablen. Bei stetigen Variablen wurde dazu zunächst eine Korrelationsanalyse durchgeführt mit folgender linearer Regressionsanalyse, Kovarianzanalyse oder folgendem t-Test. Zur Beurteilung von inter- und intraindividuellen Schwankungen wurde der Variationskoeffizient verwendet.

Das Institut für Medizinische Statistik der RWTH Aachen (Univ.-Prof. Dr. rer. nat. R.-D. Hilgers) war im Rahmen einer statistischen Beratung in Versuchsplanung und –auswertung einbezogen worden.

3. Ergebnisse

3.1 Vorversuche

3.1.1 Art und Lagerung des Probenbehälters

Bei einer Lagerungszeit von 48 Stunden zeigte sich besonders bei dem 2l-Behälter eine Veränderung der Gaskonzentrationen im Verhältnis zum Ausgangswert am ersten Tag von bis zu 44%. Bei dem 6l-Behälter lag die Abweichung nach 48 Stunden in einem Rahmen von 7,5% (mit Ausnahme von Methanol), nach 72 Stunden jedoch von 20%. Davon betroffen waren besonders Alkohole. Dabei hatte der Zeitpunkt des Aufpumpens auf 3bar keinen Einfluss auf die Messergebnisse.

Daher wurden maximal 48 Stunden als Zeitraum zwischen Entnahme der Proben und Vermessung der Proben unter Verwendung des 6l-Behälters der Marke Silco-Steel[®] festgesetzt.

Abbildung 7: Veränderung der VOC-Konzentrationen in der Atemluft nach Lagerungsdauer von 2 Tagen, Vergleich 2l-SUMMA-Behälter und 6l-SilcoSteel-Behälter

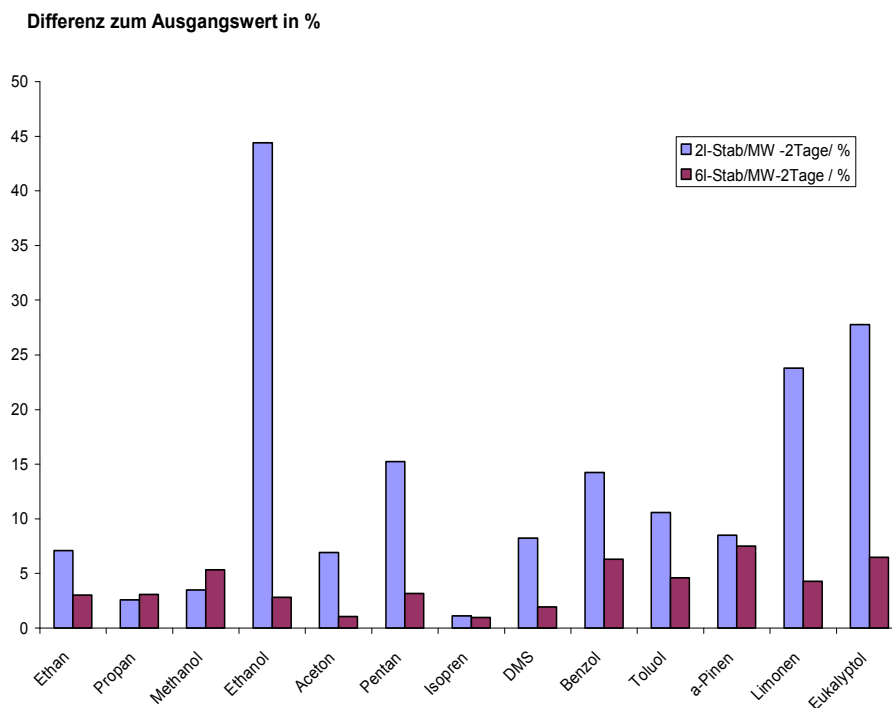
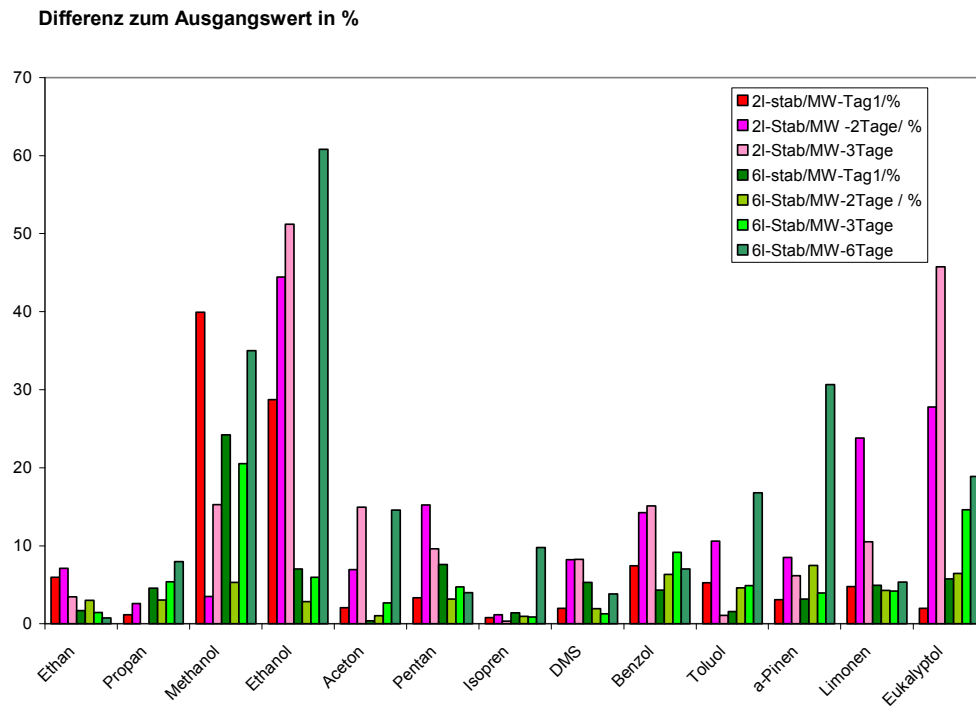


Abbildung 8: Veränderung der VOC-Konzentrationen in der Atemluft im Verlauf von 6 Tagen; Vergleich 2l-SUMMA-Behälter und 6l-SilcoSteel-Behälter



3.1.2 Wahl des Versuchsraumes

In den Proben des Untersuchungszimmers traten neben einer erhöhten Konzentration von Ethanol weitere Interferenzen in den Chromatogrammen auf, die mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die Verwendung von Alkohol- und Aldehyd-basierten Desinfektionsmitteln zurückgeführt werden konnten. Aus diesem Grund wurden alle weiteren Untersuchungen der Studie in der Bibliothek vorgenommen.

3.1.3 Konstanz der Atem- bzw. Raumluft

In dem untersuchten Zeitraum von ca. 4 Stunden wiesen Toluol, Propan und Ethan in der Raumluft einen Peak zwischen 16 Uhr und 18 Uhr auf, Ethanol und Methanol stiegen ebenfalls an. Dies ist wahrscheinlich auf die erhöhte Belastung durch Autoabgase im Bereich des Klimaanlageinzugs oder die Verwendung von Putzmitteln im Klinikum zurückzuführen. Die gemessenen Gase in der Atemluft variierten in einem Bereich von 50-120%, die Werte für Ethan, Pentan, Aceton, Isopren und DMS in einem Bereich von 20-30%.

3.2 Durchführbarkeit und Akzeptanz des Messmanövers und der Vermessung

Die Versuchsreihe konnte in einem Zeitraum von 10 Monaten ohne größere Verzögerungen durchgeführt werden, insgesamt wurden 120 Atemproben vermessen. Alle Testpersonen beendeten die Messreihe mit drei abgegebenen Atemproben in Verbindung mit einer Raumluftprobe.

Bei einem Probanden wurden die Atemproben mit Hilfe eines Plastikadapters statt eines Metallrohrs am Mundstück durchgeführt. Bei einem weiteren Probanden wurde die komplette Messreihe in einem Untersuchungszimmer durchgeführt, ein Proband gab einen Zigarettenkonsum von einer Zigarette im Monat an.

Sieben Patienten waren zum Zeitpunkt der Messung stationär aufgenommen, wobei zwei aus dem Luisenhospital zur Messung im Klinikum erschienen. Eine Patientin gab nach der Abgabe der Atemprobe Luftnot an. Fünf Patienten wurden mit einer pulmonalen Exazerbation behandelt. Alle Silco-Steel[®] Behälter konnten sicher in das Forschungszentrum Jülich transportiert werden. DMS trat nur in einer der Raumluftproben nachweisbar auf. In der CF-Gruppe konnte bei vier Patienten kein 2-Propanol, bei einem kein Limonen und bei neun kein Eukalyptol nachgewiesen werden. Insgesamt kam in 32 Proben dieser Gruppe kein Eukalyptol in einer nachweisbaren Konzentration vor.

3.3 Daten der Atem- und Raumprobenanalyse

Da die errechneten Konzentrationen der Atem- und Raumluftproben nicht normalverteilt waren, wurde die statistische Auswertung mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt. Pentan wird in der Patientengruppe in signifikant höheren Konzentrationen exhalier (p=0,04), 2-Propanol wird vermehrt pulmonal aufgenommen als in der Probandengruppe (p=0,002). Dimethylsulfid ist hingegen signifikant vermindert bei CF-Patienten (p=0,001). Intraindividuelle Unterschiede zwischen den drei vermessenen Atemproben lagen bei allen Testpersonen in einem Rahmen von 9% (bei Aceton) bis 38% (bei Ethanol). Der sehr hohe Variationskoeffizient von Eukalyptol von 197% in der Patientengruppe kommt durch die geringe Anzahl von positiven Proben zustande. Daher wird bei der weiteren Diskussion der Studie Eukalyptol nicht mehr berücksichtigt.

In der folgenden Tabelle sind die Mittelwerte für Δ VOC mit den errechneten p-Werten sowie die inter- und intraindividuellen Variationskoeffizienten der einzelnen Spurengase aufgelistet. Detaillierte Angaben zu Raum- und Atemluftproben finden sich in Anhang 3 und 4.

Tabelle 3: Mittelwerte für Δ VOC mit den errechneten p-Werten, inter- und intraindividuellen Variationskoeffizienten der einzelnen Spurengase, p*: Signifikanzniveau Vergleich CF und Proband, CV: Variationskoeffizient

	Probanden			CF			p*
	Δ VOC	CV		Δ VOC	CV		
		Intraindiv.	Interindiv.		Intraindiv.	Interindiv.	
Ethan	97ppt	8	29	388ppt	16	28	0,36
Propan	575ppt	13	60	529ppt	11	59	0,43
Methanol	265ppb	11	53	193ppb	14	74	0,06
Ethanol	165ppb	29	90	144ppb	38	215	0,06
Aceton	467ppb	8	38	400ppb	9	41	0,19
Pentan	211ppt	19	53	359ppt	22	56	0,04
Isopren	114ppb	22	49	105ppb	21	44	0,64
DMS	7,58ppb	14	52	3,89ppb	14	91	0,001
Benzol	-79ppt	12	31	-36ppt	28	99	0,97
Toluol	-510ppt	12	48	-246ppt	23	85	0,17
α -Pinen	510ppt	21	185	231ppt	30	83	0,15
Limonen	2,21ppb	27	128	2,28ppb	34	154	0,8
Eukalyptol	341ppt	26	101	234ppt	75	197	0,15
2-Propanol	5,76ppb	22	93	14,9ppb	25	51	0,002

3.4 Daten der NO-Analyse

Im statistischen Vergleich der Konzentrationen von Stickstoffmonoxid unterschieden sich beide Gruppen nicht signifikant voneinander ($p=0,53$). Mittelwert und Standardabweichung lagen in der Probandengruppe bei $9,4 \pm 6,7$ ppb, in der Patientengruppe bei $8,1 \pm 6,4$ ppb.

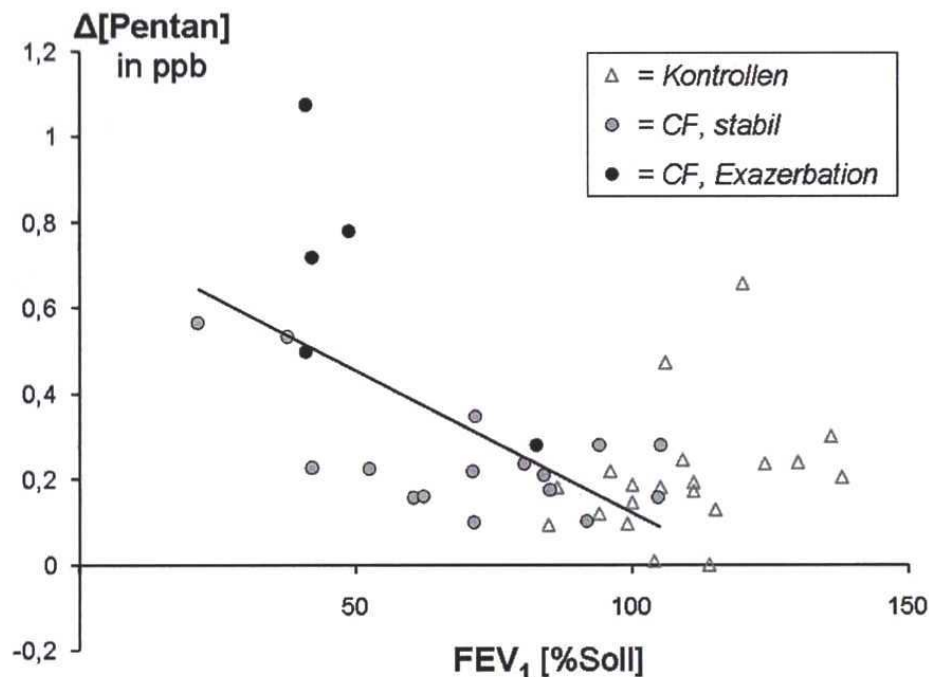
3.5 Einflussfaktoren

Die durch die Anamnese ermittelten Angaben der Patientengruppe - u.a. zum Genotyp und Krankheitsstatus, zur Medikamenteneinnahme, PSA-Besiedlung oder Belastung durch passiven Nikotinkonsum - wurden mit den berechneten Gradienten der Spurengase und den Parameter der Lungenfunktion korreliert.

Patienten mit pulmonaler Exazerbation exhalierten signifikant mehr Pentan als Patienten im stabilen Stadium (728 vs. 237ppt, $p < 0,01$). Dies war ebenfalls bei dystrophen Patienten (lineare Regression mit BMI_SDS, $p < 0,05$) sowie bei positivem PSA-Status (mittels t-Test, $p < 0,001$) der Fall. Bei Patienten mit CF-Diabetes konnte neben erhöhten Konzentrationen für Pentan ($p < 0,05$) vermehrt Isopren (141 vs. 89ppb, $p < 0,005$) festgestellt werden. DMS (1,43 vs. 4,95ppb, $p < 0,05$) und Methanol (109 vs. 229ppb, $p < 0,05$) wurden hingegen vermindert ausgeatmet. Pentan und Toluol standen im linearen Zusammenhang mit der Einsekundenkapazität FEV_1 ($r = -0,61$, $p < 0,004$ bzw. $r = 0,72$, $p < 0,005$). Bei Patienten unter Therapie mit inhalativen Steroiden konnte vermehrt Methanol nachgewiesen werden (331 vs. 118ppb, $p < 0,001$). Die Konzentrationsgradient für Ethan war unter inhalativer Antibiotikatherapie vermindert (-490 vs. 681ppt, $p < 0,01$). Neun Patienten waren durch Passivrauchen regelmäßig Nikotin ausgesetzt und exhalierten signifikant mehr Methanol (281 vs. 120ppb, $p < 0,01$) und DMS (6,11 vs. 2,07ppb, $p < 0,01$).

