

2. Literaturübersicht

2.1 Nutzung der Ausatemluft als diagnostisches Medium

2.1.1 Geschichtlicher Rückblick

Seit mehr als zweitausend Jahren gehört die Atemgasanalyse zu den einfachsten diagnostischen Maßnahmen in der Geschichte der Medizin. Bereits Hippokrates begann den Geruch des Exhalates als einen Spiegel für körperinnere Vorgänge zu verstehen. Alkohol, der süßlich-fruchtige Geruch der Ketonkörper (Diabetes mellitus) oder auch Ammoniak-ähnliche Veränderungen (Leber-, Nierenerkrankungen) sind dabei grobsinnlich zu erfassen. Linus Pauling beschrieb 1971 über 200 verschiedene leicht- und schwerflüchtige gasförmige Substanzen (VOC – volatile organic compounds) (Pauling et al., 1971), die einzeln (Kohlenmonoxid, Kohlendioxid, Sauerstoff, Nitrit, Stickstoffmonoxid, Wasserstoff, Aceton, Isopren, Heptanon, Acetessigsäure, γ -Hydroxybuttersäure etc.) oder auch als organspezifisches Muster verzweigter Kohlenstoffe (Alkane) nach gaschromatographischer Auftrennung den „Fingerabdruck“ einer spezifischen Organveränderung darstellen. In jüngeren Untersuchungen gelang der Nachweis 3481 verschiedener gasförmiger Verbindungen, die unter physiologischen und pathologischen Bedingungen über das Exhalat abgeschieden werden können (Phillips et al., 1999).

Erste dokumentierte Berichte zur Exhalatanalyse domestizierter Tiere stammen dagegen erst aus dem Ende des 19. Jahrhunderts. 1876 wurden von den französischen Wissenschaftlern Regnault und Reiset Atemgase kleiner Haustiere chemisch untersucht. Bis heute wurden in der Veterinärmedizin zu diesem Thema etwa 100 Publikationen veröffentlicht.

Praktische Anwendung findet die Untersuchung der Atemgase in der human- und veterinärmedizinischen Anästhesiologie (Narkoseüberwachung), der Sportmedizin, der Tumordiagnostik (z.B. Lungen-, Mammatumoren), der Schlafforschung (Isopren) und in der Inneren Medizin (Blutalkoholbestimmung, Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Leber- und Nierenerkrankungen, Diagnostik von Magen-, Darmgeschwüren, Kohlenhydrat-Malabsorption, bakterielle Fehlbesiedelung, Transplantatabstoßung). Zum Nachweis von Entzündungen stehen seit einigen Jahren sowohl in der Human- wie auch in der Veterinärmedizin das exhalierte Stickoxid und z.T. auch Kohlenmonoxid im Mittelpunkt des Interesses. Einen Überblick der im menschlichen und tierischen Exhalat nachgewiesenen flüchtigen Inhaltsstoffe geben die Tab. A 1 und A 2.

2.1.2 Differenzierung zwischen Atemgas- und Atemkondensat (AKO)-Analyse

Exhalat: Unter dem Begriff Exhalat wird die Summe aller bei 37 °C aus den Atemwegen und über die Lunge abgegebenen leicht und schwerflüchtigen Gase zusammengefasst.

Jeder expiratorische Atemzug enthält dabei Stickstoff (78 %), Sauerstoff (15 - 18 %), Kohlendioxid (4 - 6 %), Edelgase (< 1 %) und Wasserdampf. Nur ein äußerst geringer Anteil von 0,000001 % besteht aus einem Gemisch diagnostisch interessanter endogener oder exogener Inhaltsstoffe (Phillips et al., 1999). Ziel der Atemgas-Untersuchung ist der Nachweis und die quantitative Bestimmung dieser Substanzen aus der Expirationsluft, um auf systemische Zustände oder Änderungen des Stoffwechsels verschiedener Organsysteme, inklusive der Lunge, schließen zu können.

Kondensat: Als Atemkondensat werden alle sich bei $< 0\text{ }^{\circ}\text{C}$ abscheidenden Anteile der Expirationsluft bezeichnet, die sich aus einer Dampfphase (ca. 99,99 %) und einer Aerosolfraction (max. 0,02 - 0,3 %) zusammensetzen (Rothe, 2001). Als flüchtig werden dabei Substanzen bezeichnet, die in die Gasphase übergehen. Beispiele sind Wasser, Wasserstoffperoxid, Alkohol und eine Reihe organischer Komponenten (VOC). Sie nehmen den Hauptteil des Atemkondensates ein.

Die zweite Gruppe der schwerflüchtigen, nicht wasserlöslichen Anteile, bildet mit Wasser ein „binäres System“. Hier addiert sich deren Dampfdruck mit dem des Wassers und sie werden so in die Gasphase verbracht. Beispiele hierfür sind Leukotriene und $\text{PGF}_2\alpha$.

Nichtflüchtige Substanzen, wie Proteine, Nitrit und Salze, bilden die dritte Gruppe der im Atemkondensat bestimmbar Substanzen. Sie sind bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ nicht verdampfbar und werden durch Aerosolpartikel weitergetragen (Kap. 2.2.1). Nur sehr kleine und sehr große Moleküle sind von dieser Art des Transportes ausgeschlossen.

2.1.3 Bedeutung der AKO-Diagnostik in der Humanmedizin

In den letzten Jahren stellte sich die Bestimmung im Atemkondensat enthaltener Substanzen zur einmaligen oder verlaufskontrollierenden Diagnostik entzündlicher, allergischer, neoplastischer, degenerativer und durch Umwelteinflüsse bedingter Atemwegs- und Lungenerkrankungen als ein neues Werkzeug gegenüber bereits genutzten Methoden der Pneumologie dar. Die zunehmende Bedeutung lässt sich in dem Anstieg der veröffentlichten Publikationen der letzten Jahre erkennen (Abb. 1). Ebenso steigt mit zunehmender Sensitivität der Untersuchungsverfahren die Anzahl der im menschlichen Kondensat nachgewiesenen Inhaltsstoffe (Tab. A 3).