Es konnten keine signifikanten Zusammenhänge mit dem Genotyp (Anzahl der $\Delta F508$ -Allele), dem Atopiestatus und mit anderen Therapieformen wie der Verabreichung von β -Sympathomimetika, intravenösen Antibiotika oder DNase ermittelt werden.

Abbildung 9: Korrelation von Pentan-Gradient und FEV_1 bei stabilen bzw. exazerbierten CF-Patienten und gesunden Probanden



4. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Atemluft von Patienten mit Mukoviszidose und gesunden Testpersonen im Kindes- und Jugendalter zu analysieren und mögliche Unterschiede in den Konzentrationen von organischen Spurengasen herauszustellen. Daneben wurde untersucht, ob in der Patientengruppe Korrelationen zwischen diesen Atemgaskonzentrationen und weiteren Einflussfaktoren bestanden.

Dazu wurden nach einem standardisiertem Atemmanöver jeweils drei Atemproben und eine Raumluftprobe entnommen und mit einem speziellen Gaschromatographie-System analysiert und ausgewertet. Die Differenz aus Atem- und Raumluftproben wurde gebildet und statistisch mit den entsprechend ermittelten Werten der gesunden Testpersonen verglichen. Die Ergebnisse der Patientengruppe wurden in Zusammenhang gesetzt mit Einflussfaktoren wie dem Krankheitsstadium, der Medikamenteneinnahme, der PSA-Besiedlung der Lungen, dem Ergebnis der Lungenfunktion oder dem passiven Nikotinexposition.

Signifikante Unterschiede zwischen gesunden und erkrankten Testpersonen ergaben sich dabei für Pentan, 2-Propanol und Dimethylsulfid.

Im Folgenden sollen die Messergebnisse der flüchtigen Spurengase und der Einfluss verschiedener Faktoren auf die Ergebnisse diskutiert werden und die Bedeutung für die Entwicklung neuer diagnostischer Methoden im klinischen Alltag ausgeführt werden.

4.1 Flüchtige Spurengase

4.1.1 Pentan

Bei pathologischen Veränderungen der Lungen wurde in der Vergangenheit vermehrt Pentan in der Atemluft gemessen. Der Stoff gehört zur Gruppe der gesättigten Kohlenwasserstoffe mit der Strukturformel C_5H_{12} . OLOPADE ET AL. verglichen 23 Asthmapatienten, wovon 12 als akut und 11 als stabil eingestuft wurden, mit 17 gesunden Testpersonen und registrierten erhöhte Pentanwerte in der Atemluft bei Patienten mit akuten Asthmasymptomen [78]. In einer weiteren Arbeit von OLOPADE ET AL. wurden 20 Patienten mit obstruktivem Schlafapnoesyndrom auf erhöhte Pentan- und NO-Werte in der nasalen und oralen Atemluft hin untersucht [85]. Beide Stoffe traten vermehrt sowohl oral als auch nasal in der Patientengruppe auf, dabei vermehrt in morgens entnommenen Proben im Vergleich zu

abends. In beiden Arbeiten wurden Raumlufthproben entnommen, in denen kein Pentan nachgewiesen werden konnte. Pentan konnte bei pulmonalen Infekten bei Intensivpatienten in höherer Konzentration ermittelt werden [83]. Dies war auch bei extrapulmonalen Erkrankungen wie Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa der Fall [71, 72], wobei die Pentankonzentration mit der Entzündungsaktivität korrelierte.

In einer Veröffentlichung als Brief an den Herausgeber [109] beschrieben BILTON ET AL. nach einem Wash-out der Lungen von zehn Minuten signifikant erhöhte Werte für Pentan bei CF-Patienten (Mittelwert/Spannweite: 68/1-295 nmol/kg/min vs 2/1-3 nmol/kg/min, $p < 0,001$). Es finden sich keine Angaben zur Zahl der Probanden, zum Versuchsaufbau oder zur Zusammensetzung der inhalierten Luft.

In dieser Arbeit lag der Mittelwert des exhalieren Pentans bei CF-Patienten bei 547 ± 310 ppb, der Wert der gesunden Vergleichsgruppe lag bei 429 ± 230 ppb. Der Gradient für Pentan, sprich die Differenz aus Atem- und Raumlufth, war bei CF-Patienten signifikant erhöht (359 vs. 211ppb, $p < 0,04$). Innerhalb der CF-Gruppe exhalieren Patienten mit akuter pulmonaler Exazerbation vermehrt Pentan. Dies war ebenfalls bei PSA-Befall, bei dystrophen Patienten und bei CF-Diabetes der Fall. Pentan korrelierte negativ mit der forcierten Einsekundenkapazität FEV₁ in der Lungenfunktionsprüfung.

Wie in der Einleitung bereits beschrieben, führt der Defekt des CFTR-Proteins bei einem Großteil der CF-Patienten zur chronischen Infektion des Lungengewebes mit hohem Einfluss auf die Mortalitätsrate. Als Folge der chronischen Entzündung kann es zur vermehrten Lipid-Peroxidation kommen. Sowohl in vitro [61, 110] als auch in vivo [111] wurden erhöhte Pentanwerte in der Atemluft auf die Lipid-Peroxidation von ω -6 mehrfach ungesättigten Fettsäuren bzw. oxidativen Stress zurückgeführt [56, 61, 110, 111], unter anderem durch die Tatsache, dass exhalierter Pentan mit den Konzentrationen von Antioxidantien im Serum wie Selen und α -Tocopherol negativ korreliert [112, 113].

Die Messung von exhaliertem Pentan gibt daher scheinbar einen Hinweis für die Lipid-Peroxidation und damit auch für die Entzündungsaktivität im Lungengewebe. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen diese Annahme. Dies wird besonders durch die erhöhte Konzentration bei Patienten mit PSA-Befall - als Zeichen der chronischen Entzündung [15] - und mit akuter Exazerbation, also einer Verschlechterung des Entzündungsstatus, bekräftigt. Dies entspricht

einer Studie von MCGRATH ET AL. [114], in der während der akuten Exazerbation bei Mukoviszidose Marker der Lipid-Peroxidation sowie Entzündungsmarker signifikant verändert waren. Malondialdehyd und C-reaktives Protein traten zum Beispiel erhöht auf, der Gehalt der mehrfach ungesättigten Fettsäuren in der Erythrozytenmembran war erniedrigt. Nach Behandlung mit i.v.-Antibiotika fielen bzw. stiegen die Konzentrationen wieder, erreichten aber zum größten Teil nicht die Norm, als Zeichen der chronischen Infektion bei CF. Die Besiedlung der Lungen mit PSA spiegelt durch die Persistenz des Keims die chronische Entzündung wider [15] und führt zu erhöhter IL-8-Sekretion [115], ein Stimulus für neutrophile Granulozyten, die ihrerseits mittels Radikalbildung die Lipid-Peroxidation auslösen.

Eine erhöhte Entzündungsaktivität führt zu einem katabolen Energiehaushalt mit Gewichtsverlust, klinisch nachweisbar mittels BMI-Berechnung. Dieser Zusammenhang kann die negative Korrelation des korrigierten BMI der Patientengruppe mit Pentan erklären. Außerdem kommt es zur mangelnden Versorgung mit Antioxidantien, wie es MCGRATH ET AL. beschrieben hatten [114].

Bei Asthma wird über die Möglichkeit diskutiert, dass reaktive Oxidantien zu Bronchokonstriktion und so zu erniedrigten Ergebnissen für FEV₁ führen könnten [116], eine Annahme, die mit unseren Ergebnissen übereinstimmt. CF-assoziiertes Diabetes mellitus führt zu einer verminderten Lungenfunktion (niedriger FEV₁ und FVC) mit Verbesserung nach Beginn der Insulintherapie. Im Vergleich zu CF-Patienten ohne Diabetes ist auch der BMI signifikant vermindert [117-119]. Bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 bzw. Typ 2 konnte ebenfalls mittels Atemgasanalyse erhöhter oxidativer Stress nachgewiesen werden [120]. Diese Zusammenhänge können ursächlich für die vermehrte Exhalation von Pentan bei CF-Patienten mit Diabetes in dieser Studie sein.

Der Nachweis von Pentan in der Atemluft wurde in der Vergangenheit mehrfach kritisch betrachtet [121, 122]. Anlass dafür gaben besonders die unterschiedlichen Ergebnisse früherer Arbeiten, in denen die ermittelte Pentankonzentration bis zu 1000-fach variierte. SPRINGFIELD ET AL. nahmen an, dass in vielen Fällen nicht Pentan, sondern Isopren vermessen wurde, da beide Stoffe ähnliche Retentionszeiten haben [121, 122]. Diese Fehlerquelle läßt sich durch den Einsatz eines Massenspektrometers, wie von KOHLMÜLLER ET AL. [122] empfohlen und in dieser Arbeit verwendet, minimieren. Zum anderen wurde in zahlreichen Arbeiten die Außenluftkonzentration nicht bestimmt. Dies trifft für diese Studie nicht zu, der Zusammenhang

wird unter 4.3.1 ausführlich behandelt. Pentan ist lipophil und wird im Körper unter anderem zu CO_2 abgebaut [121, 123]. Eine interindividuell unterschiedlich starke Ausprägung des Pentanmetabolismus kann daher ebenfalls zu den unterschiedlichen Ergebnissen führen. Auch dieser Punkt wird unter 4.3. weiter diskutiert. Zusammenfassend sind also frühere Arbeiten über Pentan durchaus kritisch zu beurteilen. Dies betont die Notwendigkeit eines einheitlichen Probenentnahme- und Messsystems.

Unter diesen Bedingungen kann exhalierendes Pentan also zum einen als ein non-invasiver Marker zur Messung von entzündlichen Prozessen im Lungengewebe bei CF-Patienten genutzt werden. Zum anderen bietet der Nachweis die Möglichkeit, Pentan als diagnostisches Mittel bei Exazerbation und zur Therapiekontrolle zu verwenden.

4.1.2 Dimethylsulfid (DMS)

Dimethylsulfid (chemische Formel $(\text{CH}_3)_2\text{S}$) ist ein Thioether. Es wird durch Phytoplankton in den Ozeanen gebildet, kann aber auch bei der bakteriellen Verstoffwechslung von Methanthiol entstehen [124]. LABOWS ET AL. untersuchten den Gasraum von Kulturen verschiedener Pseudomonas-Stämme und wiesen unter anderem die verwandten Schwefelverbindungen Dimethyldisulfid und Dimethyltrisulfid nach [125].

DMS wurde erstmals 1970 von CHEN ET AL. [126] im menschlichen Atem untersucht. Es fand sich vermehrt bei Probanden mit Mundgeruch sowie bei Cystinose-Patienten mit Abfall unter Cysteamintherapie [127-129]. Möglicherweise kann es als Biomarker bei Exposition durch organische Schwefelverbindungen in Zellstofffabriken verwendet werden [130].

KAMBOURES ET AL. ermittelten bei 20 stabilen CF-Patienten und 23 gesunden Probanden die Gradienten (Atemluft minus Raumluft) von DMS, Carbonylsulfid (COS) und Schwefelkohlenstoff (CS_2) und stellten diese in Korrelation zu Medikamenteneinnahme und Lungenfunktion. Dabei wurde COS in beiden Gruppen pulmonal aufgenommen mit weniger negativen Werten und negativer Korrelation zu gemessenen Lungenfunktionsparametern bei CF-Patienten. CS_2 trat vermehrt bei CF auf, beide Stoffe korrelierten mit der Einnahme von DNase. DMS unterschied sich hingegen nicht signifikant [131].

In der vorliegenden Arbeit hingegen exhalierten CF-Patienten im Durchschnitt $3,89 \pm 3,53$ ppb DMS und damit signifikant weniger als die Kontrollgruppe ($7,58 \pm 3,96$ ppb), $p=0,003$). In den

Raumluftproben lag die Konzentration bis auf eine Ausnahme unter der Nachweisgrenze. Dies weist auf die Tatsache hin, dass DMS im großen Maße durch physiologische Prozesse im Körper produziert wird. DMS ist zudem ein sehr reaktives Gas in der Außenluft [131].

In mehreren Arbeiten konnte nachgewiesen werden, dass auf Grund des CF-Gendefekts Muzine des Lungensekrets vermehrt sulfatiert werden [132, 133]. Die Folgen dieser Molekülstrukturveränderung sind noch nicht genau bekannt. Fraglich ist, ob die Sulfatierung protektive Funktionen hat, da PSA die veränderten Kohlenhydrate weniger verstoffwechseln kann [134]. In vitro bildeten jedoch PSA und Burkholderia cepacia nach einiger Zeit Enzyme zur Desulfatierung der Muzine [135]. Möglich ist auch eine Beeinflussung der Lungensekretclearance [136]. Nach heutiger Kenntnis existiert keine Arbeit über den Zusammenhang von Dimethylsulfid als potentieller Sulfatdonator und der vermehrten Sulfatierung von Muzinen bei CF. Dies könnte die verminderte Konzentration von DMS in der Atemluft erklären, muss aber gewiss weiter überprüft werden.

DMS konnte bei Patienten mit Leberzirrhose nach oraler Gabe von Methionin vermehrt nachgewiesen werden und stand im Zusammenhang mit dem Foetor hepaticus [137].

Ein Zusammenhang zwischen den hier ermittelten Werten und der Leberfunktion ist hingegen eher unwahrscheinlich. Zwar kann CF zur Leberzirrhose führen, alle hier getesteten Patienten wiesen aber anamnestisch keine Zirrhosezeichen auf.

Patienten mit Diabetes mellitus in der Anamnese exhalieren signifikant weniger DMS als nicht betroffene Patienten. Unter Berücksichtigung der oben gezogenen Schlussfolgerung könnte dies, ähnlich wie bei Pentan, ein Zeichen für den fortgeschrittenen Krankheitsverlauf der Mukoviszidose sein.

Waren Patienten Nikotin in ihrer häuslichen Umgebung durch Passivrauch ausgesetzt, konnte DMS vermehrt in der Atemluft ermittelt werden. Genaue Zusammenhänge sind hier unbekannt.

4.1.3 2-Propanol

2-Propanol, auch Isopropanol genannt (Strukturformel C_3H_8O), ist ein Alkohol und wird in der chemischen Industrie unter anderem als Lösungs- und Frostschutzmittel eingesetzt, aber auch im medizinischen Bereich als kutanes Desinfektionsmittel. Im anaeroben Medium kann 2-Propanol bakteriell zu Aceton abgebaut werden [138]. In einigen Fallberichten wurde über die Interaktion von 2-Propanol beim Atemtest für Alkoholkonsum bei Personen unter ketonreicher Diät

berichtet, wobei Aceton mit Hilfe der Alkoholdehydrogenase in 2-Propanol umgewandelt wurde, welches zu falsch-positiven Werten für den Ethanolgehalt im Atemtest führte [139, 140].

In dieser Studie lagen alle ermittelten Gradienten für 2-Propanol im negativen Bereich, was für eine pulmonale Aufnahme des Stoffes spricht. Bei CF-Patienten war dies signifikant erhöht. Die Ursache hierfür ist momentan nicht bekannt, möglich wäre unter anderem eine bakterielle Verstoffwechslung des Alkohols im Lungengewebe der Patienten. Dieser interessante Sachverhalt bedarf sicherlich weiterer Untersuchungen.