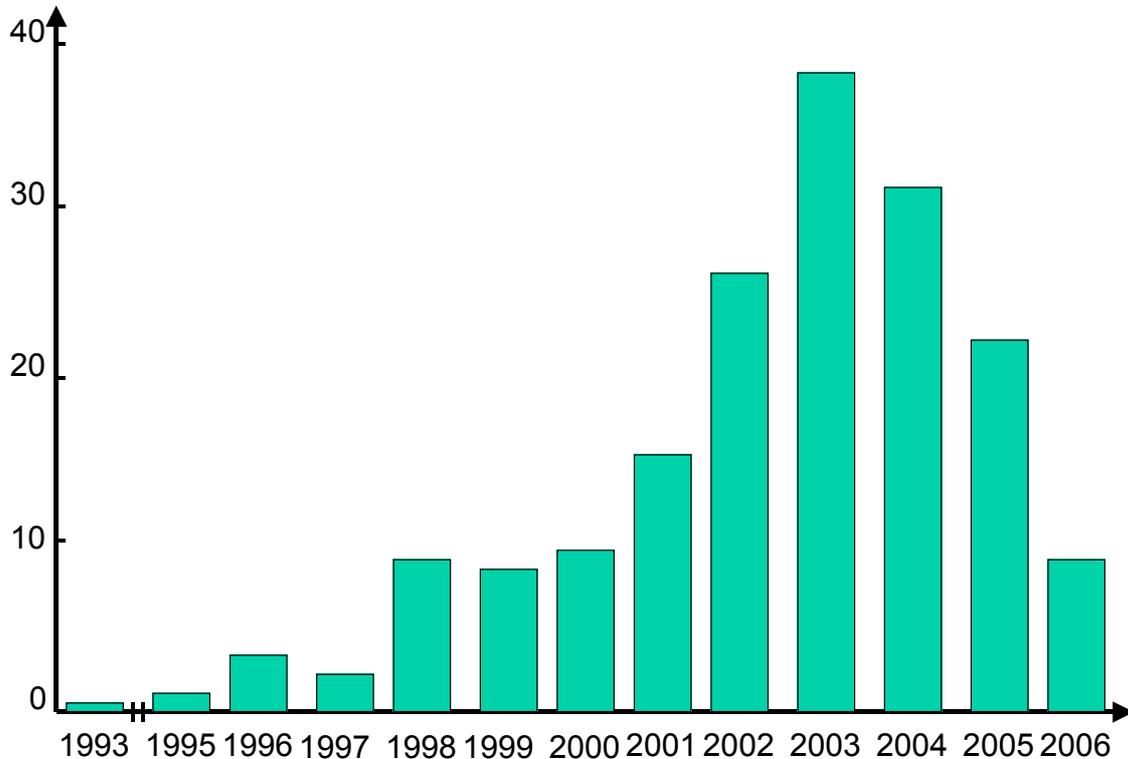


Abb. 1: Übersicht zum Anstieg der veröffentlichten AKO-Publikationen (1993 - 2006) (Stand März 2006)

2.1.4 Stand der AKO-Untersuchungen in der Veterinärmedizin

Auch bei den großen und kleinen Haustieren entwickelte sich neben der Exhalatuntersuchung das Interesse, Atemkondensat zu gewinnen. Reinhold et al. (1996) begannen Leukotrien B₄ (LTB₄) bei klinisch gesunden und mit dem BRS-Virus infizierten Kälbern zu bestimmen. Weitere Untersuchungen bezüglich des Harnstoff-Gehaltes als Marker für die alveolo-kapilläre Permeabilität folgten (Reinhold et al., 2001b). Bei Schweinen wurde neben der Harnstoff- auch die Protein-Konzentration im Atemkondensat bestimmt (Reinhold et al., 2001c). Fey et al. (2001) untersuchte erstmals das Kondensat des Pferdes auf dessen LTB₄-Gehalt. Auch bei Katzen und Hunden wurde die Exhalat-Kondensation zur Erstellung physiologischer Basiswerte angewendet bzw. zur Diagnostik respiratorischer Erkrankungen genutzt (Pietra et al., 2003, Sparks et al., 2004).

Weitere beim Tier nachgewiesene Entzündungsmarker im Atemkondensat sind die Protonen-Konzentration, Nitrit, Ammonium, Gesamtprotein sowie einige Elektrolyte (Hirt et al., 2003, Reinhold et al., 2004a,b,c, 2006). Eine Übersicht zu den bislang im Schrifttum erwähnten AKO-Inhaltsstoffen verschiedenster Tierarten gibt die Tab. A 4.

2.2 Beschreibung der untersuchten Inhaltsstoffe im Atemkondensat

2.2.1 Proteine

Die Epithelien der Atemwege sind mit einem aus Mucus und PCL (periciliar layer) bestehenden Flüssigkeitsfilm unterschiedlich stark bedeckt (1-5 µl/cm²), der als airway surface layer (ASL) bezeichnet wird. Aber auch mucusfreie Bereiche (sol layer) sind beschrieben. In dieser Oberflächenschicht vorkommende Eiweiße lassen sich in funktionelle Proteine der Lungenoberfläche, hierzu gehören die Surfactant- und Mucusproteine, die Produkte der Clarazellen, der Alveolar- und Bronchialepithelien, sowie Entzündungszellen und Serumproteine (z.B. Albumin, Transferrin, Ceruloplasmin, Akute-Phase Proteine, Immunglobuline, Fibrinogen (incl. D-Dimer)) unterscheiden. Plasmaproteine mit einer Größe von 69 kDa (z.B. Albumin) bis zu 900 kDa (IG-M, α₂ Makroglobulin) wurden in intaktem Zustand in der ASL des unteren Respirationstraktes bei Menschen und Tieren nachgewiesen (Bell et al., 1981, Delacroix et al., 1985). Ihre Konzentration ist, im Vergleich zum Serum, bei intakter alveolo-kapillärer Membran aber sehr gering (Delacroix et al., 1985). Andere Autoren schließen einen physiologischen Transport von Molekülen wie IG-M oder Fibrinogen (340 kDa) beim Menschen allerdings aus (Holter et al., 1986). Eine Untersuchung auf Speichel-Amylase wird zwar zur Abgrenzung zum Kondensat-Proteinmuster empfohlen, eine intrapulmonale Produktion, bedingt durch benigne (evtl. maligne) Regeneration soll aber ebenfalls möglich sein (Otsuki et al., 1977, Hayashi et al., 1986, Lenler-Petersen et al., 1994, Manke 2000). Einen Überblick über Proteine der ASL, die unter physiologischen und pathologischen Bedingungen mittels AKO gewonnen werden konnten, liefert die Abb. A 1. Tabelle 1 fasst die Konzentrationen für Gesamtprotein zusammen, die im AKO von Menschen und Tieren ermittelt wurden.

Die Passage der nicht flüchtigen Eiweiße ins Atemkondensat wird durch Aerosoltröpfchen erklärt, die einen Anteil von maximal 0,3 % des AKO-Volumens ausmachen (Rothe, 2001). Deren Erscheinen im Expirationsstrom soll durch sich während der Inhalation öffnende alveoläre Atelektasen ausgelöst werden (Brand, 2001). Insbesondere trifft das für große Moleküle (> 5 µm) zu. Dass Surfactant im AKO nachgewiesen werden konnte, gilt als ein Hinweis der möglichen Aerosolbildung in den unteren Atemwegen (Bronchiolen, Alveolen)

(Sidorenko et al., 1980, Hunt, 2002, Simpson et al., 2004). Eine weitere Theorie ist die Aerosol-Entstehung während Turbulenzen der Atmung bei Richtungsänderungen des Luftstromes in den grossen Bronchien und im Larynx während der Ex- und auch der Inhalationsphase (Scheideler et al., 1993, Hunt, 2002). In Abhängigkeit von der Geschwindigkeit des Luftstromes und der Oberflächenspannung des Flüssigkeitsfilms der Atemwege und der Alveolen können zwischen 0,1 - 4 Partikel je cm^3 , mit einem mittleren Durchmesser von weniger als 0,3 μm bis hin zu 8 μm entstehen (Fairchild und Stampfer, 1987, Papineni und Rosenthal, 1997). Bei Menschen wurde eine verminderte Aerosolabgabe bei Nasenatmung, sowie eine Erhöhung bei Husten nachgewiesen (Papineni und Rosenthal, 1997).