4.1.4 Weitere Kohlenwasserstoffe

Ethan gehört zu den gesättigten Kohlenwasserstoffen und ist wie Pentan ein Produkt der Lipid-Peroxidation, besonders von ω -3 mehrfach ungesättigten Fettsäuren (Linolensäure und Derivate) [56]. Der Ethangehalt in Atemluftproben wurde in der Vergangenheit mehrfach untersucht, unter anderem im Zusammenhang mit Asthma oder COPD [81]. PAREDI ET AL. nahmen Atemproben von 23 CF-Patienten (n=10 unter Steroidbehandlung) und 14 gesunden Probanden und untersuchten Ethan, CO und NO in der Atemluft in Relation zur gemessenen Lungenfunktion [86]. Ethan war erhöht bei nicht behandelten Patienten im Vergleich zu Patienten unter Steroidtherapie und zur Vergleichsgruppe ($1,99 \pm 0,2$ ppb vs. $0,67 \pm 0,11$ ppb ($p < 0,01$) bzw. $0,82 \pm 0,09$ ppb ($p < 0,05$)), korrelierte positiv mit der CO-Konzentration und negativ mit dem Grad der Obstruktion.

In der vorliegenden Arbeit zeigte Ethan bei CF-Patienten keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zur Vergleichsgruppe, wurde aber innerhalb der CF-Gruppe bei Patienten unter inhalativer Antibiotikatherapie (n=5) vermindert exhaliiert. Ethan in der Atemluft korrelierte zudem positiv mit der Raumluftkonzentration ($r=0,63$), daher wurde wie auch bei den anderen untersuchten Stoffen die Differenz aus Atem- und Raumluft gebildet. Bei Paredi et al. wurde die Ethankonzentration in der Raumluft nicht berücksichtigt, ein möglicher Grund für das unterschiedliche Ergebnis. Der Zusammenhang zwischen dem Atemgaslevel und der therapeutischen Intervention verdeutlicht jedoch das Potential von Ethan als Marker zur Therapiekontrolle.

Propan, ein weiterer gesättigter Kohlenwasserstoff, wird in der Industrie als Kältemittel und Heizgas verwendet. Die Verbindung entsteht ebenfalls bei der Lipid-Peroxidation, nachgewiesen zum Beispiel bei Ratten und bei Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen [71, 141]. Sie

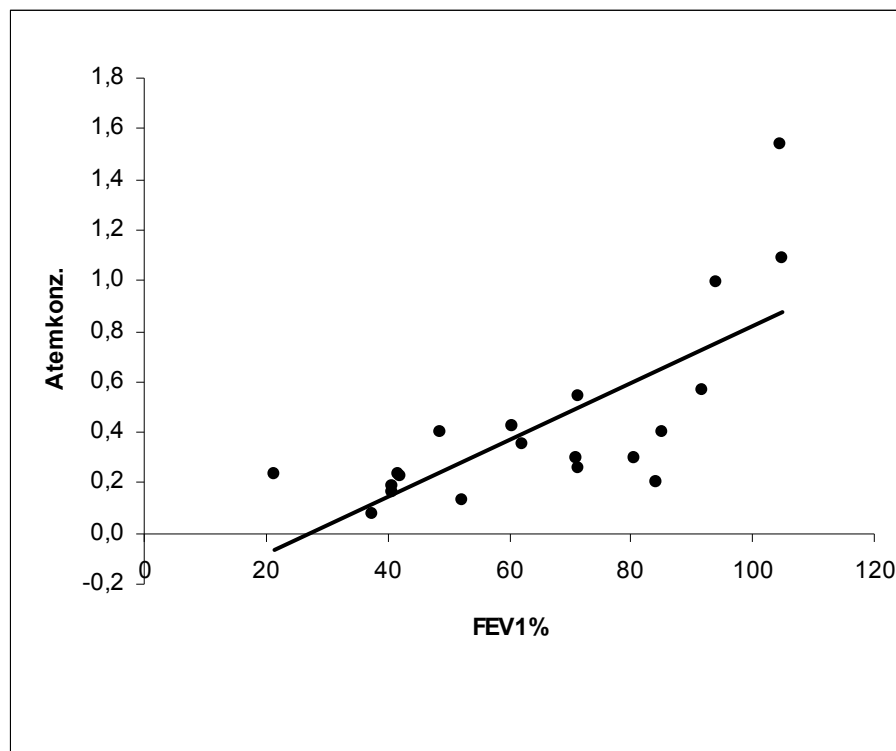
konnte aber auch bei Proteindegradierung *in vitro*, in der Darmflora und im Zigarettenrauch ermittelt werden [142-144].

Signifikante Unterschiede für Propan ließen sich in dieser Arbeit nicht feststellen. Daher scheint Propan als klinischer Marker nicht geeignet zu sein.

Zu den aromatischen Kohlenwasserstoffen gehören unter anderem Benzol und Toluol. Beide Stoffe kommen in Benzin, in Auto- und Industrieabgasen und in Zigarettenrauch vor [145-147]. Toluol eignet sich als Atemparameter zur Expositionskontrolle in der benzinverarbeitenden Industrie. Benzol, ein Karzinogen, kann als Biomarker für Zigarettenkonsum eingesetzt werden [145, 148].

Sowohl von CF-Patienten als auch von Probanden wurden beide Stoffe pulmonal aufgenommen, ohne signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen. Eine positive Korrelation bestand zwischen Toluol und dem FEV₁-Wert bei CF-Patienten ($r=0,56$, $p=0,006$)

Abbildung 10: Korrelation von Toluol (in ppb) und FEV1% (in %) bei CF-Patienten



Bei Isopren handelt es sich um eine ungesättigte Kohlenwasserstoffverbindung. Sie kommt in der Natur als Strukturbaustein in Bakterienmembranen vor und ist Ausgangsstoff für die Biosynthese von Steroiden, Terpenen und Carotinoiden. Der Isoprengehalt der Atemluft wird

durch die Cholesterinsynthese und durch körperliche Betätigung beeinflusst [66, 88, 89]. MCGRATH ET AL. untersuchte Atemproben von CF-Patienten im exazerbierten Zustand vor und nach i.v.-Antibiotikatherapie in Verbindung mit Messung systemischer Marker der Lipid-Peroxidation im Plasma im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe [64]. Sie wiesen dabei signifikant weniger Isopren bei CF während der Exazerbation nach, mit erhöhten Werten nach Behandlung. In dieser Arbeit konnte Isopren nur bei CF-Patienten mit Diabetes mellitus in erhöhter Konzentration ermittelt werden. Lediglich eine Arbeit - von NELSON ET AL - beschäftigt sich mit Isopren in Atemgasen und Diabetes mellitus im Kindesalter [149].

Hier konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Allerdings stieg die Isoprenemission mit dem Alter der Probanden an, ein Zusammenhang, der auch in dieser Arbeit auftrat. Zusammenfassend scheint Isopren nicht als Marker für den Entzündungsstatus bei CF geeignet zu sein.

4.1.5 Alkohole

Zu den Alkoholen zählen Methanol und Ethanol. Sie kommen vermehrt im Atem bei vorangegangenem Alkoholkonsum oder nach Mahlzeiten vor, was durch Fermentation der Nahrung durch Darmbakterien erklärbar ist [51, 150, 151]. Konzentrationsunterschiede konnten zwischen Gesunden und CF-Kranken nicht festgestellt werden. Alkoholkonsum wurde bei der Befragung der Versuchspersonen nach der Tagesaktivität nicht genannt. In der Patientengruppe weist Methanol signifikant erhöhte Werte bei Diabetes-mellitus-Patienten, bei inhalativer Steroidtherapie und bei passivem Nikotinkonsum auf. Ursachen hierfür sind nicht bekannt.

4.1.6 Ketonkörper

Aceton ist sicher das bekannteste Keton und ist, wie bereits erwähnt, in der Atemluft ein Zeichen für die diabetische Ketoazidose. Auch hier trat kein Unterschied zwischen Gesunden und CF-Patienten hinsichtlich der Konzentration auf. Patienten mit einem Diabetes mellitus wurden im stabilen Zustand vermessen, daher war hier eine Veränderung der Acetonwerte nicht zu erwarten.

4.1.7 Terpene

Terpene, eine große Gruppe von chemischen Substanzen, sind Hauptbestandteil von pflanzlichen ätherischen Ölen. Limonen trat in Atemluftproben im Zusammenhang mit Lebererkrankungen auf, konnte aber bei genauer Befragung der Patienten auf erhöhten Konsum von Früchten und Fruchtsaft zurückgeführt werden [152]. Die ermittelten Konzentrationen bei CF-Patienten unterschieden sich nicht von denen gesunder Probanden, allerdings enthielten Proben von CF-Patienten mit passivem Nikotinkonsum in der Anamnese vermindert α -Pinen. Ob hier ein Zusammenhang zur anti-oxidativen Wirkung von Monoterpenen, zu denen Limonen und α -Pinen gehören, besteht, ist nicht bekannt, da auch ihre genaue Herkunft in der Atemluft noch nicht entschlüsselt ist [153, 154]).

4.1.8 Stickstoffmonoxid (NO)

NO in der Atemluft wurde in der Vergangenheit mehrfach bei unterschiedlichen Erkrankungen untersucht. Mehrere Arbeiten belegen, dass im Falle von Asthma bronchiale NO einen potentiellen Atemmarker zur Erstdiagnose und Therapiekontrolle darstellt [98-101]. Untersuchungen bei Mukoviszidose ermittelten dagegen erniedrigte NO-Level. THOMAS ET AL. und BALFOUR-LYNN ET AL. nahmen nasale und pulmonale Gasproben von CF-Patienten und wiesen erniedrigte Konzentrationen in nasal entnommenen Proben nach. [103, 155]. THOMAS ET AL. gelang dies auch in pulmonalen Proben, in beiden Fällen ohne Zusammenhang zu weiteren Parametern wie der Lungenfunktion oder Steroidtherapie. Bei GRASEMANN ET AL. hingegen korrelierten NO-Atemgasproben auch positiv mit der forcierten Vitalkapazität FVC [156]. In neueren Arbeiten wurden Patienten mit und ohne Pankreasinsuffizienz verglichen. Die Gruppe mit Pankreasinsuffizienz exhalierte nasal weniger NO, PSA-positive Patienten in geringerer Konzentration als PSA-negative [104].

Es existieren verschiedenste Erklärungsansätze für die normale bis verminderte Exhalation von NO bei Mukoviszidose. Die Mutation des CFTR-Proteins bedingt eine verminderte Expression der NOS, ein Zusammenhang, der mehrfach in vitro nachgewiesen werden konnte [157, 158]. Weiterhin wird durch den zähen Mukus in den Lungen die Diffusion von NO in den Alveolarraum behindert. Dies wird durch den positiven Einfluss von DNase auf die NO-Konzentration und die Lungenfunktion bestätigt [159]. Gebildetes NO kann im Lungengewebe auch direkt weiter reagieren und daher nicht in der Atemluft auftreten. Der erhöhte Anteil von

Nitrit und Nitrat, zwei Reaktionsprodukten aus NO, in Sputum und Atemkondensat bei CF-Patienten läßt diese Schlussfolgerung zu [160, 161]. GRASEMANN ET AL. substituierten inhalativ L-Arginin, ein Substrat der NO-Synthase, und registrierten vermehrt NO in der Atemluft von 13 Patienten [162]. Der Anstieg der NO-Konzentration korrelierte mit dem Anstieg von FEV₁ und der O₂-Sättigung. Ursache für vermindertes NO könnte also auch die verminderte Konzentration von NOS-Substrat sein.

Der Einfluss der normalen bis verminderten NO-Konzentration auf die Pathophysiologie und den Krankheitsverlauf von CF ist noch ungewiss. In vitro führte der niedrige NO-Gehalt zu einem erleichterten Wachstum von PSA [157]. In Tierversuchen kam es nach Inhibition von NOS zur verstärkten pulmonalen Muskelkontraktion, allerdings erst nach Allergen-Inhalation [163]. Nitrosothiol wird eine muskelrelaxierende Wirkung zugesprochen [164].

Bei den hier untersuchten Patienten konnten keine signifikanten Unterschiede in der NO-Konzentration festgestellt werden. Diese Ergebnisse decken sich mit den oben genannten Erklärungsansätzen und stimmen mit den Ergebnissen von HO ET AL. überein, die beim Vergleich von 21 CF-Patienten zu 12 Gesunden leicht verminderte Konzentrationen ohne statistische Signifikanz ermitteln konnten [160].

Stickstoffmonoxid scheint daher kein Parameter der Entzündungsaktivität bei Mukoviszidose zu sein, sondern ist eher ein weiterer Einflussfaktor in der komplexen Pathophysiologie. Die medikamentöse Intervention in den NO-Metabolismus könnte eine weitere Therapieoption bei CF darstellen.

4.2 Einflussfaktoren

Innerhalb der Patientengruppe beeinflusst eine Vielzahl von Faktoren die Konzentration der gemessenen Atemgase. Dabei steht wie bereits erwähnt besonders Pentan in Korrelation zu Parametern des akuten Entzündungsstatus des Patienten (wie der pulmonalen Exazerbation, dem PSA-Befall oder der Lungenfunktion).

4.2.1 Diabetes mellitus

CF-assoziiertes Diabetes mellitus korreliert signifikant mit einigen der gemessenen Atemgase. Nach PHILLIPS ET AL. kann dies im Zusammenhang mit erhöhtem oxidativen Stress stehen [120]. Der genaue Zusammenhang zwischen den einzelnen chemischen Stoffen und der

Pathophysiologie von Diabetes mellitus bei Mukoviszidose ist allerdings noch unklar und bedarf weiterer Klärung.

4.2.2 Passivrauchen

Neun Patienten waren passiv Nikotin in ihrer Umgebung ausgesetzt. Die Inhalation von freien Radikalen im Zigarettenrauch kann zur Lipid-Peroxidation führen, nachweisbar unter anderem durch erhöhte Malondialdehydkonzentrationen im Serum und Blut von Rauchern [165, 166]. Entsprechende Arbeiten belegen den Anstieg von Ethan, Pentan und Benzol in der Atemluft bei Zigarettenkonsum [167-169]. Benzol fand man auch vermehrt in der Atemluft von Passivrauchern und in häuslicher Umgebungsluft, in der geraucht wurde [170, 171].

Dies war in dieser Studie nicht der Fall. Innerhalb der CF-Gruppe exhalierten Patienten vermehrt Methanol und DMS. α -Pinen war dagegen vermindert nachweisbar. Menge und Häufigkeit der gerauchten Zigaretten in der Umgebung wurden bei uns nicht erfasst, ebenso wurde der letztmalige Zeitpunkt des passiven Zigarettenkonsums nicht festgehalten. Es ist daher schwierig, konkrete Schlüsse aus den unterschiedlichen Konzentrationen zu ziehen. Die Daten zeigen jedoch, dass auch der Zigarettenkonsum in der Umgebung Einfluss auf die Zusammensetzung der Atemluft bei Mukoviszidosepatienten hat und die gemessenen Spurengase eventuell andere pathologische Vorgänge widerspiegeln können.

4.2.3 Genetik

PAREDI ET AL. [172] wiesen vermehrt Kohlenmonoxid in Atemproben bei homozygoten im Vergleich zu heterozygoten Genträgern der $\Delta F508$ -Mutation nach, was hier für flüchtige Spurengase in Bezug auf die Anzahl der $\Delta F508$ -Allele nicht bestätigt werden konnten. Ebenso wenig stand der Atopiestatus der Patienten mit den Atemgasen in Zusammenhang.

4.2.4 Nahrungsaufnahme

Im Tierversuch konnte bei Nahrungsentzug ein verminderter Ethanwert in der Atemluft festgestellt werden unter Abhängigkeit von der O_2 -Konzentration in der Umgebungsluft [173].

Unter parenteraler Ernährung, besonders mittels Lipidemulsion, konnte ein Anstieg für Pentan registriert werden, sowohl bei Erwachsenen als auch bei Säuglingen [113, 174]. Dies wird auf die erhöhte Substratbereitstellung für die Lipid-Peroxidation erklärt. ZARLING ET AL.

untersuchten 29 gesunde Probanden, die nach einer Fastenzeit über Nacht eine flüssige Standardnahrung zu sich genommen hatten, und konnten dagegen keinen signifikanten Unterschied in den Pentan- und Ethankonzentrationen der Atemluft ausmachen [175]. Bei einer ähnlichen Arbeit von SMITH ET AL. wurde ein Abfall für Aceton und ein Anstieg für Ethanol registriert [176]. Isopren blieb unverändert, Ammonium fiel initial ab mit anschließendem Anstieg über den Ausgangswert. Aceton entstand vermehrt während des Fastens durch Decarboxylierung von Acetoacetat. Der Anstieg von Ethanol wurde auf den Gehalt in der Nahrung zurückgeführt.

Ethan und Pentan als Marker der lipiden Peroxidation scheinen daher nicht unter dem Einfluss der oralen Nahrungsaufnahme zu stehen. Wie jedoch bei SMITH ET AL. verdeutlicht, interagieren andere Spurengase mit der Einnahme von Mahlzeiten. Daher sollte diese während der Durchführung von Atemgasmessungen unterlassen werden, um reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen. Die hier untersuchten Testpersonen fasteten während der Probenentnahme. Keiner der CF-Patienten wurde parenteral ernährt.

4.2.5 Körperliche Aktivität

Verschiedene flüchtige Spurengase in der Atemluft wurden in der Vergangenheit im Zusammenhang mit körperlicher Aktivität gemessen. Pentan und Ethan traten dabei in erhöhter Konzentration auf, was auf eine vermehrte Lipid-Peroxidation hinweist [177]. Isopren sank hingegen nach einem initialen Peak ab [89, 178]. Physische Anstrengung bei CF-Patienten führt zu einer vermehrten Ausschüttung von Entzündungsmediatoren, mit Lipid-Peroxidation als möglicher Folge [179].

Es erscheint daher sinnvoll, vor der Durchführung von Atemgasmessungen eine Ruhepause für die Testpersonen festzulegen, wie dies auch in dieser Arbeit geschehen ist. Fragen zur körperlichen Betätigung wurden zwar gestellt, jedoch nur in offener Form ohne quantitative Analyse. Daher konnten keine Schlussfolgerungen zwischen den Angaben und den Atemgaskonzentrationen gezogen werden.

4.3 Metabolismus flüchtiger Spurengase

Die Konzentration exhalierter organischer Spurengase wird durch vielerlei Faktoren beeinflusst, unter anderem durch die inhalierte Umgebungsluft, die Produktion, den Abbau im Organismus und die Speicherung im Körpergewebe.

4.3.1 Inhalation und Speicherung

In der Umgebungsluft finden sich unweigerlich eine Vielzahl von Spurengasen, die in der exhalieren Atemluft in unterschiedlicher Konzentration wieder auftreten können, je nach dem, ob der Körper die inhalierten Stoffe pulmonal absorbiert oder sie ebenfalls produziert.

In der Vergangenheit wurde in einigen Arbeiten auf die Bestimmung der Umgebungsluftkonzentration der flüchtigen Spurengase verzichtet [73, 74, 86]. Dies führte zu Messungenauigkeiten und ist wahrscheinlich ein Grund für die große Spannweite der Messergebnisse [121]. Um den Einfluss der Umgebungsluft bei der Vermessung von Atemluft möglichst gering zu halten, können Testpersonen entweder gereinigte Luft für einen bestimmten Zeitraum einatmen (Washout-Methode) oder man ermittelt die Differenz aus Atem- und Raumluft. In einigen Arbeiten wird die Washout-Methode bevorzugt, dabei variieren die Washout-Zeiten von 4min über 10-15min bis hin zu 90min bei MORITA ET AL. [112, 113, 180-182]. Im letztgenannten Fall wurde ein Abfall der Pentankonzentration innerhalb des 90min-Washouts gemessen und in drei Phasen unterteilt: Phase 1 mit initialem Konzentrationsabfall durch Wash-out des Gasvolumens entsprechend der Residualkapazität; Phase 2 mit langsamem Abfall durch Washout von Organ-, Muskel- und Fettgewebe und schließlich Phase 3 mit Erreichen eines Plateaus repräsentativ der endogenen Bildung von Pentan [180]. Diese drei Phasen können interindividuell stark variieren. Bei Erkrankungen, die zur expiratorischen pulmonalen Obstruktion führen (Asthma, COPD, CF), verbleiben vermehrt Gasvolumina in der Lunge (Trapped air), die unregelmäßig exhalieren werden. Dies führt zu einer Verlängerung der ersten Phase bzw. Kontamination der 3. Phase. Phase 2 ist unter anderem abhängig von der Durchblutung des Gewebes und dem Löslichkeitsverhalten des Stoffes (hydrophil/lipophil). Im Tierversuch wurde zudem deutlich, dass selbst eine Washout-Zeit von 90min nicht ausreicht, um Pentan aus dem Fettgewebe zu entfernen [121]. Daher erscheint es sinnvoller und reproduzierbarer, die Kontamination durch die Umgebungsluft wie in der vorliegenden Arbeit mittels Differenzbildung zu berücksichtigen. Diese Methode wurde bereits vorher vielfach angewendet [79, 183-185].

4.3.2 Produktion

GELMONT ET AL. [186] stellten die Theorie auf, dass flüchtiges Pentan von Darmbakterien gebildet wird und somit kein geeigneter Marker für die lipide Peroxidation ist. Dagegen spricht, dass Pentan und andere Kohlenwasserstoffe mit dem Mangel an Vitamin E korrelieren. Da

Bakterien besonders im Dickdarm vorkommen, Vitamin E aber im Dünndarm absorbiert wird, ist es unwahrscheinlich, dass zugeführtes Vitamin E die Produktion durch Bakterien hemmen kann [82]. Zudem konnten bei Frühgeborenen in den ersten Lebenstagen ohne bakterielle Besiedlung des Darms [187, 188] und bei Patienten nach kompletter Darmresektion [181] vermehrt Pentan gemessen werden. Zwar wird pro Mol Hydroperoxid nur 0,002 mol Pentan gebildet, der Nachweis *in vitro*, die Korrelation mit anderen Parametern und der Zusammenhang mit Antioxidantien läßt trotzdem den Schluss zu, dass flüchtige Kohlenwasserstoffe in der Atmung durch Lipid-Peroxidation entstehen.

4.3.3 Abbau

Kohlenwasserstoffe, die bei der Lipid-Proxidation entstehen, werden größtenteils in der Leber durch Unterformen der Cytochrom-P₄₅₀-Peroxidase abgebaut. Dieser Vorgang kann interindividuell unter anderem in der Schnelligkeit variieren. Im Tierversuchmodell konnte mehrfach eine erhöhte Alkanonzentration nach Inhibition der Peroxidase nachgewiesen werden [189-191]. Unter anderem wurde Ethanol, Na-Diethyldithiocarbamat, CCl₄ und 4-Methylpyrazol verwendet.

Die Cytochrom-P₄₅₀-Peroxidase kommt besonders in der Leber und der Nebennierenrinde vor, hat eine breite Substratspezifität und spielt eine elementare Rolle in der Biotransformation von chemischen Stoffen wie zum Beispiel von Medikamenten. Verschiedene Pharmaka können die Enzymgruppe sowohl inhibieren als auch induzieren. Zu den Inhibitoren zählen Virustatika wie Indinavir und Antibiotika wie Erythromycin oder Clarithromycin. Antikonvulsiva wie Phenytoin und Carbamazepin oder Glukokortikoide wie Dexamethason wirken hingegen induktorisch. Lebererkrankungen mit eingeschränkter Organfunktion können ebenfalls zur verminderten Enzymfunktion führen. Diese Aspekte müssen sicherlich bei der Interpretation von Arbeiten über exhalierte Spurengase, besonders bei Konzentrationsunterschieden von Kohlenwasserstoffen, bedacht werden. Die hier vermessenen CF-Kranken hatten anamnestisch keine klinisch relevante Leberbeteiligung, nahmen aber natürlich eine Vielzahl von Medikamenten ein. Bei CF-Patienten handelt es sich häufig um eine Dauermedikation. Bei Vergleichsmessungen innerhalb einer Patientengruppe kann dieser Faktor daher vernachlässigt werden. Messungen, die unterschiedliche Therapieschemata vergleichen oder zur Verlaufskontrolle beispielsweise unter *i.v.*-Antibiose dienen, können aber durchaus durch Induktion oder Inhibition des Stoffwechsels der Spurengase beeinflusst werden. Genaue Zahlen, *in vivo* gemessen, liegen jedoch noch nicht vor. Daher bleibt abzuwarten, in welcher

Größenordnung Spurengase durch die Cytochrom-P₄₅₀-Peroxidase abgebaut werden und in wie weit dies beeinflusst werden kann.

4.4 Probenentnahme und –analyse

4.4.1 Atemmanöver

Das Atemmanöver bei der Probenentnahme hat entscheidenden Einfluss auf die Reproduzierbarkeit des Versuchs und muss bei jeder Probenentnahme nach dem gleichen Schema durchgeführt werden. Bei Entnahme ohne vorherige Instruktion neigen Probanden zur Hyperventilation [150].

Der Atemanteil des Totraumvolumens nimmt nicht am Gasaustausch teil und enthält zum größten Teil Umgebungsluft. Daher muss dieser Teil vor der eigentlichen Probenentnahme gesondert ausgeatmet werden. Eine Zeitspanne von 1- 2 sec hat sich dabei bewährt [79, 86, 192]. Eine andere Möglichkeit zu Trennung besteht in der CO₂-gesteuerten Probenentnahme. CO₂ hat in der Alveolarluft einen Anteil von ca. 4% im Gegensatz zu ca. 0,0035% in der Umgebungsluft [193]. SCHUBERT ET AL. und COPE ET AL. führten Atemgasmessungen CO₂-gesteuert durch und registrierten beide vermehrt Isopren bei Erreichen des CO₂-Plateaus [150, 194]. Die Konzentration von Kohlendioxid hängt von der Ventilation und Beschaffenheit des Lungengewebes ab. Daher kann kein allgemeingültiger Wert angegeben werden, bei dem das ausgeatmete Volumen dem Alveolarvolumen entspricht. Innerhalb eines Individuums ist dieser Wert bei gleichem Atemmanöver recht konstant [195]. Daher stellt die CO₂-kontrollierte Probenentnahme eine Möglichkeit zur Verbesserung der intraindividuellen Variabilität dar. LEVITT ET AL. verglichen mehrere Atemmanöver miteinander und stellten fest, dass nach Luftanhalten von 20 sec. die Konzentrationen von H₂, CO₂, CH₄ und CO höher waren als bei Probanden ohne Luftanhalten [196]. Dazu waren die letzten drei von vier gemessenen Proben über 500ml, sprich nach Ausatmung des Totraumvolumens, konstanter. Das Anhalten des Atems führt also zu einer erhöhten Homogenität der Atemluft und daher zu einer verbesserten intraindividuellen Reproduzierbarkeit des Versuchs.

4.4.2 Probenbehälter

In der Vergangenheit wurde eine Vielzahl von verschiedenen Probenbehältern verwendet. In den meisten Fällen handelt es sich um Probenbeutel, Kunststoffspritzen, beschichtete

Adsorptionsröhrchen oder Edelstahlbehälter. Die eingesetzten Materialien müssen möglichst chemisch inert sowie undurchlässig für die gesammelten Gasgemische sein und diese so lange wie möglich stabil lagern können. Hinsichtlich dieser Kriterien traten besonders bei der Verwendung von Probenbeuteln (z.B. Tedlar[®]-Bags) und Kunststoffspritzen Probleme auf [66, 193]. Der Einsatz von Adsorptionsröhrchen kann durch erhöhte Wasseranreicherung und durch unterschiedliches Adsorptionsverhalten bei hoch-reaktiven Verbindungen zu Messungenauigkeiten führen. Edelstahlbehälter scheinen daher zurzeit das geeignetste Material zu sein. PLEIL ET AL. verwendeten Behälter der Marke SUMMA[®] und bezogen sich auf Arbeiten über deren Lagerungsverhalten bei Umgebungsluftproben [195]. In dieser Arbeit unterlagen die Behälter jedoch bei der Lagerung von Atemluftproben im Vergleich zu den verwendeten Silco-Steel[®] Behältern.

4.4.3 Analysesystem

Zur Analyse flüchtiger Spurengase stehen verschiedene Systeme zur Verfügung. Polare Stoffe wie NO, CO oder Alkohole können mittels Laser- bzw. Infrarotspektroskopie oder Chemilumineszenz untersucht werden. Chemilumineszenzmessungen von NO als Echtzeitverfahren haben sich in der Praxis durchgesetzt [197, 198]. In neueren Arbeiten werden häufig massenspektrometrische Detektoren eingesetzt. Dazu zählen die „selected ion flow tube-“ und die „proton transfer reaction mass spectrometry“, kurz SIFT-MS bzw. PTR-MS. Beide arbeiten nach dem gleichen Prinzip: Generierte Ionen in einem Trägergas (H_3O^+ , NO^+ und O_2^+ -Ionen bei SIFT-MS, H_3O^+ -Ionen bei PTR-MS) reagieren mit dem Analysat zu Produktionen, die mittels Massenspektrometrie analysiert werden. Diese Online-Verfahren haben eine Nachweisgrenze im unteren ppb-Bereich, weisen aber bei der Identifikation von gleichen Produktionen aus unterschiedlichen Eduktionen Schwierigkeiten bei der Auswertung auf.

In der Analyse von flüchtigen Spurengasen hat sich die Verwendung der Gaschromatographie, zum Teil in Verbindung mit Massenspektrometrie oder Flammenionisationsdetektoren etabliert. Das Verfahren bietet die Möglichkeit, ein breites Spektrum an Spurengasen mit hoher Spezifität und Sensitivität (im unteren ppt-Bereich) zu untersuchen [193].

Zwar sind die primären Anschaffungskosten für Geräte und Räumlichkeiten recht hoch, die eigentliche Probenanalyse ist dafür aber kostengünstig. Die Off-line-Messung ist zeitaufwändig und birgt freilich viele Fehlerquellen während der Probenentnahme und dem Anschluss an das System. Des Weiteren beeinflussen Faktoren wie die Qualität des Kalibrierstandards und die Reproduzierbarkeit der Peakfläche und dessen Integration das Messergebnis. Der Unterschied

zwischen der angegebenen und der tatsächlichen Zusammensetzung von Eichgasen wird mit $\leq 5\%$ angegeben (Apel-Riemer Environmental Inc.). Der Flussregler, der die quantitative Zufuhr des Proben-Gases bestimmt, arbeitete mit einer Unsicherheit von $< 2\%$. Die Unsicherheit der Berechnung der Regressionsgeraden der einzelnen Verdünnungsschritte lag bei $< 5\%$. Ungenauigkeiten bei der Vermessung der Peakfläche können in einer Größenordnung von $< 6\%$ auftreten, die Reproduzierbarkeit liegt bei $\leq 4\%$. Der Gesamtfehler des Analysesystems lag bei 12% .

Es ist von enormer Wichtigkeit, ein standardisiertes Verfahren zur Probenentnahme und zum Anschluss der Behälter zu verwenden, um solche Fehler so gering wie möglich zu halten und Ergebnisse wissenschaftlicher Arbeiten vergleichbar zu machen.