Tab. 1: Gesamtprotein-Konzentration im AKO bei gesunden sowie lungenkranken Menschen und Tieren

Diagnose		Konzentration	n	AKO-Gewinnung	Autoren
gesund					
Mensch		3,2 ± 1,7 $\mu\text{g}/\text{ml}$	10	EcoScreen	Lehmann et al., 2004
		11,9 ± 8,9 $\mu\text{g}/\text{ml}$	22	EcoScreen	Gessner et al., 2001
		15,5 ± 19,7 $\mu\text{g}/\text{ml}$	17	R-Tube	Lehmann et al., 2003b
Kalb		0,5 – 35 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 2,6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (<i>Median</i>)	12	EcoScreen	Reinhold et al., 2006
Schwein		0,5 – 35 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 4,3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (<i>Median</i>)	12	EcoScreen	Reinhold et al., 2006
		4,7 ± 3,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	9	EcoScreen	Reinhold et al., 2001c
krank					
Mensch	Asthma	6,6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (3,2 - 140,8 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	9	Teflon-Tube	Simpson et al., 2004
	COPD	12,9 ± 7,6 $\mu\text{g}/\text{ml}$	23	EcoScreen	Gessner et al., 2001

Erläuterungen zu Tab. 1:

Angabe der Protein-Konzentration erfolgte als Mittelwert ± Standardabweichung bzw. der Minima und Maxima

AKO = Atemkondensat

COPD = Chronisch obstruktive Lungenerkrankung

Ein bidirektionaler Proteinfluss durch die alveolo-kapilläre Membran ist bei Mensch und Tier physiologisch. Die in der Literatur beschriebenen Möglichkeiten des Proteintransportes sind in der Abb. 2 zusammengefasst (Nummer 1 - 5 in Abb. 2). Dazu gehört die passive Diffusion, die Endo- und Transzytose oder auch der porenabhängige Transport (Conhaim et al., 1988, Berg et al., 1989, Kim und Malik, 2003). Hochmolekulare Proteine müssen dazu durch endotheliale Peptidasen gespalten werden oder können direkt von alveolären Makrophagen aufgenommen werden (Folkesson et al., 1996, Kim und Malik, 2003). Die Permeabilität der alveolo-kapillären Membran unterliegt dabei zusätzlich einer Alters-, Reife- und Spezies-Abhängigkeit (Goodman und Wangensteen, 1982, Berthiaume et al., 1988, Folkesson et al., 1990) (Abb. 2). Auch die Ladung, die Hydrophobie oder die Größe eines Proteins bestimmen seine Passagerate (Effros und Mason, 1983, Folkesson et al., 1991, Hermans und Bernard, 1999, Kim und Malik, 2003, Hastings et al., 2004). Unter inflammatorischen Bedingungen wird neben der entzündungszellbedingten Mediatorabgabe eine Erhöhung der Epithel- als auch Endothelpermeabilität beschrieben, die zu einer gesteigerten Protein-

sekretion, aber auch Clearance aus den Atemwegen führt (Folkesson et al., 1991, Hansson et al., 1992). Der Hauptteil des Protein-Transportes findet dabei über parazelluläre Pfade statt (Kim und Malik, 2003)

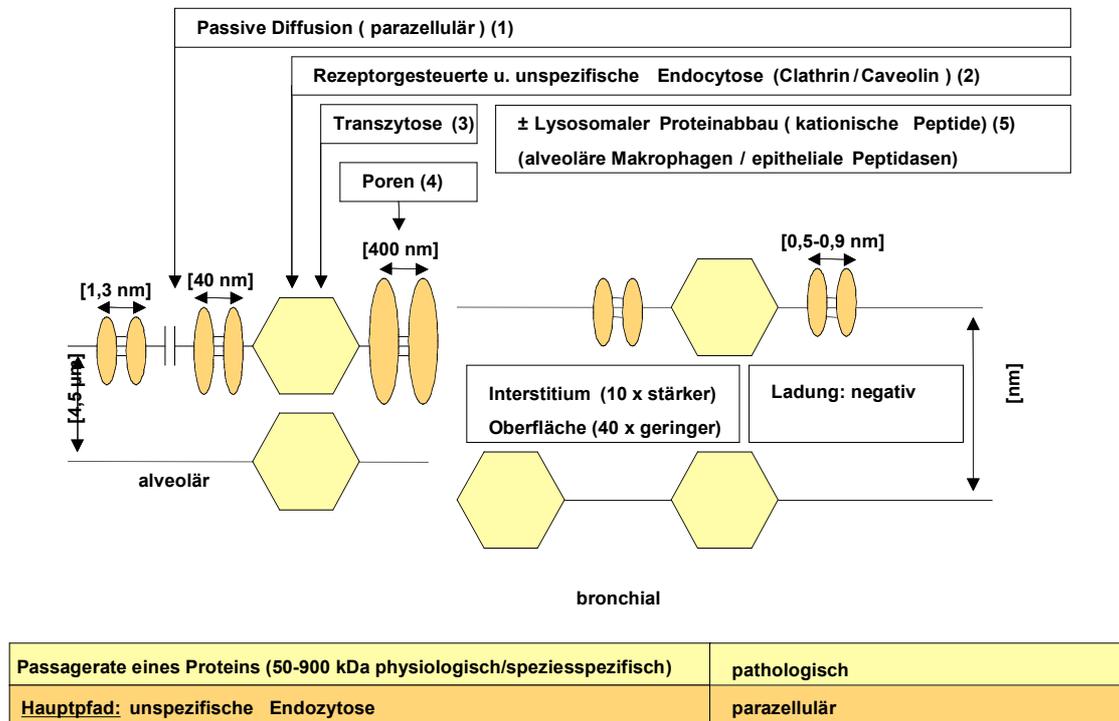


Abb. 2: In der Literatur beschriebene bidirektionale Passagemöglichkeiten für Serum- und ASL-Proteine durch die alveolo-kapilläre Membran

Erläuterungen zu Abb. 2:

kDa = Kilodalton

nm = Nanometer

µm = Mikrometer

Unter der Voraussetzung, dass das Atemkondensat einen Überblick über die ASL-Eiweiß-Zusammensetzung ermöglicht, bietet die Proteinbestimmung ein breites Spektrum an Möglichkeiten, um einen Einblick auf entzündliche, degenerative, neoplastische sowie regenerative Vorgänge innerhalb der Atemwege zu gewinnen. Dies scheint möglich, da zwischen der Protein-Zusammensetzung sowie der Gesamtmenge an Protein in der broncho-alveolären Lavage (BALF) und im Kondensat eine direkte Abhängigkeit nachgewiesen werden konnte (Patocka et al., 1999). Auch konnte durch den Vergleich des Proteinmusters (Proteom) im Atemkondensat zusätzlich eine höhere Homologie als in der broncho-alveolären Spülflüssigkeit (70 vs. 50 %) nachgewiesen werden (Gessner et al., 2003d). Auf Grund der heterogenen Herkunft der Proteine wird in der Literatur stärkere Bedeutung in einem, für ein entzündliches Geschehen charakteristischen Eiweiß gesehen als in der Gesamtproteinmenge.