Die Atemgasmessungen können außerdem durch zwei weitere Faktoren gestört werden: durch den H_2O - und den CO_2 -Gehalt der Atemluft. Der Wasseranteil in den Proben kann zum einen hydrophile Substanzen absorbieren, zum anderen zur Verschiebungen von Retentionszeiten führen. Durch das Einsetzen einer Kühlfalle vor dem Einleiten des Gasgemisches wird der H_2O -Anteil möglichst klein gehalten. Außerdem haben Voruntersuchungen am verwendeten Gerät gezeigt, dass der Zusatz von Wasserdampf keinen Einfluss auf die Messergebnisse hat. CO_2 kann ebenfalls zu Retentionszeitverschiebungen führen und taucht dazu mit einem eigenen großen Peak im Chromatogramm auf. Durch Verdünnung der Proben vor jeder Messung ist dieser Faktor allerdings verschwindend gering.

Die ermittelten Atemgaskonzentrationen variierten innerhalb einer Testperson zwischen 8% (Ethan und Aceton) und 38% (Ethanol). Dies liegt unter anderem an Messfehlern des GC-Systems und der digitalen Auswertung der einzelnen Peaks, wird aber als tolerabel bewertet. Interindividuelle Variationskoeffizienten lagen zwischen 28% (Ethan) und 215% (Ethanol). Der hohe Unterschied bei Alkoholen ist wahrscheinlich auf unterschiedliche Emissionen aus dem Gastrointestinaltrakt der einzelnen Testpersonen zurückzuführen. Interindividuelle Unterschiede innerhalb der Patientengruppe können dazu den unterschiedlichen Krankheits- und somit auch Entzündungsstatus widerspiegeln.

4.5 Schlussfolgerung

In den vergangenen drei Jahrzehnten ist die Atemgasanalyse in das Interesse der Wissenschaft gerückt. Eine Vielzahl von flüchtigen Spurengasen wurde im Zusammenhang mit verschiedenen Krankheitsbildern untersucht. Ziel ist es, Spurengase zu ermitteln, die als Biomarker in der täglichen klinischen Routine einsetzbar sind. Besonders bei Erkrankungen mit pulmonaler Beteiligung wie Asthma oder Mukoviszidose wäre ein solcher Biomarker von großer Bedeutung, da bereits existierende Verfahren zur Diagnose und Verlaufskontrolle nicht in der Lage sind, non-invasiv ein lokales Bild von Entzündungsvorgängen in der Lunge wiederzugeben. Zu den Anforderungen an einen solchen Marker gehören dabei zum einen eine enge Korrelation mit den zu untersuchenden pathologischen Vorgängen mit hoher Sensitivität und Spezifität. Zum anderen muss ein non-invasives, reproduzierbares, kostengünstiges und einfach zu interpretierendes Nachweisverfahren verwendet werden, das bei der Durchführung nicht mit den pathologischen Vorgängen interagiert oder sie induziert und je nach Ausprägung unterschiedliche Behandlungsstrategien zur Folge hat.

Pentan nimmt in der Gruppe der untersuchten Stoffe eine besondere Rolle ein. Die Herkunft in der Atemluft kann relativ sicher auf die Peroxidation von Fettsäuren zurückgeführt werden, bedingt durch vermehrten oxidativen Stress bei akuter oder chronischer Entzündung. Konzentrationsunterschiede traten mehrfach in Untersuchungen bei extrapulmonalen und pulmonalen Erkrankungen auf. In der vorliegenden Arbeit konnte ein solcher Unterschied bei Kindern und Jugendlichen mit Mukoviszidose im Vergleich zu einer gesunden Vergleichsgruppe ermittelt werden. Zudem ließen sich signifikante Zusammenhänge zu wichtigen Parametern des Krankheitsverlaufs der Mukoviszidose – wie der chronischen Pseudomonasinfektion, der akuten Exazerbation, verminderter Lungenfunktion und Unterernährung - herstellen. Der Nachweis von Pentan hat daher großes Potential bei der Entwicklung eines Biomarkers für die pulmonale Entzündungsaktivität bei CF. Die Ergebnisse für DMS und 2-Propanol verdeutlichen, dass andere Spurengase ebenfalls im Zusammenhang mit der Pathophysiologie und dem Krankheitsverlauf von CF stehen können. Daher sollte in zukünftigen Untersuchungen ein breites Spektrum von Atemgasen wie in diesem Falle berücksichtigt werden. Allerdings ist noch sehr wenig über den Metabolismus der meisten Spurengase im menschlichen Stoffwechsel bekannt. Normwerte über Konzentrationen bzw. Exkretionsraten sind ebenfalls noch nicht verfügbar.

Im Laufe der Jahre wurden neue Messverfahren eingeführt und verbessert. Die Probenentnahme und Analyse mittels Gaschromatographie stellt ein non-invasives Verfahren dar, mit hoher Sensitivität und Spezifität. Dies trifft auch für das hier verwendete GC-Gerät aus der atmosphärischen Chemie zu. Allerdings begrenzen die oben erwähnten Nachteile wie zum Beispiel der hohe Zeitaufwand den Einsatz in der klinischen Routine.

Bei der Entwicklung von Stickstoffmonoxid als Biomarker in der Diagnostik und Therapie von Asthma bronchiale konnten viele der genannten Probleme bereits gelöst werden. Es liegen verlässliche Daten zur Herkunft, Pathophysiologie und Normwerten vor, ein standardisiertes Probeentnahmeverfahren mittels eines portablen Analysegeräts wurde entwickelt. Daher ist der Einsatz im Klinikalltag nur noch eine Frage der Zeit. Leider hat sich NO nicht als möglicher Biomarker bei Mukoviszidose herausgestellt, was mit dieser Arbeit abermals belegt werden konnte.

Zukünftige Bemühungen sollten also in drei Richtungen gehen:

Erstens muss der genaue Stoffwechsel der analysierten flüchtigen Spurengase aufgeklärt werden, um bei ihrem Einsatz als Biomarker eine höchstmögliche Validität zu sichern.

Zweitens müssen mittels Durchführung von großangelegten Feldstudien Normwerte für Konzentrationen und Exkretionsraten der einzelnen Verbindungen im Atemgas ermittelt werden. Die ersten Ansätze in diese Richtung sind gemacht. MOSER ET AL. untersuchten 344 Testpersonen, TURNER ET AL. nahmen Proben von 30 Testpersonen über einen Zeitraum von sechs Monaten [57-59, 199].

Drittens muss ein portables Messgerät zur On-line-Messung mit hoher Sensitivität und Spezifität entwickelt werden, um schnell und einfach Atemgasproben im klinischen Alltag zu vermessen. VON BASUM ET AL. verzeichneten hier erste Erfolge mit dem Einsatz eines „tunable diode laser“ (TDL)-Spektrometers, eines laser-gestützten Atemanalysegeräts, bei der Ermittlung von Ethan [200].

Viele der genannten Probleme können sicherlich in nicht allzu ferner Zukunft gelöst werden. Die Entwicklungen in diesem Gebiet können zur weiteren Verbesserung in der Überlebensrate und der Lebensqualität der betroffenen Patienten führen und die Bemühungen zur Heilung der Mukoviszidose einen weiteren Schritt voranbringen.

5. Zusammenfassung

Die Mukoviszidose bzw. Cystische Fibrose (CF) als autosomal-rezessiv vererbte Multisystemerkrankung führt durch Funktionsstörung und –verlust der exokrinen Drüsen des Organismus unter anderem zu chronisch bronchialer Entzündung und Infektion. Nach wie vor ist es nicht möglich, durch nicht-invasive diagnostische Messmethoden ein objektives Bild des Entzündungsstatus der Lunge wiederzugeben. Lediglich indirekte Parameter wie zum Beispiel die Lungenfunktionsdiagnostik stehen zur Verfügung.

Chronische Entzündungsprozesse tragen zu vermehrter Lipid-Peroxidation bei, mit flüchtigen organischen Spurengasen (=VOC) in der Atemluft als mögliche Endprodukte dieser Reaktion. Die Atemgasanalyse bietet daher eine potentielle Nachweismöglichkeit dieser Prozesse an und wurde mehrfach bei Arbeiten über pulmonale und extrapulmonale Erkrankungen eingesetzt, jedoch ohne eindeutige Ergebnisse oder einheitliche Messmethoden. Stickstoffmonoxid wird ebenfalls über die Atemluft freigesetzt. Dabei korrelieren erhöhte Konzentrationen bei atopischem Asthma bronchiale mit der Entzündungsaktivität, bei CF hingegen zeigen frühere Arbeiten normale bis erniedrigte Werte im Vergleich mit gesunden Probanden.

Ziel dieser Arbeit war es erstens zu untersuchen, ob sich Atemgasproben von gesunden und an CF erkrankten Versuchspersonen im Kindes- und Jugendalter hinsichtlich ihrer VOC-Konzentrationen unterscheiden und somit diese als diagnostische Parameter für CF zu verwenden sind. Zweitens wurde der Einfluss weiterer Parameter auf die Atemgaskonzentrationen innerhalb der Patientengruppe überprüft. Drittens wurde die Einsatzmöglichkeit eines atmosphärischen Gaschromatographiesystems zur Atemgasanalyse und der Einfluss von Versuchsaufbau und –ablauf evaluiert.

Zunächst wurde in Vorversuchen ein Standardverfahren zur Probenentnahme und –analyse mit einer Reproduzierbarkeit von 10% etabliert. Im Anschluss wurden Atem- und Raumluftproben von je 20 gesunden und an CF erkrankten Probanden gewonnen und die VOC-Konzentrationen vermessen. Der pulmonale Austausch einer Substanz wurde als alveolärer Gradient (Differenz aus exhalierter Luft und Raumluft) ausgedrückt und zum Gruppenvergleich zwischen Gesunden und an CF erkrankten Probanden herangezogen. Dieser ergab signifikante Unterschiede für Pentan (vermehrt exhalieret), 2-Propanol (vermehrt pulmonal aufgenommen) und Dimethylsulfid (vermindert exhalieret). Konzentrationsunterschiede für NO waren nicht nachweisbar.

Ein erhöhter alveolärer Gradient für Pentan war bei den CF-Patienten mit einer pulmonalen Exazerbation, Dystrophie, positivem PSA-Status und CF-Diabetes assoziiert. Weiterhin waren

VOC-Konzentrationen bei Patienten mit verminderter Einsekundenkapazität FEV₁ und bei Passivrauchen und medikamentöser Therapie mit inhalativen Steroiden bzw. Antibiotika in der Anamnese verändert.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass besonders exhaliertes Pentan das Potential eines non-invasiven Markers zur Erfassung von pulmonalen entzündlichen Prozessen bei CF-Patienten hat. Die gemessenen Konzentrationsunterschiede für Dimethylsulfid und 2-Propanol sind aufgrund der bestehenden Unklarheiten über Ursprung und Metabolismus schwierig zu interpretieren, sind jedoch sicherlich interessante Ansatzpunkte für die Zukunft. Die Konzentration von NO in der Atemluft scheint dagegen nicht im Zusammenhang mit entzündlichen Vorgängen bei CF zu stehen, was mit früheren Publikationen übereinstimmt.

Die Ergebnisse dieser Arbeiten bilden eine Grundlage für weitere Forschungsarbeiten über flüchtige Kohlenwasserstoffe im Atemgas. Es gilt, genauere Daten über Herkunft und Metabolismus der VOCs zu ermitteln, einfachere Analyseverfahren zu etablieren und mögliche Biomarker für pulmonal-entzündliche Prozesse zu evaluieren. Diese Schritte können den Einsatz dieser Biomarker in der Diagnose und Behandlung der Mukoviszidose und anderer pulmonaler Erkrankungen möglich machen.

6. Literaturverzeichnis

1. Anderson DH. Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease: clinical and pathological study. *Am J Dis Child* 1938;56:344-399
2. http://www.who.int/genomics/publications/en/HGN_WB_04.02_report.pdf
3. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989;245:1066-73
4. Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B et al. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 1989;245:1059-65
5. <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/StatisticsPage.html>
6. Costa M, Potvin S, Berthiaume Y et al. Diabetes: a major co-morbidity of cystic fibrosis. *Diabetes Metab* 2005;31:221-32
7. Jarzabek K, Zbucka M, Pepiński W et al. Cystic fibrosis as a cause of infertility. *Reprod Biol* 2004;4:119-29
8. Di Sant' Agnese PA, Darling RC, Perera GA, Shea E. Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas, its clinical significance and relationship to the disease. *Pediatrics* 1953;12:549-563
9. Konstan MW, Berger M. Current understanding of the inflammatory process in cystic fibrosis: onset and etiology. *Pediatr Pulmonol* 1997;24:137-42
10. Joo NS, Irokawa T, Robbins RC, Wine JJ. Hyposecretion, not hyperabsorption, is the basic defect of cystic fibrosis airway glands. *J Biol Chem* 2006;281:7392-8
11. Strausbaugh SD, Davis PB. Cystic fibrosis: a review of epidemiology and pathobiology. *Clin Chest Med* 2007;28:279-88
12. Pier GB. Role of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in innate immunity to *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:8822-8
13. Imundo L, Barasch J, Prince A, Al-Awqati Q. Cystic fibrosis epithelial cells have a receptor for pathogenic bacteria on their apical surface. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92:3019-23
14. Boucher RC. New concepts of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Eur Respir J* 2004;23:146-158
15. Courtney JM, Ennis M, Elborn JS. Cytokines and inflammatory mediators in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2004;3:223-31
16. Tümmler B, Kiewitz C. Cystic fibrosis: an inherited susceptibility to bacterial respiratory infections. *Mol Med Today* 1999;5:351-8
17. Valenza G, Tappe D, Turnwald D et al. Prevalence and antimicrobial susceptibility of microorganisms isolated from sputa of patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2008;7:123-7
18. Bakare N, Rickerts V, Bargon J, Just-Nübling G. Prevalence of *Aspergillus fumigatus* and other fungal species in the sputum of adult patients with cystic fibrosis. *Mycoses* 2003; 46:19-23
19. Konstan MW, Hilliard KA, Norvell TM, Berger M. Bronchoalveolar lavage findings in cystic fibrosis patients with stable, clinically mild lung disease suggest ongoing infection and inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;150:448-54
20. Sagel SD. Noninvasive biomarkers of airway inflammation in cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med* 2003;9:516-21
21. Bonfield TL, Panuska JR, Konstan MW et al. Inflammatory cytokines in cystic fibrosis lungs. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:2111-8.