Entsprechend Tab. 1 scheint der Gesamteiweiß-Gehalt im AKO klinisch gesunder Menschen und Tiere nach dem derzeitigen Kenntnisstand der Literatur vergleichbar zu sein (Reinhold et al., 2001c, 2006). Spezies-spezifisch konnten bei Schweinen signifikant höhere Mediane der Protein-Konzentration im AKO nachgewiesen werden als bei Kälbern (Reinhold et al., 2006).

Die Konzentrationen lagen dennoch innerhalb der Spannweite für klinisch gesunde menschliche Probanden ($3,2 \pm 1,7 \mu\text{g/ml}$ - $15,5 \pm 19,7 \mu\text{g/ml}$) (Lehmann et al., 2003b, 2004). Neben der physiologischen Permeabilität der alveolo-kapillären Membran kann eine entzündungszellbedingte Mediator-, Radikal (RNS/ROS)- und Arachidonsäure-Metabolitenabgabe zu einer gesteigerten Passagerate führen (Bhalla et al., 1992, Li et al., 1995, Cuzzocrea et al., 2001, Coles et al., 2002). Insbesondere Produkte aktivierter Abwehrzellen, wie die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-8 und TNF α , stellen geeignete inflammatorische Marker im Atemkondensat dar (Bosken et al., 1990, Scheideler et al., 1993, McCrea et al., 1994, Sauty et al., 1994, Torres et al., 1997, Balint et al., 2001a, Bucchioni et al., 2003a, Gessner et al., 2003b, Carpagnano et al., 2002a, 2003d, Jakab et al., 2003). Eine Erhöhung des Gesamt-Proteingehaltes wurde bei Patienten mit asthmatischen- bzw. chronisch obstruktiven Atemwegserkrankungen (COPD) beschrieben (Gessner et al., 2001, Simpson et al., 2004) (Tab. 1).

Nach Beobachtungen von Scheideler et al., (1993) wurde eine Abgabe von Proteinen > 60 kDa ausgeschlossen. Wie in Abb. A 1 (Anhang) sowie in der Tab. A 3 aufgeführt, erfolgte in späteren Untersuchungen, wenn auch z.T. nur unter pathologischen Bedingungen, ein Nachweis von Eiweißen mit einer Molmasse oberhalb dieser vermuteten Grenze (bis zu 110 kDa).

Signifikante zirkadiane Schwankungen der Protein-Konzentration im AKO konnten bei gesunden Probanden nicht nachgewiesen werden (Müller et al., 2000). Untersuchungen zur Variabilität einzelner Proteine beschränken sich auf das Interleukin-6, welches als reproduzierbarstes der proinflammatorischen Zytokine bezeichnet wird (Carpagnano et al., 2003a), sowie die Interleukine-1 (82,5 %) und -8 (66 %) (Anderson et al., 2003). Daten zur inter- oder intra-individuellen Reproduzierbarkeit des Gesamtproteingehaltes beim Tier existieren bislang nicht.

2.2.2 Metaboliten der Arachidonsäure

2.2.2.1 8-Isoprostan

F₂-Isoprostane sind in jedem menschlichen und tierischen Organismus bei antioxidativer Abwehr aber auch unter physiologischen Bedingungen nachweisbar. Als Quellen sind glatte Muskelzellen, das Endothel, Thrombozyten, Makrophagen, Mesangialzellen und Monozyten beschrieben (Pratico et al., 1995, Pratico und FritzGerald, 1996, Klein et al., 1997, Jourdan et al., 1997, Pratico et al., 1998b, Vacchiano et al., 1998, Jourdan et al., 1999, Watkins et al., 1999).

8-Isoprostan (Synonyme: iPF_{2 α} -III, 8-Isoprostaglandin-F_{2 α} , 15-F_{2t}-IsoP, 8-iso-PGF-2alpha) gehört zu der durch Lipidperoxidation der Arachidonsäure entstandenen Klasse der F₂-Isoprostane (Morrow et al., 1990, Pratico et al., 1998b, Hou et al., 2004, Volpe et al., 2006). In der Literatur wird ein radikalabhängiger Hauptpfad und ein Cyclooxygenase-abhängiger Nebenpfad der Isoprostanbildung beschrieben (Morrow et al., 1990, Pratico et al., 1995, Klein et al., 1997). Je nach Art der ungesättigten Fettsäure im Membranlipid (γ -Linolensäure, Eicosapentaensäure, Arachidonsäure) entstehen durch die Peroxidation verschiedene Klassen der Isoprostane (Reaktionsschritt 1 in Abb. 3). Der enzymatische Weg (Reaktionsschritt 2 in Abb. 3) setzt eine Prostaglandinbildung voraus, die dann zur Entstehung von einigen, allerdings nicht zu jedem der bekannten Isoprostane führen kann. Hierzu muss die Arachidonsäure, im Gegensatz zur radikalinduzierten Peroxidbildung, durch die Phospholipase A₂ aus der Membran freigesetzt werden (Reaktionsschritt 3 in Abb. 3). Aus dem Vorläufer der Prostaglandine, dem PGH₂, entsteht nun durch eine Prostaglandin-

Endoperoxidase-Synthase (PES_1 und PES_2) das Prostaglandin $F_2\alpha$, aus dem dann radikalinduziert die 4 Klassen (III-VI) der F_2 -Isoprostane entstehen (Pratico et al., 1995, Pratico und FritzGerald 1996, Morrow und Roberts 2002) (Reaktionsschritt 4 in Abb. 3). Aber auch aus D_2 -, E_2 - und I_2 - Prostaglandinen können Isoprostane gebildet werden (Morrow und Roberts, 2002).