22. Norman D, Elborn JS, Cordon SM et al. Plasma tumour necrosis factor alpha in cystic fibrosis. *Thorax* 1991;46:91-95
23. Tabary O, Corvol H, Boncoeur E et al. Adherence of airway neutrophils and inflammatory response are increased in CF airway epithelial cell-neutrophil interactions. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006;290:588-96
24. Chmiel JF, Berger M, Konstan MW. The role of inflammation in the pathophysiology of CF lung disease. *Clin Rev Allergy Immunol* 2002;23:5-27
25. Castellani C, Southern KW, Brownlee K et al. European best practice guidelines for cystic fibrosis neonatal screening. *J Cyst Fibros* 2009;8:153-73
26. Wilcken B. Newborn screening for cystic fibrosis: techniques and strategies. *J Inherit Metab Dis* 2007;30:537-43
27. De Boeck K, Wilschanski M, Castellani C et al. Diagnostic Working Group Cystic fibrosis: terminology and diagnostic algorithms. *Thorax* 2006;61:627-35
28. Bhalla M, Turcios N, Aponte V et al. Cystic fibrosis: scoring system with thin-section CT. *Radiology* 1991;179:783-8
29. Brody AS, Klein JS, Molina PL, Quan J, Bean JA, Wilmott RW. High-resolution computed tomography in young patients with cystic fibrosis: distribution of abnormalities and correlation with pulmonary function tests. *J Pediatr* 2004;145:32-38
30. Puderbach M, Eichinger M., Gahr J et al. Proton MRI appearance of cystic fibrosis: comparison to CT. *Eur Radiol* 2007;17:716-24
31. Hilliard TN, Regamey N, Shute JK et al. Airway remodelling in children with cystic fibrosis. *Thorax* 2007;62:1074-80
32. Matthews LW, Doershuk CF, Wise M, Eddy G, Nudelman H, Spector S. A therapeutic regimen for patients with Cystic Fibrosis. *J Pediatr* 1964; 65:558-75
33. Cheer SM, Waugh J, Noble S. Inhaled tobramycin (TOBI): a review of its use in the management of *Pseudomonas aeruginosa* infections in patients with cystic fibrosis. *Drugs* 2003;63:2501-20
34. Chuchalin A, Csiszér E, Gyurkovics K et al. A formulation of aerosolized tobramycin (Bramitob) in the treatment of patients with cystic fibrosis and *Pseudomonas aeruginosa* infection: a double-blind, placebo-controlled, multicenter study. *Paediatr Drugs* 2007;9:21-31
35. Hordvik NL, Sammut PH, Judy CG, Colombo JL. Effects of standard and high doses of salmeterol on lung function of hospitalized patients with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 1999;27:43-53
36. Ziebach R, Pietsch-Breitfeld B, Bichler M, Busch A, Riethmüller J, Stern M. Bronchodilatory effects of salbutamol, ipratropium bromide, and their combination: double-blind, placebo-controlled crossover study in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 2001;31:431-5
37. Frederiksen B, Pressler T, Hansen A, Koch C, Høiby N. Effect of aerosolized rhDNase (Pulmozyme) on pulmonary colonization in patients with cystic fibrosis. *Acta Paediatr* 2006;95:1070-4
38. Duijvestijn YC, Brand PL. Systematic review of N-acetylcysteine in cystic fibrosis. *Acta Paediatr* 1999;88:38-41
39. Saiman L, Marshall BC, Mayer-Hamblett N et al. Macrolide Study Group. Azithromycin in patients with cystic fibrosis chronically infected with *Pseudomonas aeruginosa*: a randomized controlled trial. *JAMA* 2003;290:1749-56
40. Smyth A. Prophylactic antibiotics in cystic fibrosis: a conviction without evidence? *Pediatr Pulmonol* 2005;40:471-6
41. Lands LC, Milner R, Cantin AM, Manson D, Corey M. High-dose ibuprofen in cystic fibrosis: Canadian safety and effectiveness trial. *J Pediatr* 2007;151:249-54

42. Konstan MW, Schluchter MD, Xue W, Davis PB. Clinical Use of Ibuprofen is Associated with Slower FEV1 Decline in Children with Cystic Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;176:1084-9
43. Eigen H, Rosenstein BJ, FitzSimmons S, Schidlow DV. A multicenter study of alternate-day prednisone therapy in patients with cystic fibrosis. Cystic Fibrosis Foundation Prednisone Trial Group. *J Pediatr* 1995;126:515-23
44. Cheng K, Ashby D, Smyth R. Oral steroids for cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2000;(2):CD000407
45. Baumann U, Göcke K, Gewecke B, Freihorst J, von Specht BU. Assessment of pulmonary antibodies with induced sputum and bronchoalveolar lavage induced by nasal vaccination against *Pseudomonas aeruginosa*: a clinical phase I/II study. *Respir Res* 2007;8:57
46. McKone EF, Goss CH, Aitken ML. CFTR genotype as a predictor of prognosis in cystic fibrosis. *Chest* 2006;130:1441-7
47. Lai HJ, Cheng Y, Cho H, Kosorok MR, Farrell PM. Association between initial disease presentation, lung disease outcomes, and survival in patients with cystic fibrosis. *Am J Epidemiol* 2004;159:537-46
48. Courtney JM, Bradley J, Mccaughan J et al. Predictors of mortality in adults with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 2007;42:525-32
49. Pedreira CC, Robert RG, Dalton V et al. Association of body composition and lung function in children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 2005;39:276-80
50. Davis SD, Fordham LA, Brody AS et al. Computed tomography reflects lower airway inflammation and tracks changes in early cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175:943-50
51. Wilson PF, Freeman CG, McEwan MJ, Milligan DB, Allardyce RA, Shaw GM. Alcohol in breath and blood: a selected ion flow tube mass spectrometric study. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2001;15:413-7
52. Hlastala MP. The alcohol breath test-a review. *J Appl Physiol* 1998;84:401-8
53. Romagnuolo J, Schiller D, Bailey RJ. Using breath tests wisely in a gastroenterology practice: an evidence-based review of indications and pitfalls in interpretation. *Am J Gastroenterol* 2002;97:1113-26
54. Pauling L, Robinson AB, Teranishi R, Cary P. Quantitative analysis of urine vapor and breath by gas-liquid partition chromatography. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971;68:2374-6
55. Krotoszynski B, Gabriel G, O'Neil H. Characterization of human expired air: a promising investigative and diagnostic technique. *J Chromatogr Sci* 1977;15:239-44
56. Kneepkens CM, 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
57. Turner C, Spanel P, Smith D. A longitudinal study of ammonia, acetone and propanol in the exhaled breath of 30 subjects using selected ion flow tube mass spectrometry, SIFT-MS. *Physiol Meas* 2006;27:321-37
58. Turner C, Spanel P, Smith D. A longitudinal study of breath isoprene in healthy volunteers using selected ion flow tube mass spectrometry (SIFT-MS). *Physiol Meas* 2006;27:13-22
59. Turner C, Spanel P, Smith D. A longitudinal study of methanol in the exhaled breath of 30 healthy volunteers using selected ion flow tube mass spectrometry, SIFT-MS. *Physiol Meas* 2006;27:637-48
60. Aghdassi E, Allard JP. Breath alkanes as a marker of oxidative stress in different clinical conditions. *Free Radic Biol Med* 2000;28:880-6

61. Dumelin EE, Tappel AL. Hydrocarbon gases produced during in vitro peroxidation of polyunsaturated fatty acids and decomposition of preformed hydroperoxides. *Lipids* 1977;12:894-900
62. Van Gossum A, Decuyper J. Breath alkanes as an index of lipid peroxidation. *Eur Respir J* 1989;2:787-91
63. Tappel AL, Dillard CJ. In vivo lipid peroxidation: measurement via exhaled pentane and protection by vitamin E. *Fed Proc* 1981;40:174-8
64. McGrath LT, Patrick R, Mallon P et al. Breath isoprene during acute respiratory exacerbation in cystic fibrosis. *Eur Respir J* 2000;16:1065-9
65. Corradi M, Pignatti P, Manini P et al. Comparison between exhaled and sputum oxidative stress biomarkers in chronic airway inflammation. *Eur Respir J* 2004;24:1011-7
66. Kneepkens CM, Lepage G, Roy CC. The potential of the hydrocarbon breath test as a measure of lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med* 1994;17:127-60
67. Hull J, Vervaart P, Grimwood K, Phelan P. Pulmonary oxidative stress response in young children with cystic fibrosis. *Thorax* 1997;52:557-60
68. Brown RK, Kelly FJ. Evidence for increased oxidative damage in patients with cystic fibrosis. *Pediatr Res* 1994;36:487-93
69. Portal BC, Richard MJ, Faure HS, Hadjian AJ, Favier AE. Altered antioxidant status and increased lipid peroxidation in children with cystic fibrosis. *Am J Clin Nutr* 1995; 61:843-7
70. Reid DW, Misso N, Aggarwal S, Thompson PJ, Walters EH. Oxidative stress and lipid-derived inflammatory mediators during acute exacerbations of cystic fibrosis. *Respirology* 2007;12:63-9
71. Pelli MA, Trovarelli G, Capodicasa E, De Medio GE, Bassotti G. Breath alkanes determination in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Dis Colon Rectum* 1999;42:71-6
72. Kokoszka J, Nelson RL, Swedler WI, Skosey J, Abcarian H. Determination of inflammatory bowel disease activity by breath pentane analysis. *Dis Colon Rectum* 1993;36:597-601
73. 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
74. Weitz ZW, Birnbaum AJ, Sobotka PA, Zarling EJ, Skosey JL. High breath pentane concentrations during acute myocardial infarction. *Lancet* 1991;337:933-5
75. Cope KA, Solga SF, Hummers LK, Wigley FM, Diehl AM, Risby TH. Abnormal exhaled ethane concentrations in scleroderma. *Biomarkers* 2006;11:70-84
76. Lettéron P, Duchatelle V, Berson A et al. Increased ethane exhalation, an in vivo index of lipid peroxidation, in alcohol-abusers. *Gut* 1993;34:409-14
77. Moscarella S, Caramelli L, Mannaioni PF, Gentilini P. Effect of alcoholic cirrhosis on ethane and pentane levels in breath. *Boll Soc Ital Biol Sper* 1984;60:529-33
78. Olopade CO, Zakkar M, Swedler WI, Rubinstein I. Exhaled pentane levels in acute asthma. *Chest* 1997;111:862-5
79. Paredi P, Kharitonov SA, Barnes PJ. Elevation of exhaled ethane concentration in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:1450-4
80. Habib MP, Tank LJ, Lane LC, Garewal HS. Effect of vitamin E on exhaled ethane in cigarette smokers. *Chest* 1999;115:684-90
81. Kharitonov SA, Barnes PJ. Exhaled markers of inflammation. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2001;1:217-24
82. Kharitonov SA, Barnes PJ. Exhaled markers of pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:1693-722
83. Schubert JK, Müller WP, Benzing A, Geiger K. Application of a new method for analysis of exhaled gas in critically ill patients. *Intensive Care Med* 1998;24:415-21

84. Scholpp J, Schubert JK, Miekisch W, Geiger K. Breath markers and soluble lipid peroxidation markers in critically ill patients. *Clin Chem Lab Med* 2002;40:587-94
85. Olopade CO, Christon JA, Zakkar M et al. Exhaled pentane and nitric oxide levels in patients with obstructive sleep apnea. *Chest* 1997;111:1500-4
86. Paredi P, Kharitonov SA, Leak D et al. Exhaled ethane is elevated in cystic fibrosis and correlates with carbon monoxide levels and airway obstruction. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:1247-51
87. Likhodii SS, Musa K, Cunnane SC. Breath acetone as a measure of systemic ketosis assessed in a rat model of the ketogenic diet. *Clin Chem* 2002;48:115-20
88. Stone BG, Besse TJ, Duane WC, Evans CD, DeMaster EG. Effect of regulating cholesterol biosynthesis on breath isoprene excretion in men. *Lipids* 1993;28:705-8
89. Karl T, Prazeller P, Mayr D et al. Human breath isoprene and its relation to blood cholesterol levels: new measurements and modeling. *J Appl Physiol* 2001; 91:762-70
90. Ost D, Shah RD, Fein D, Fein AM. To screen or not to screen: a volatile issue in lung cancer. *Chest* 2003;123:1788-92
91. Poli D, Carbognani 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
92. Wilson N. Measurement of airway inflammation in asthma. *Curr Opin Pulm Med* 2002;8:25-32
93. Meng QH, Springall DR, Bishop AE et al. Lack of inducible nitric oxide synthase in bronchial epithelium: a possible mechanism of susceptibility to infection in cystic fibrosis. *J Pathol* 1998;184:323-31
94. Paredi P, Kharitonov SA, Barnes PJ. Analysis of expired air for oxidation products. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:31-7
95. American Thoracic Society; European Respiratory Society. ATS/ERS recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide, 2005. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171:912-30
96. Lúdvíksdóttir D, Janson C, Högman M, Hedenström H, Björnsson E, Boman G. Exhaled nitric oxide and its relationship to airway responsiveness and atopy in asthma. BHR-Study Group. *Respir Med* 1999;93:552-6
97. Bodini A, Peroni D, Loiacono A et al. Exhaled nitric oxide daily evaluation is effective in monitoring exposure to relevant allergens in asthmatic children. *Chest* 2007;132:1520-5
98. Miraglia del Giudice M, Piacentini GL, Capasso M et al. Formoterol, montelukast, and budesonide in asthmatic children: effect on lung function and exhaled nitric oxide. *Respir Med* 2007;101:1809-13
99. Kharitonov SA, Barnes PJ. Does exhaled nitric oxide reflect asthma control? Yes, it does! . *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:727-8
100. Warke TJ, Fitch PS, Brown V et al. Exhaled nitric oxide correlates with airway eosinophils in childhood asthma. *Thorax* 2002;57:383-7
101. Crater SE, Peters EJ, Martin ML, Murphy AW, Platts-Mills TA. Expired nitric oxide and airway obstruction in asthma patients with an acute exacerbation. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:806-11
102. Elphick HE, Demoncheaux EA, Ritson S, Higenbottam TW, Everard ML. Exhaled nitric oxide is reduced in infants with cystic fibrosis. *Thorax* 2001;56:151-2
103. Thomas SR, Kharitonov SA, Scott SF, Hodson ME, Barnes PJ. Nasal and exhaled nitric oxide is reduced in adult patients with cystic fibrosis and does not correlate with cystic fibrosis genotype. *Chest* 2000;117:1085-9

104. Keen C, Olin AC, Edentoft A, Gronowitz E, Strandvik B. Airway nitric oxide in patients with cystic fibrosis is associated with pancreatic function, Pseudomonas infection, and polyunsaturated fatty acids. *Chest* 2007;131:1857-64
105. Cole TJ. The LMS method for constructing normalized growth standards. *Eur J Clin Nutr* 1990;44:45-60
106. Kromeyer-Hauschild K, Wabitsch M, Kunze D, Geller F, Geiß H, Hesse V. Percentiles of body mass index in children and adolescents evaluated from different regional German studies. *Monatsschr Kinderheilkd* 2001;149:807-818
107. Miller MR, Crapo R, Hankinson J et al.; ATS/ERS Task Force. General considerations for lung function testing. *Eur Respir J* 2005;26:153-61
108. Zapletal A, Chalupová J. Forced expiratory parameters in healthy preschool children (3-6 years of age). *Pediatr Pulmonol* 2003;35:200-7
109. Bilton D, Maddison J, Webb AK, Seabra L, Jones M, Braganza JM. Cystic fibrosis, breath pentane, and lipid peroxidation. *Lancet* 1991;337:1420
110. Donovan DH, Menzel DB. Mechanisms of lipid peroxidation: iron catalyzed decomposition of fatty acid hydroperoxides as the basis of hydrocarbon evolution in vivo. *Experientia* 1978;34:775-6
111. Riely CA, Cohen G, Lieberman M. Ethane evolution: a new index of lipid peroxidation. *Science* 1974;183:208-10
112. Lemoyne M, Van Gossum A, Kurian R, Jeejeebhoy KN. Plasma vitamin E and selenium and breath pentane in home parenteral nutrition patients. *Am J Clin Nutr* 1988;48:1310-5
113. Van Gossum A, Shariff R, Lemoyne M, Kurian R, Jeejeebhoy K. Increased lipid peroxidation after lipid infusion as measured by breath pentane output. *Am J Clin Nutr* 1988;48:1394-9
114. McGrath LT, Mallon P, Dowey L et al. Oxidative stress during acute respiratory exacerbations in cystic fibrosis. *Thorax* 1999;54:518-23
115. Scheid P, Kempster L, Griesenbach U et al. Inflammation in cystic fibrosis airways: relationship to increased bacterial adherence. *Eur Respir J* 2001;17:27-35
116. Barnes PJ. Reactive oxygen species and airway inflammation. *Free Radic Biol Med* 1990;9:235-43
117. Lanng S, Thorsteinsson B, Nerup J, Koch C. Diabetes mellitus in cystic fibrosis: effect of insulin therapy on lung function and infections. *Acta Paediatr* 1994;83:849-53
118. Lanng S, Thorsteinsson B, Nerup J, Koch C. Influence of the development of diabetes mellitus on clinical status in patients with cystic fibrosis. *Eur J Pediatr* 1992;151:684-7
119. Koch C, Rainisio M, Madessani U et al. Investigators of the European Epidemiologic Registry of Cystic Fibrosis. Presence of cystic fibrosis-related diabetes mellitus is tightly linked to poor lung function in patients with cystic fibrosis: data from the European Epidemiologic Registry of Cystic Fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 2001;32:343-50
120. Phillips M, Cataneo RN, Cheema T, Greenberg J. Increased breath biomarkers of oxidative stress in diabetes mellitus. *Clin Chim Acta* 2004;344:189-94
121. Springfield JR, Levitt MD. Pitfalls in the use of breath pentane measurements to assess lipid peroxidation. *J Lipid Res* 1994;35:1497-504
122. Kohlmüller D, Kochen W. Is n-pentane really an index of lipid peroxidation in humans and animals? A methodological reevaluation. *Anal Biochem* 1993;210:268-76
123. Daugherty MS, Ludden TM, Burk RF. Metabolism of ethane and pentane to carbon dioxide by the rat. *Drug Metab Dispos* 1988;16:666-71
124. Lomans BP, van der Drift C, Pol A, Op den Camp HJ. Microbial cycling of volatile organic sulfur compounds. *Cell Mol Life Sci* 2002;59:575-88