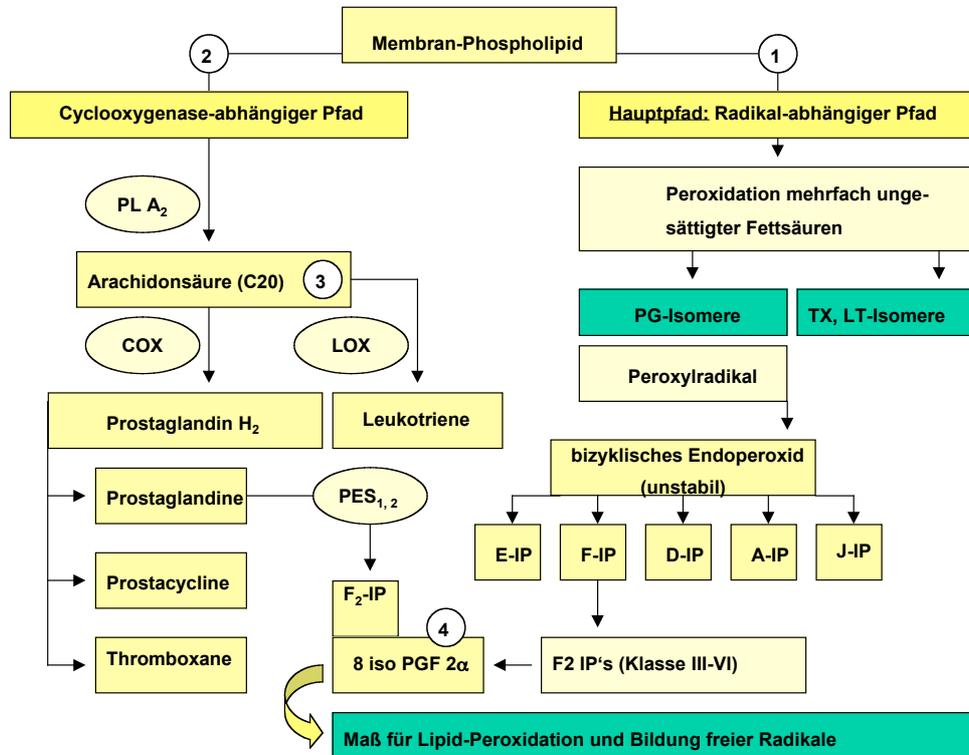


Abb. 3: Schematische Darstellung des radikalabhängigen und enzymatischen F_2 -Isoprostanbildungsweges

Erläuterungen zu Abb. 3:

COX = Cyclooxygenase

IP = Isoprostan

LOX = Lipooxygenase

$PES_{1,2}$ = PG Endoperoxid- Synthase_{1,2}

PG = Prostaglandin

$PL A_2$ = Phospholipase A_2

Isoprostane werden nicht nur als Parameter für oxidativen Stress und die Lipidperoxidation bezeichnet (Roberts und Morrow, 1994, Pratico et al., 1995, Morrow et al., 1995, Pratico und FritzGerald, 1996, Carpenter et al., 1998, Pratico et al., 1998a,b, Davi et al., 1999, Roberts und Morrow, 2000, Pratico et al., 2001, Wood et al., 2003). In der humanen Pathophysiologie wurden in den letzten Jahren vermehrt Erkenntnisse über den Zusammenhang zwischen Entzündung und oxidativem Stress sowie zur Krebsentstehung, *Diabetes mellitus*, Arteriosklerose, Alzheimer, Multiplen Sklerose bis hin zum Alterungsprozess selbst gewonnen (Halliwell und Chirico 1993, Wang et al., 1995, Pratico et al., 1998a, Davi et al., 1999, Greco et al., 1999). Isoprostane werden daher als eine neue Gruppe inflammatorischer Mediatoren zusammengefasst (Jannsen, 2004).

In jedem Zelltyp des Lungengewebes konnten spezies-spezifisch pathophysiologische Reaktionen als Antwort auf Isoprostane, in Abhängigkeit von der Art des Moleküls, seiner Konzentration sowie dem Zelltyp, nachgewiesen werden (Jannsen, 2004). Dabei entsteht die Wirkung aus der Kombination der gebildeten Isoprostane (Jannsen, 2004). Im AKO kann

8-Isoprostan als ein Marker für Lungenschädigung durch oxidativen Stress, z.B. bei Asthma und COPD, der Cystischen Fibrose, der pulmonalen Sarkoidose oder dem Akuten Respiratorischen Dyspnoe Syndrom (ARDS) genutzt werden (Montuschi et al., 1998, Carpenter et al., 1998, Montuschi et al., 2000a,b, Baraldi et al., 2003, Biernacki et al., 2003a, Psthakis et al., 2004).

Die Tab. 2 gibt einen Überblick zu Untersuchungen der 8-Isoprostan-Konzentrationen im Atemkondensat klinisch gesunder und lungenkranker Probanden. Angaben zur physiologisch nachweisbaren Konzentration schwanken zwischen $3,8 \pm 2,0$ pg/ml (Kinder) und $20,8$ ($16,1 - 25,4$) pg/ml (Shahid et al., 2001, Psathakis et al., 2004). Nach Untersuchungen von Carpenter et al. (1997) sollen sogar bis zu 73 ± 15 pg/ml möglich sein, die damit weit oberhalb der während inflammatorischen Lungenerkrankungen, wie der COPD, der cystischen Fibrose, dem Asthma, sowie der Sarkoidose bestimmten Konzentrationen liegen. Nur bei Asbestose- oder ARDS-Patienten sind höhere 8-Isoprostan-Konzentrationen von bis zu 99 ± 70 pg/ml sowie 186 ± 36 pg/ml im AKO nachweisbar (Carpenter et al., 1997, Lehtonen et al., 2003). Bei klinisch gesunden Kälbern lag die 8-Isoprostan-Konzentration im Kondensat dagegen unterhalb der methodischen Bestimmungsgrenze (Knobloch, 2006).

Tab. 2: 8-Isoprostan-Konzentrationen im AKO bei gesunden sowie lungenkranken Menschen

Diagnose		Konzentration	n	AKO-Gewinnung	Autoren
gesund					
Mensch		$3,81 \pm 1,97$ pg/ml (Kinder)	11	k.A.	Shahid et al., 2001
		$3,9 - 10,6$ pg/ml	12	EcoScreen	van Hoydonck et al., 2004
		$6,2 \pm 0,4$ pg/ml	12	k.A.	Biernacki et al., 2003a
		$10,8 \pm 0,8$ pg/ml	10	k.A.	Montuschi et al., 2000b
		$20,75$ pg/ml ($16,06 - 25,44$ pg/ml)	12	EcoScreen	Psathakis et al., 2004
		$24 \pm 2,6$ pg/ml	12	k.A.	Montuschi et al., 2000b
		73 ± 15 pg/ml	7	Tygon Tube in Eiswasser	Carpenter et al., 1997
krank					
Mensch	CF	$42,7 \pm 4,5$ pg/ml	19	Eis-gekühlte Glaskammer	Montuschi et al., 2000a
	COPD	$13,0 \pm 0,9$ pg/ml	21	k.A.	Biernacki et al., 2003a
		$45 \pm 3,6$ pg/ml	15	k.A.	Montuschi et al., 2000b
	Asthma	$9,34 \pm 6,17$ pg/ml (Kinder)	13	k.A.	Shahid et al., 2001
		$33,7 \pm 2,8$ pg/ml	12	k.A.	Montuschi et al., 1999
		$48,9 \pm 5$ pg/ml	15	k.A.	Montuschi et al., 1999
	Rhinitis	$14,8 \pm 4$ pg/ml	13	k.A.	Gratziou et al., 2003
	Sarcoi- dose	$64,23$ pg/ml ($37,0 - 91,46$ pg/ml)	30	EcoScreen	Psathakis et al., 2004
	ARDS	87 ± 28 pg/ml	22	Tygon Tube in Eiswasser	Carpenter et al., 1998
		186 ± 36 pg/ml	15		Carpenter et al., 1997
Asbestose	$99,0 \pm 70,1$ pg/ml	21	k.A.	Lehtonen et al., 2003	

Erläuterungen zu Tab. 2:

Angabe der 8-Isoprostan-Konzentration erfolgte als Mittelwert \pm Standardabweichung bzw. der Minima und Maxima

ARDS = akutes respiratorisches Dyspnoe-Syndrom
 CF = Cystische Fibrose

COPD = Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
 k.A. = hierzu erfolgte keine Angabe

Für die starke Schwankung der physiologischen Bildungsrate in biologischen Medien, wie z.B. dem Urin, soll neben dem Alter und dem Geschlecht der untersuchten Personen auch der Einfluss von Antibiotika sowie vom Zigaretten- bzw. Alkoholkonsum von Bedeutung sein (Wang et al., 1995, Morrow et al., 1995, Reilly et al., 1996, Meagher et al., 1999, Pratico et al., 1998b, Cracowski et al., 2002, Biernacki et al., 2003a). Ein zirkadianer Rhythmus der Bildung scheint dagegen nicht vorzuliegen (Helmersson und Basu, 1999). Auch die Auswirkung medikamenteller Behandlungen ist möglich (Montuschi et al., 1999, Shahid et al., 2001, Baraldi et al., 2003).

Die Bestimmung des 8-Isoprostan im Atemkondensat wird auf Grund der zu geringen Ausgangskonzentration und der zu geringen Sensitivität der zur Zeit zur Verfügung stehenden Nachweisverfahren von einigen Autoren als nicht reproduzierbar angesehen (Rahman, 2004, van der Meer et al., 2002, van Hoydonck et al., 2004). Dennoch bezeichneten Anderson et al. (2003) den Nachweis dieses Lipidperoxidations-Markers im Vergleich zu Nitrit, den Interleukinen-1 und -8 oder Wasserstoffperoxid als den intra-individuell reproduzierbarsten Parameter.

2.2.2.2 Leukotrien B₄

Die in Abb. 4 dargestellte Leukotrien-Bildungskaskade findet unter physiologischen und verstärkt unter pathologischen Zuständen in Bronchialepithelien sowie inflammatorischen Zellen statt (Holtzman et al., 1988, Nahori et al., 1991, Chen et al., 1995, Woods et al., 1995, Brock et al., 1995, Pouliot et al., 1996).

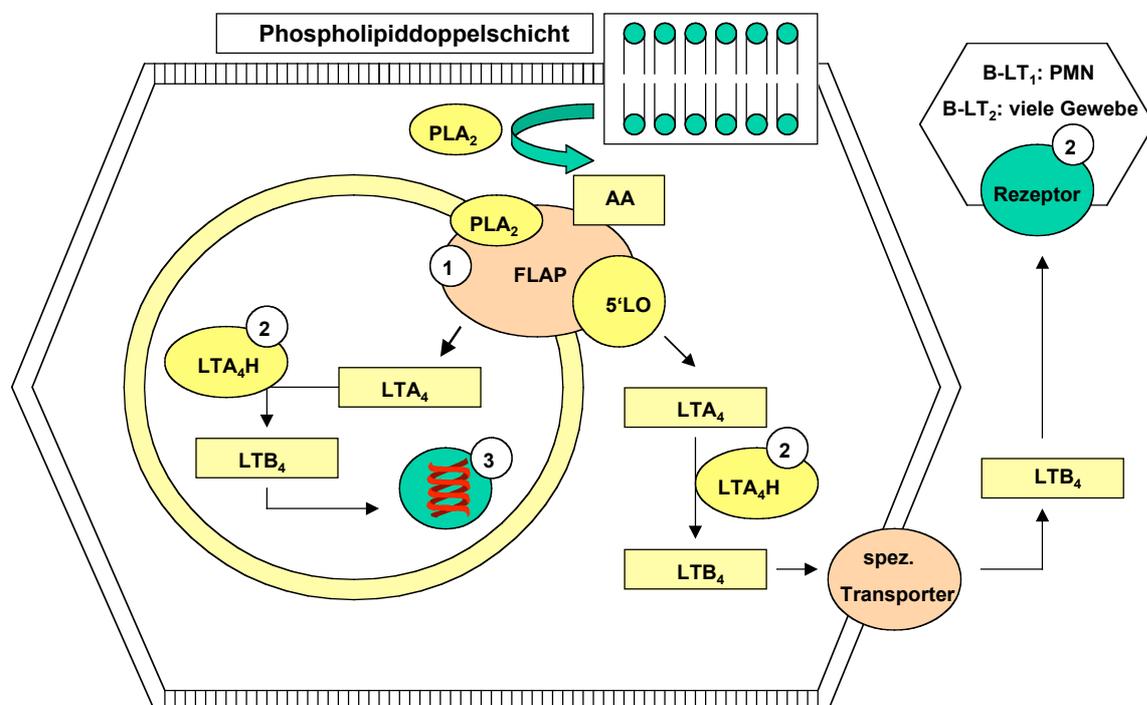


Abb. 4: Darstellung der Leukotrien B₄-Kaskade (Schema nach Funk 2001)

Erläuterungen zu Abb. 4:

5'LO = 5'Lipoxygenase

AA = Arachidonsäure

B-LT_{1, 2} = Leukotrien B₄-Rezeptoren
 FLAP = 5-Lipoxygenase bindendes Protein
 LTA₄ = Leukotrien A₄

LTA₄H = Leukotrien A₄-Hydrolase
 LTB₄ = Leukotrien B₄
 PLA₂ = Phospholipase A₂

Die Leukotriene stellen dabei, ebenso wie die Prostaglandine, Lipidmediatoren der Arachidonsäure dar. Durch Immunkomplexe oder bakterielle Peptide findet eine Translokation der Phospholipase A₂, als auch der 5-Lipoxygenase (5'LO), zur Kernhülle statt (Woods et al., 1993, Glover et al., 1995) (Reaktionsschritt 1 in Abb. 4). Die 5-Lipoxygenase ist dabei das Schlüsselenzym dieser Kaskade. Sie kann, abhängig vom Zelltyp, intranukleär und auch intrazellulär vorliegen (Peters-Golden und Brock, 2000). Ein Kernhüllenprotein (FLAP = 5-Lipoxygenase-aktivierendes Protein) bindet die Reaktionspartner, wie die Phospholipase A₂, die Arachidonsäure sowie die 5-Lipoxygenase und verwandelt letztere (5'LO) in eine enzymatisch aktive Zustandsform. Die Reversibilität der Membranassoziation und somit der Synthese des Leukotrien-Vorläufers (LTA₄) ist von der Stärke und Dauer des jeweiligen Stimulus sowie der Verfügbarkeit des Kalzium abhängig (Malaviya et al., 1993, Brock et al., 1998). LTA₄ wird nun durch die im Kern bzw. im Zellplasma vorliegende LTA₄-Hydrolase in LTB₄ umgewandelt (Reaktionsschritt 2 in Abb. 4), um über Transkriptionsfaktoren Einfluss auf die Proteinbiosynthese zu nehmen (Reaktionsschritt 3 in Abb. 4) oder rezeptorgesteuert auf Gewebe und neutrophile Granulozyten zu wirken (Reaktionsschritt 4 in Abb. 4).