125. Labows JN, McGinley KJ, Webster GF, Leyden JJ. Headspace analysis of volatile metabolites of *Pseudomonas aeruginosa* and related species by gas chromatography-mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 1980;12:521-6
126. Chen S, Zieve L, Mahadevan V. Mercaptans and dimethyl sulfide in the breath of patients with cirrhosis of the liver. Effect of feeding methionine. *J Lab Clin Med* 1970;75:628-35
127. Suarez FL, Furne JK, Springfield J, Levitt MD. Morning breath odor: influence of treatments on sulfur gases. *J Dent Res* 2000;79:1773-7
128. Gahl WA, Ingelfinger J, Mohan P, Bernardini I, Hyman PE, Tangerman A. Intravenous cysteamine therapy for nephropathic cystinosis. *Pediatr Res* 1995;38:579-84
129. Besouw M, Blom H, Tangerman A, de Graaf-Hess A, Levitchenko E. The origin of halitosis in cystinotic patients due to cysteamine treatment. *Mol Genet Metab* 2007;91:228-33
130. Jäppinen P, Kangas J, Silakoski L, Savolainen H. Volatile metabolites in occupational exposure to organic sulfur compounds. *Arch Toxicol* 1993;67:104-6
131. Kamboures MA, Blake DR, Cooper DM et al. Breath sulfides and pulmonary function in cystic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:15762-7
132. Zhang Y, Doranz B, Yankaskas JR, Engelhardt JF. Genotypic analysis of respiratory mucous sulfation defects in cystic fibrosis. *J Clin Invest* 1995;96:2997-3004
133. Cheng PW, Boat TF, Cranfill K, Yankaskas JR, Boucher RC. Increased sulfation of glycoconjugates by cultured nasal epithelial cells from patients with cystic fibrosis. *J Clin Invest* 1989;84:68-72
134. Chance DL, Mawhinney TP. Carbohydrate sulfation effects on growth of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 2000;146:1717-25
135. Jansen HJ, Hart CA, Rhodes JM, Saunders JR, Smalley JW. A novel mucin-sulphatase activity found in *Burkholderia cepacia* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol* 1999;48:551-7
136. Chace KV, Leahy DS, Martin R, Carubelli R, Flux M, Sachdev GP. Respiratory mucous secretions in patients with cystic fibrosis: relationship between levels of highly sulfated mucin component and severity of the disease. *Clin Chim Acta* 1983;132:143-55
137. Tangerman A, Meuwese-Arends MT, van Tongeren 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
138. Tonouchi A. Anaerobic 2-propanol degradation in anoxic paddy soil and the possible role of methanogens in its degradation. *Curr Microbiol* 2004;49:75-8
139. Jones AW, Andersson L. Biotransformation of acetone to isopropanol observed in a motorist involved in a sobriety check. *J Forensic Sci* 1995;40:686-7
140. Jones AW, Rössner S. False-positive breath-alcohol test after a ketogenic diet. *Int J Obes (Lond)* 2007;31:559-61
141. Clemens MR, Remmer H, Waller HD. Phenylhydrazine-induced lipid peroxidation of red blood cells in vitro and in vivo: monitoring by the production of volatile hydrocarbons. *Biochem Pharmacol* 1984;33:1715-8
142. Kivits GA, Ganguli-Swarttouw MA, Christ EJ. The composition of alkanes in exhaled air of rats as a result of lipid peroxidation in vivo. Effects of dietary fatty acids, vitamin E and selenium. *Biochim Biophys Acta* 1981;665:559-70
143. Kessler W, Remmer H. Generation of volatile hydrocarbons from amino acids and proteins by an iron/ascorbate/GSH system. *Biochem Pharmacol* 1990;39:1347-51
144. Persson KA, Berg S, Törnqvist M, Scalia-Tomba GP, Ehrenberg L. Note on ethene and other low-molecular weight hydrocarbons in environmental tobacco smoke. *Acta Chem Scand B* 1988;42:690-6

145. Chen ML, Chen SH, Guo BR, Mao IF. Relationship between environmental exposure to toluene, xylene and ethylbenzene and the expired breath concentrations for gasoline service workers. *J Environ Monit* 2002;4:562-6
146. Wallace LA. Major sources of benzene exposure. *Environ Health Perspect* 1989;82:165-9
147. Corradi M, Poli D, Selis L et al. Volatile hydrocarbons in exhaled air: preliminary data on the characteristic profile associated with lung tumors. *G Ital Med Lav Ergon* 2003;25:59-60
148. Fustinoni S, Consonni D, Campo L et al. Monitoring low benzene exposure: comparative evaluation of urinary biomarkers, influence of cigarette smoking, and genetic polymorphisms. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:2237-44
149. Nelson N, Lagesson V, Nosratabadi AR, Ludvigsson J, Tagesson C. Exhaled isoprene and acetone in newborn infants and in children with diabetes mellitus. *Pediatr Res* 1998;44:363-7
150. Cope KA, Watson MT, Foster WM, Sehnert SS, Risby TH. Effects of ventilation on the collection of exhaled breath in humans. *J Appl Physiol* 2004;96:1371-9
151. Taucher J, Lagg A, Hansel A, Vogel W, Lindinger W. Methanol in human breath. *Alcohol Clin Exp Res* 1995;19:1147-50
152. Friedman MI, Preti G, Deems RO, Friedman LS, Munoz SJ, Maddrey WC. Limonene in expired lung air of patients with liver disease. *Dig Dis Sci* 1994;39:1672-6
153. Foti MC, Ingold KU. Mechanism of inhibition of lipid peroxidation by gamma-terpinene, an unusual and potentially useful hydrocarbon antioxidant. *J Agric Food Chem* 2003;51:2758-65
154. Takahashi Y, Inaba N, Kuwahara S, Kuki W. Antioxidative effect of citrus essential oil components on human low-density lipoprotein in vitro. *Biosci Biotechnol Biochem* 2003;67:195-7
155. Balfour-Lynn IM, Lavery A, Dinwiddie R IM. Reduced upper airway nitric oxide in cystic fibrosis. *Arch Dis Child* 1996;75:319-22
156. Grasemann H, Michler E, Wallot M, Ratjen F. Decreased concentration of exhaled nitric oxide (NO) in patients with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 1997;24:173-7
157. Kelley TJ, Drumm ML. Inducible nitric oxide synthase expression is reduced in cystic fibrosis murine and human airway epithelial cells. *J Clin Invest* 1998;102:1200-7
158. Steagall WK, Elmer HL, Brady KG, Kelley TJ. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-dependent regulation of epithelial inducible nitric oxide synthase expression. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000;22:45-50
159. Grasemann H, Lax H, Treseler JW, Colin AA. Dornase alpha and exhaled NO in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 2004 Nov;38(5):379-85
160. Ho LP, Innes JA, Greening AP. Nitrite levels in breath condensate of patients with cystic fibrosis is elevated in contrast to exhaled nitric oxide. *Thorax* 1998;53:680-4
161. Jones KL, Hegab AH, Hillman BC et al. Elevation of nitrotyrosine and nitrate concentrations in cystic fibrosis sputum. *Pediatr Pulmonol* 2000;30:79-85
162. Grasemann H, Kurtz F, Ratjen F. Inhaled L-arginine improves exhaled nitric oxide and pulmonary function in patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174:208-12
163. Persson MG, Friberg SG, Hedqvist P, Gustafsson LE. Endogenous nitric oxide counteracts antigen-induced bronchoconstriction. *Eur J Pharmacol* 1993;249:7-8
164. Gaston B, Sears S, Woods J et al. Bronchodilator S-nitrosothiol deficiency in asthmatic respiratory failure. *Lancet* 1998;351:1317-9
165. Kalra J, Chaudhary AK, Prasad K. Increased production of oxygen free radicals in cigarette smokers. *Int J Exp Pathol* 1991;72:1-7

166. Pryor WA, Stone K. Oxidants in cigarette smoke. Radicals, hydrogen peroxide, peroxyxynitrate, and peroxyxynitrite. *Ann N Y Acad Sci* 1993;686:12-28
167. Do BK, Garewal HS, Clements NC Jr, Peng YM, Habib MP. Exhaled ethane and antioxidant vitamin supplements in active smokers. *Chest* 1996;110:159-64
168. Hoshino E, Shariff R, Van Gossum A et al. Vitamin E suppresses increased lipid peroxidation in cigarette smokers. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1990;14:300-5
169. Gordon SM, Wallace LA, Brinkman MC, Callahan PJ, Kenny DV. Volatile organic compounds as breath biomarkers for active and passive smoking. *Environ Health Perspect* 2002;110:689-98
170. Wallace LA, Pellizzari ED. Personal air exposures and breath concentrations of benzene and other volatile hydrocarbons for smokers and nonsmokers. *Toxicol Lett* 1987;35:113-6
171. Wallace L, Pellizzari E, Hartwell TD, Perritt R, Ziegenfus R. Exposures to benzene and other volatile compounds from active and passive smoking. *Arch Environ Health* 1987;42:272-9
172. Paredi P, Shah PL, Montuschi P et al. Increased carbon monoxide in exhaled air of patients with cystic fibrosis. *Thorax* 1999;54:917-20
173. Habib MP, Dickerson F, Mooradian AD. Ethane production rate in vivo is reduced with dietary restriction. *J Appl Physiol* 1990;68:2588-90
174. Wispe JR, Bell EF, Roberts RJ. Assessment of lipid peroxidation in newborn infants and rabbits by measurements of expired ethane and pentane: influence of parenteral lipid infusion. *Pediatr Res* 1985;19:374-9
175. Zarling EJ, Mobarhan S, Bowen P, Sugerman S. Oral diet does not alter pulmonary pentane or ethane excretion in healthy subjects. *J Am Coll Nutr* 1992;11:349-52
176. Smith D, Spanel P, Davies S. Trace gases in breath of healthy volunteers when fasting and after a protein-calorie meal: a preliminary study. *J Appl Physiol* 1999;87:1584-8
177. Leaf DA, Kleinman MT, Hamilton M, Barstow TJ. The effect of exercise intensity on lipid peroxidation. *Med Sci Sports Exerc* 1997;29:1036-9
178. Senthilmohan ST, Milligan DB, McEwan MJ, Freeman CG, Wilson PF. Quantitative analysis of trace gases of breath during exercise using the new SIFT-MS technique. *Redox Rep* 2000;5: 151-3
179. Tirakitsoontorn P, Nussbaum E, Moser C, Hill M, Cooper DM. Fitness, acute exercise, and anabolic and catabolic mediators in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:1432-7
180. Morita S, Snider MT, Inada Y. Increased N-pentane excretion in humans: a consequence of pulmonary oxygen exposure. *Anesthesiology* 1986;64:730-3
181. Lemoyne M, Van Gossum A, Kurian R, Ostro M, Axler J, Jeejeebhoy KN. Breath pentane analysis as an index of lipid peroxidation: a functional test of vitamin E status. *Am J Clin Nutr* 1987;46:267-72
182. Pincemail J, Camus G, Roesgen A et al. Exercise induces pentane production and neutrophil activation in humans. Effect of propranolol. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1990;61:319-22
183. McGrath LT, Patrick R, Silke B. Breath isoprene in patients with heart failure. *Eur J Heart Fail* 2001;3:423-7
184. Phillips M. Method for the collection and assay of volatile organic compounds in breath. *Anal Biochem* 1997;247:272-8
185. Studer SM, Orens JB, Rosas I et al. Patterns and significance of exhaled-breath biomarkers in lung transplant recipients with acute allograft rejection. *J Heart Lung Transplant* 2001;20:1158-66
186. Gelmont D, Stein RA, Mead JF. The bacterial origin of rat breath pentane. *Biochem Biophys Res Commun*. 1981;102:932-6

187. Nycyk JA, Drury JA, Cooke RW. Breath pentane as a marker for lipid peroxidation and adverse outcome in preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1998;79:67-9
188. Pitkänen OM, Hallman M, Andersson SM. Correlation of free oxygen radical-induced lipid peroxidation with outcome in very low birth weight infants. *J Pediatr* 1990;116:760-4
189. Remmer H, Hintze T, Frañk H, Müh-Zange M. Cytochrome P-450 oxidation of alkanes originating as scission products during lipid peroxidation. *Xenobiotica* 1984;14: 207-19
190. van Rij AM, Wade CR. The metabolism of low molecular weight hydrocarbon gases in man. *Free Radic Res Commun* 1987;4:99-103
191. Allerheiligen SR, Ludden TM, Burk RF. The pharmacokinetics of pentane, a by-product of lipid peroxidation. *Drug Metab Dispos* 1987;15:794-800
192. Paredi P, Kharitonov SA, Leak D, Ward S, Cramer D, Barnes PJ. Exhaled ethane, a marker of lipid peroxidation, is elevated in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:369-73
193. Buszewski B, Keszy M, Ligor T, Amann A. Human exhaled air analytics: biomarkers of diseases. *Biomed Chromatogr* 2007;21:553-66
194. Schubert JK, Spittler KH, Braun G, Geiger K, Guttman J. CO₂-controlled sampling of alveolar gas in mechanically ventilated patients. *J Appl Physiol* 2001;90:486-92
195. Pleil JD, Lindstrom AB. Measurement of volatile organic compounds in exhaled breath as collected in evacuated electropolished canisters. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1995; 665:271-9
196. Levitt MD, Ellis C, Furne J. Influence of method of alveolar air collection on results of breath tests. *Dig Dis Sci* 1998;43:1938-45
197. Bommarito L, Migliore E, Bugiani M et al., ECRHS Turin, Italy Study Group. Exhaled Nitric Oxide in a Population Sample of Adults. *Respiration* 2008;75:386-92
198. Salome CM, Roberts AM, Brown NJ, Dermand J, Marks GB, Woolcock AJ. Exhaled nitric oxide measurements in a population sample of young adults. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:911-6
199. Moser B, Bodrogi F, Eibl G, Lechner M, Rieder J, Lirk P. Mass spectrometric profile of exhaled breath-field study by PTR-MS. *Respir Physiol Neurobiol* 2005;145:295-300
200. von Basum G, Dahnke H, Halmer D, Hering P, Mürtz M. Online recording of ethane traces in human breath via infrared laser spectroscopy. *J Appl Physiol* 2003;95:2583-90