Leukotrien B₄ im AKO wird als ein Marker für entzündliche Atemwegserkrankungen bei Menschen und Tieren bezeichnet werden (Wardlaw et al., 1989, Blankenburg et al., 2000, Montuschi und Barnes 2000, Reinhold et al., 2000, Csoma et al., 2002, Carpagnano et al., 2003a). Diesem Dihydroxy-Leukotrien wird insbesondere eine Bedeutung für die Initiation der hauptsächlich Mastzell- und Makrophagen-abhängigen inflammatorischen Antwort zugeschrieben (Mandal et al., 2004). Leukotrien B₄ kann seine Funktionen in den Atemwegen auf indirektem Wege, d.h. über Transkriptionsfaktoren oder mittels membranständiger Rezeptoren im Gewebe ausüben.

Wie in Tab. 3 zusammengefasst, scheinen die physiologischen Konzentrationen des Leukotrien B₄ im Kondensat zwischen Mensch und Kalb vergleichbar zu sein. Die in der Literatur angegebenen Mittelwerte schwanken zwischen $6,1 \pm 0,3$ pg/ml und $206,6 \pm 18$ pg/ml (Pontier et al., 2003, Carpagnano et al., 2003a). Bei gesunden Probanden konnte ein Einfluss des Rauchens und der Antibiotikaeinnahme gezeigt werden (Biernacki et al., 2003b, Carpagnano et al., 2003a). Steroide scheinen die Leukotrien B₄-Konzentration im AKO nicht zu verändern (Montuschi et al., 2003a).

Die inter- und intra-individuellen Abweichungen wurden bei klinisch gesunden Kälbern innerhalb eines 7 - 8 wöchigen Versuchszeitraumes bzw. jeweils zwischen 2 Messtagen untersucht. Die Leukotrien B₄-Konzentration im Atemkondensat war mit einer Schwankungsbreite von 12 % (3 - 25 %) gut reproduzierbar (Reinhold et al., 1999). Beim Menschen wie auch bei Kälbern konnte eine niedrigere intra-individuelle Variation als im Vergleich zwischen verschiedenen Menschen oder Kälbern gezeigt werden (Becher und Schlichthaar, 2003, Knobloch, 2006).

Entzündliche Lungenerkrankungen, wie die Mukoviszidose, die COPD oder das Asthma des Menschen lassen sich durch zum Teil signifikante Anstiege dieses Mediators beschreiben. Auch an Tieren (Kalb, Pferd, Hund) mit respiratorischen Erkrankungen fand bereits eine LTB₄-Bestimmung im Atemkondensat statt (Tab. 3). Hierbei war während Infektionen der

Atemwege bei Kälbern eine signifikant erhöhte Konzentration (viral: 300 - 400 %, bakteriell: 179 %) dieses Mediators im Atemkondensat messbar (Reinhold et al., 2000). In der menschlichen und tierischen broncho-alveolären Lavage konnte zusätzlich eine Korrelation zwischen der Leukotrien B₄-Konzentration und der Anzahl der bestimmten neutrophilen Granulozyten, nicht aber zu alveolären Makrophagen nachgewiesen werden (Wardlaw et al., 1989, Reinhold et al., 2000).

Tab. 3: Leukotrien B₄-Konzentration im AKO bei gesunden sowie lungenkranken Menschen und Tieren

Diagnose		Konzentration	n	AKO-Gewinnung	Autoren
gesund					
Mensch		6,1 ± 0,3 pg/ml	14	EcoScreen	Carpagnano et al., 2003a
		15,5 ± 2,1 pg/ml	21	k.A.	Lehtonen et al., 2003
		61,4 ± 13,8 pg/ml	17	EcoScreen	Reineck et al., 2003
		206,6 ± 18 pg/ml	11	EcoScreen	Pontier et al., 2003
Kalb		4,45 – 6,92 pg/ml	98	EcoScreen	Knobloch, 2006
		116,1 ± 55,4 pg/ml	84	EcoScreen	Reinhold et al., 1999
krank					
Mensch	CF	28,8 ± 4,3 pg/ml	20	EcoScreen	Carpagnano et al., 2003d
		214,9 ± 74,1 pg/ml	14	EcoScreen	Reineck et al., 2003
	COPD	100,6 pg/ml (73,5 - 145,0 pg/ml)	20	EcoScreen	Montuschi et al., 2003a
		887 ± 90 pg/ml	47	EcoScreen	Musil et al., 2004
	SAR	146 ± 17,5 pg/ml	11	EcoScreen	Rovina et al., 2004
	Asbestosis	161,6 ± 126,1 pg/ml	21	k.A.	Lehtonen et al., 2003
	Husten	196 ± 25 pg/ml	18	EcoScreen	Pontier et al., 2003
	Asthma	16,13 ± 3,35 pg/ml	16	k.A.	Ahuja et al., 2003
		48,9 ± 5,0 pg/ml	15	EcoScreen	Montuschi et al., 1999
		253 ± 194 pg/ml	42	EcoScreen	Musil et al., 2004
Kalb	Pneumonie	95,7 ± 22,1 pg/ml	7	EcoScreen	Reinhold et al., 2000
Hund	respiratorische Erkrankung	15 - 94 pg/ml (Tubus, +4 klinisch Gesunde)	7	eisgekühlter Glas-Zylinder	Pietra et al., 2003
Pferd	Chronische AW-Veränderungen	171,4 ± 70,1 pg/ml	22	Eigenbau	Fey und Schack, 2001

Erläuterungen zu Tab. 3:

Angabe der Leukotrien B₄-Konzentration erfolgte als Mittelwert ± Standardabweichung bzw. der Minima und Maxima

AW = Atemwege

CF = Cystische Fibrose

COPD = Chronisch obstruktive Lungenerkrankung

k.A. = hierzu erfolgte keine Angabe

SAR = saisonale allergische Rhinitis

2.2.2.3 Weitere Parameter der Lipidperoxidation und des oxidativen Stress

Direkte Bestimmung der Marker der Lipidperoxidation und des oxidativen Stress

Aldehyde: Malondialdehyd (MDA) stellt ein Produkt der Oxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren, wie der Thiobarbitursäure, dar. Auf Grund eines schnellen Metabolismus und einem Anteil von weniger als 1 % der gebildeten Lipidperoxide scheint seine alleinige Bestimmung noch kein geeigneter Index für das Ausmaß der Lipidperoxidation zu sein (Brown und Kelly 1994). Dennoch deuten signifikant höhere MDA-Konzentrationen in der BALF asthmatischer Patienten gegenüber klinisch Gesunden auf durch oxidativen Stress bedingte entzündliche Vorgänge hin (Ozaras et al., 2000). Bei Pferden wurde die Malondialdehyd-Konzentration als ein Serummarker für oxidativen Stress während körperlicher Arbeit beschrieben (Deaton et al., 2002).

Weitere Produkte werden als Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen (TBARS) zusammengefasst. Signifikant höhere Konzentrationen waren im Plasma von Menschen mit bronchialem Asthma oder der Cystischen Fibrose, als auch im Atemkondensat (Asthma) gegenüber deren physiologischen Konzentrationen nachweisbar (Brown und Kelly, 1994, Antczak et al., 1997, Kalayci et al., 2000).

Die Bestimmung des Wasserstoffperoxides stellt einen weiteren Marker des oxidativen Stresses dar. Dieses Superoxid-stämmige Aldehyd war in 26 - fach erhöhter Konzentration im Kondensat von Asthmatikern oder auch in deren Exhalat nachweisbar (Antczak et al., 1997, Horváth et al., 1998a).

Ketone: Hohe Konzentrationen von Aceton (Propylketon) wurden im Exhalat von *Diabetes-mellitus*-Patienten nachgewiesen. Neben der Lipolyse ist auch die Lipidperoxidation eine Ursache für deren Entstehung aus Acetoacetat (Lebovitz, 1995).

Alkane: Der Pentan- und Ethan-Gehalt der Ausatemluft liefert ebenfalls einen Hinweis auf eine ablaufende Fettsäure-Peroxidation. Eine signifikant erhöhte Ethankonzentration der Atemluft deutet auf ROS bedingte entzündliche Vorgänge innerhalb der Atemwege steroid-nativer Astmatiker und ist auch bei Patienten mit interstitiellen Lungenerkrankungen zu beobachten (Paredi et al., 2000, Soichiro et al., 2005). Unabhängig davon war dieser Oxidationsmarker auch im Exhalat klinisch gesunder Menschen und Schweine nachweisbar (Wade und van Rij, 1985, Wang et al., 1996).

Proteine: Nitrotyrosin (Peroxynitrit + Protein-Tyrosinreste) scheint einen weiteren Marker für oxidativen Stress darzustellen. Bei schweren Asthmatikern waren niedrigere Konzentrationen im AKO nachweisbar, während bei milden Erkrankungsformen hohe Nitrotyrosin-Konzentrationen bestimmt wurden (Hanazawa et al., 2000a,b).

Isoprostane: Wie bereits für das Atemkondensat beschrieben, konnten diese Arachidonsäure-stämmigen Peroxidationsprodukte als Marker für oxidativen Stress auch im Serum des Pferdes und in den broncho-alveolären Spülflüssigkeiten von Kälbern, Hunden, Katzen und Pferden nachgewiesen werden (Kirschvink et al., 1999, 2002a,b,c, Hirt et al., 2004a,b).

Antioxidantien-Konzentrationen und –Aktivitäten von Antioxidantien

Auch Antioxidantien können über die Bestimmung ihres radikalfangenden Potentials, ihrer Konzentration (mRNA, Protein), ihrer Aktivität oder auch ihrer Co-Faktoren, einen Hinweis auf Radikal-bedingte Abläufe liefern. Physiologische Unterschiede in der antioxidativen Ausstattung oder auch das Fehlen von Korrelationen innerhalb der zu untersuchenden Medien (ELF [AKO, Sputum, BALF], Plasma) sowie das variable Verhalten der einzelnen

Marker während Entzündungsprozessen erschweren dabei die Interpretation von Messergebnissen. Zu den wichtigsten Antioxidantien der ELF gehören die Mucine, Harnsäure, Protein (Albumin), Ascorbinsäure und das reduzierte Glutathion (Cross et al., 1994). Bei Asthmatikern wurden eine verminderte Ascorbinsäure- (Vitamin C) und α -Tocopherol (Vitamin E)-Konzentrationen in der ELF nachgewiesen, die aber im Serum nicht bestanden (Smith et al., 1993, Kelly et al., 1999). Im Gegensatz dazu wurden bei Kindern während und nach asthmatischen Anfällen niedrigere Serumspiegel antioxidativer Vitamine (α -Tocopherol, Ascorbinsäure, β -Caroten) bestimmt (Kalayci et al., 2000). Der Gehalt an oxidiertem Glutathion (GSH) auf der Atemwegsoberfläche (bronchial; alveolär) war dagegen sogar erhöht (Smith et al., 1993).

Auch in der BALF des Pferdes dient die Bestimmung des Vitamin C und E als Marker oxidativer Schädigung (Deaton et al., 2002, 2004b, 2005). Ebenso wurde bei Schweinen die Bestimmung die α -Tocopherolkonzentration im Serum als Marker der Lipidperoxidation beschrieben (Wang et al., 1996).

Nach Untersuchungen von Smith konnte die Katalase in der ELF von asthmatischen und gesunden Probanden nur unregelmäßig nachgewiesen werden und auch die SOD-Aktivität in alveolären und bronchialen Spülproben unterschied sich erkrankungsbedingt nicht (Smith et al., 1993). Im Blut waren dagegen eine signifikant niedrigere Katalase- und GSH-Konzentration nachweisbar (Novak et al., 1991). Aber auch eine unveränderte Serum-Aktivität der SOD wurde beschrieben (Wood et al., 2000). Im asthmatisch veränderten Atemwegsepithel war trotz unveränderter Cu-, Zn-SOD-, mRNA- und Protein-Konzentration eine niedrigere Enzymaktivität zu beobachten, die durch oxidative Schädigung des Eiweißmoleküls verursacht wird. Die katalytischen Eigenschaften der Katalase und der GSH-Peroxidase waren, im Gegensatz zum unveränderten Epithel, vermindert (De Raeve et al., 1997).

Auch bei Tieren dient die Untersuchung des Glutathion (red., oxid., ges. GSH, GSH Redox-ratio) im Serum, dem Trachealsekret und der BALF des Pferdes, als auch der des Kalbes zum Nachweis eines Oxidantien/Antioxidantien Missverhältniss (Mills et al., 1996, Art et al., 1999, Deaton et al., 2002, 2005, Kirschvink et al., 2002a,b,c).

Ebenso kann ein Serumdefizit der SOD-Co-Faktoren Zink und Selen einen indirekten Hinweis auf oxidativen Stress (Asthma) liefern. Für Selen konnte sogar eine negative Korrelation zur 8-Isoprostan-Konzentration gezeigt werden (Wood et al., 2000). Bei Pferden bestand zusätzlich ein Zusammenhang zwischen dem Eisengehalt der BALF und entzündlichen Veränderungen der Atemwege nachgewiesen werden (Mills et al., 1996). Die Bestimmung der Harnsäure als Marker antioxidativer Imbalance wurde im Serum von Pferden als auch in der BALF von Pferden und Kälbern durchgeführt (Kirschvink et al., 2002a,c).

Lipoproteine

Auch die Änderungen der elektrophoretischen Mobilität der Low-density-Lipoproteine (LDL) oder die quantitative Bestimmung von Antikörpern gegen oxidativ verändertes LDL, die an der Pathogenese der Arteriosklerose beteiligt sein sollen, können Hinweise auf die Lipidperoxidation liefern (Tatzber et al., 1997, Morrow und Roberts, 2002).

2.2.3 Stickstoff-haltige Mediatoren

2.2.3.1 Nitrit, NO

Stickstoffmonoxid (NO) ist eines der am besten untersuchten Gase der Exhalat-Diagnostik bei Mensch und Tier dar (Tab. A 1 und A 2). Im Atemkondensat bestimmtes Nitrit dient als ein messbares Umwandlungsprodukt des exhalieren Stickstoffmonoxides. Über die Hauptproduktionsstätte des exhalieren NO bestehen unterschiedliche Ansichten. Hier werden die Atemwege und die Nasennebenhöhlen genannt (Persson et al., 1993, Lundberg et al., 1995, Dillon et al., 1996, Silkoff et al., 1998). Altersabhängig konnte ein Anstieg der bronchialen, nicht aber der alveolären