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Spirometrie	19
Abbildung 2: Mundstück, Ventil und Probenbehälter (9jährige Probandin).....	21
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Atemmanövers.....	21
Abbildung 4: Aufbau des Gaschromatographen.....	23
Abbildung 5: Chromatogramm einer Atemgasprobe, 6l-SilcoSteel-Behälter, weibliche gesunde Probandin	24
Abbildung 6: Korrelation von Ethankonzentration in Raumluft und Atemluft bei CF-Patienten (Dreiecke) und gesunden Probanden (Kreise).....	25
Abbildung 7: Veränderung der VOC-Konzentrationen in der Atemluft nach Lagerungsdauer von 2 Tagen, Vergleich 2l-SUMMA-Behälter und 6l-SilcoSteel-Behälter.....	28
Abbildung 8: Veränderung der VOC-Konzentrationen in der Atemluft im Verlauf von 6 Tagen; Vergleich 2l-SUMMA-Behälter und 6l-SilcoSteel-Behälter	29
Abbildung 9: Korrelation von Pentan-Gradient und FEV1 bei stabilen bzw. exazerbierten CF-Patienten und gesunden Probanden	32
Abbildung 10: Korrelation von Toluol (in ppb) und FEV1% (in %) bei CF-Patienten.....	39

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Patienten- und Probandendaten (Mittelwert, Minimum-Maximum).....	17
Tabelle 2: Betriebsparameter des verwendeten Gaschromatographen.....	23
Tabelle 3: Mittelwerte für Δ VOC mit den errechneten p-Werten, inter- und intraindividuellen Variationskoeffizienten der einzelnen Spurengase.....	31

9. Anhang

Anhang 1: Fragebogen

Name _____

Geburtsdatum _____

Alter _____

Geschlecht _____

PLZ/Wohnort _____

Größe _____

Gewicht _____

BMI _____

Alter _____

SDS-Wert _____

Entnahmedatum _____

1. Entnahmezeit/Behälternummer _____

Probennummer _____

2. Entnahmezeit/Behälternummer _____

3. Entnahmezeit/Behälternummer _____

Entnahmezeit Raumlufte/Behälternummer _____

Ausschlusskriterien CF

- Infekt der oberen Luftwege in den letzten vier Wochen ja/nein
- Zigarettenkonsum ja/nein

Zusätzliches Ausschlusskriterium Vergleichsgruppe

- (Pollen-) Allergie

Aktuelle Anamnese

- Wetterlage
- Wie geht es dir heute?
- Was hast du bisher gemacht (grober Tagesablauf)?
- Wie bist du heute hier hin gekommen?/Uhrzeit der Ankunft?
- Wann hast du zuletzt gegessen?/Was?
- Wird in deiner Familie geraucht?

Krankengeschichte Vergleichsgruppe

- Medikamente
- Wann war der letzte Luftwegsinfekt?
- Andere chronische Krankheiten?
- Familienanamnese (v.A. Asthma, Allergien)

Krankengeschichte CF

- Allergien aktuelle Saison für Allergene?
- Asthma
- Heuschnupfen
- Medikamente
 - Oral
 - Inhalativ
 - Vitaminsubstitution
- Wann war der letzte Luftwegsinfekt?
- Andere chronische Krankheiten
- Welche genetische Form liegt vor?
- Bakterielle Besiedlung der Lunge
 - Pseudomonas
 - Staphylokokken
 - Andere Keime
 - Keine
- Glukosetoleranz
 - Normal
 - Gestört
 - CF-Diabetes
- Leberbeteiligung
 - Keine/mild
 - Relevant

Körperliche Untersuchung

- Luftnot
 - ja
 - nein
- Husten
 - ja
 - gelegentlich
 - oft
- Obere Luftwege
 - o.B.
 - Infektzeichen
- Lungenauskultation
 - frei
 - obstruktiv
 - RG's

Anhang 2: Antropometrie der Testpersonen

V: Probandengruppe, C: Patientengruppe, W: weiblich, M: männlich

ID	Geschl	Alter (Jahre)	Größe (cm)	Gewicht (kg)	BMI_SDS	FEV ₁ %	MEF50%
01-V-01	M	10	138	35	0,5	94	71
02-V-02	W	9,5	132	28,4	-0,2	99,1	83
10-V-03	M	9	142	32,7	-0,1	115	88
17-V-04	W	16	172	64	0,4	105	81
18-V-05	W	15	168,5	61,5	0,4	130	107
19-V-06	W	11	153,5	43,2	0,2	100	87
21-V-07	M	14	183	83	1,5	100	119
25-V-08	W	14	161	57	0,8	120	128
26-V-09	M	11	147	47	1,3	106	110
28-V-10	M	11	149	47,6	1,2	84,9	89
29-V-11	W	13	155	41	-0,9	111	95
40-V-12	W	15	170	58	-0,1	109	104
44-V-13	M	20	183	70	-0,2	136	149
46-V-14	W	18	163,5	56	-0,1	124	119
47-V-15	W	13	172	62	0,7	114	118
48-V-16	M	11	155	38	-0,9	104	97
49-V-17	M	14	169,2	53,4	-0,2	111	110
50-V-18	W	17	165,5	56,8	-0,1	138	128
53-V-19	W	22	168	64,3	0,6	86,5	80
57-V-20	M	23	186	77	0,2	96	100

ID	Geschl	Alter (Jahre)	Größe (cm)	Gewicht (kg)	BMI_SDS	FEV ₁ %	MEF50%
03-C-01	W	7	125	23,9	-0,3	104,7	87
08-C-02	W	14	164	56	0,4	92	71
09-C-03	W	13	147	32	-2	71	41
11-C-04	W	13	151	42,8	0	84	49
13-C-05	W	13	148	36,6	-0,9	85	103
14-C-06	M	15	164	51	-0,4	94	87
16-C-07	W	17	165	50	-1,1	52	35
23-C-08	M	14	151	38,3	-1,1	61	37
24-C-09	M	17	169	46	-2,5	41	20
33-C-10	M	22	174	55	-1,5	41	16
34-C-11	W	18	168	50,7	-1,5	42	13
35-C-12	M	11	134	27,6	-1	49	17
41-C-13	W	8	127	27	0,3	105	96
51-C-14	M	13	156	39,6	-1,1	62	31
52-C-15	W	29	170	53,2	-1,3	21	6
54-C-16	M	23	174	64,1	-0,1	38	10
55-C-17	M	27	180	61,8	-1	42	19
56-C-18	M	15	169	55	-0,4	71	35
58-C-19	W	29	157	54,3	0,3	72	45
59-C-20	W	26	169	55,5	-0,8	80	49

Anhang 3: Gruppenspezifische Mittelwerte der Spurengase in Atem- und Raumluft

	CF		Gesunde	
	Atemluft	Raumluft	Atemluft	Raumluft
Ethan	2764	2376	2472	2375
Propan	1947	1418	1954	1378
Methanol	200	7,3	272	7,9
Ethanol	157	13,2	195	30
Aceton	402	2,39	469	1,74
Pentan	547	188	429	218
Isopren	106	0,8	115	0,45
DMS	3,89	0,003	7,58	0
Benzol	156	192	127	206
Toluol	433	680	293	803
a-Pinen	260	29	537	28
Limonen	2,42	0,14	2,3	0,09
Eukalyptol	356	136	400	0,06
2-Propanol	6,99	21,9	12,4	15

Anhang 4: VOC-Konzentrationen der Atemproben der Vergleichsgruppe, Angabe in ppb

ID	Ethan	Propan	Methanol	Ethanol	Aceton	Pentan	Isopren	DMS	Benzol	Toluol	a-Pinen	Limonen	Eukalyptol	2-Propanol
01-V-01	2,52	0,97	312	143	823	0,21	26	5,98	0,13	0,27	0,16	0,14	0,35	14,55
02-V-02	2,26	1,31	649	137	466	0,18	32	8,76	0,1	0,21	0,21	5,53	0,54	8,83
10-V-03	1,97	1,11	369	242	370	0,21	153	12,23	0,13	0,64	0,27	6,54	0,25	8,95
17-V-04	1,91	5,47	430	219	491	0,24	245	3,95	0,12	0,35	0,57	2,23	0,14	12,09
18-V-05	2,47	0,88	330	253	387	0,34	155	13,87	0,14	0,4	0,76	1,97	0,3	11,84
19-V-06	1,98	0,98	520	197	495	0,28	153	14,59	0,1	0,39	0,88	0,91	0,15	13,63
21-V-07	3,74	1,32	289	238	931	0,45	142	2,8	0,14	0,25	4,64	10,93	0,36	15,64
25-V-08	1,6	1,62	321	81	369	1,01	131	8,35	0,16	0,35	0,27	2,02	0,25	3,15
26-V-09	2,78	1,46	228	43	369	0,7	93	6,26	0,15	0,34	0,19	1,26	0,16	3,38
28-V-10	2,38	1,2	211	76	408	0,12	106	15,17	0,2	0,32	0,35	0,61	0,12	10,38
29-V-11	2,66	2,2	288	250	439	0,68	121	10,99	0,16	0,36	0,44	2,32	0,32	58,88
40-V-12	2,29	2,5	43	134	705	0,4	104	7,44	0,15	0,43	0,46	0,3	1,03	12,8
44-V-13	3,99	3,84	212	59	544	0,82	149	4,03	0,2	0,46	0,18	0,68	0,09	13,07
46-V-14	2,89	2,64	219	445	263	0,47	49	3,37	0,1	0,18	0,13	1,86	0,6	7,94
47-V-15	2,82	3,27	217	116	198	0,49	118	9,06	0,11	0,07	0,1	0,58	1,63	5,84
48-V-16	2,65	2,21	126	203	328	0,43	82	4,9	0,1	0,14	0,15	0,25	0,06	10,72
49-V-17	1,27	0,88	166	813	398	0,33	67	5,67	0,05	0,16	0,03	0,47	0,08	16,03
50-V-18	1,4	1,22	158	75	332	0,33	83	2,52	0,07	0,11	0,16	0,18	0,59	6,83
53-V-19	2,48	1,71	98	144	512	0,33	72	5,32	0,09	0,13	0,31	7,08	0,96	7,38
57-V-20	3,39	2,29	265	23	548	0,55	214	6,3	0,14	0,3	0,49	0,12	0,03	6,2

Anhang 5: VOC-Konzentrationen der Atemproben der Patientengruppe, Angabe in ppb

ID	Ethan	Propan	Methanol	Ethanol	Aceton	Pentan	Isopren	DMS	Benzol	Toluol	a-Pinen	Limonen	Eukalyptol	2-Propanol
03-C-01	2,53	0,61	186	85	340	0,24	28	3,32	0,14	1,54	0,58	15,11	0,25	13,3
08-C-02	2,27	1,51	503	129	405	0,46	119	7,19	0,11	0,57	0,15	0,44	,	8,5
09-C-03	2,83	1	236	247	382	0,25	62	4,26	0,09	0,54	0,1	8,34	0,1	16,6
11-C-04	1,84	1,3	410	49	479	0,29	86	12,11	0,12	0,2	0,16	4,16	,	7,8
13-C-05	2,04	1,36	555	56	308	0,26	79	2,75	0,12	0,4	0,32	3,51	,	3,8
14-C-06	2,48	1,86	213	1572	347	0,41	91	3,55	0,12	0,99	0,12	6,3	,	7,3
16-C-07	1,82	0,48	170	100	300	0,28	80	2,41	0,07	0,13	0,21	0,78	,	5,5
23-C-08	2,33	1,02	116	59	250	0,21	158	3,17	0,11	0,43	0,1	0,27	0,13	5,0
24-C-09	2,7	2,14	268	90	453	1,23	184	1,65	0,11	0,17	0,63	0,69	0,41	6,6
33-C-10	4,72	2,11	234	54	619	0,6	46	10,78	0,78	0,19	0,15	1,92	,	12,0
34-C-11	2,27	1,56	107	149	606	0,88	136	0,64	0,1	0,23	0,14	0,66	,	6,5
35-C-12	4,41	2,81	185	176	741	1,2	37	0,72	0,26	0,4	0,46	0,2	0,04	4,3
41-C-13	3,16	2,29	287	51	353	0,76	127	10,96	0,24	1,09	0,15	1,03	0,1	5,1
51-C-14	2,84	2,54	41	64	319	0,48	96	3,23	0,15	0,35	0,26	1,61	0,11	5,3
52-C-15	3,35	3,2	42	29	327	0,83	141	0,43	0,1	0,24	0,09	0,25	,	8,7
54-C-16	2,73	5,82	35	23	157	0,74	128	1	0,06	0,08	0,1	0,03	0,03	3,6
55-C-17	2,25	1,39	164	64	629	0,29	129	2,02	0,15	0,23	0,88	0,78	0,13	7,2
56-C-18	3,62	2,2	111	70	89	0,64	62	1,82	0,13	0,34	0,21	0,98	0,17	1,8
58-C-19	2,58	2,05	69	35	344	0,51	133	2,84	0,08	0,26	0,09	1,17	,	5,3
59-C-20	2,52	1,68	71	38	601	0,38	192	3,03	0,09	0,3	0,31	0,16	2,44	5,7

Anhang 6: Lebenslauf

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

Anhang 7: Publikationsliste

1. Barker M, Hengst M, Schmid J, Buers HJ, Mittermaier B, Klemp D, Koppmann R. Volatile organic compounds in the exhaled breath of young patients with cystic fibrosis. *Eur Respir J* 2006;27:929-36

Anhang 8: Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. G. Heimann bedanken für Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Klinik erstellen zu können und die Unterstützung während des experimentellen Teils meiner Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn PD Dr. med. Michael Barker, unter anderem für das Thema meiner Doktorarbeit. Er hatte zu allen Zeitpunkten stets ein offenes Ohr für alle großen und kleinen Probleme und Fragen während dieses Projekts. Ich danke ihm auch für die nicht nachlassende Motivation und für die Hilfe und Geduld bei der Korrektur meiner Arbeit.

Ohne die uneigennützigte Mitarbeit zahlreicher Mukoviszidose-PatientInnen und gesunder ProbandInnen wäre die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Danken möchte ich ferner den MitarbeiterInnen des ICG-II, Forschungszentrum Jülich, unter anderem PD Dr. Koppmann, Dr. Klemp, Dr. Mittermeier und Hr. Buers, sowie den MitarbeiterInnen der pneumologisch-allergologischen Ambulanz der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, UK Aachen. Durch die Zusammenarbeit und Hilfe haben sie mich bei der Durchführung des experimentellen Teils meiner Dissertation sehr unterstützt.

Danken möchte ich auch Prof. Dr. rer. nat. Ralf-Dieter Hilgers und seinen MitarbeiterInnen des Instituts für medizinische Statistik am UK Aachen für die Unterstützung und Beratung bei der Datenauswertung. Bei Maria Bergmann bedanke ich mich für die Hilfe bei der Korrektur des Manuskripts.

Zuletzt gilt mein herzlicher Dank meiner Familie und meinen Freunden. Sie haben mich während meines Studiums und meiner Arbeit an diesem Projekt geduldig und verständnisvoll unterstützt und vorangetrieben, besonders mein Vater Karl-Wilhelm Schmid und mein Bruder Christoph.

Anhang 9: Selbständigkeitserklärung

„Ich, Johanna Maria Schmid, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Organische Spurengase in der Atemluft von Kindern und Jugendlichen mit Mukoviszidose selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift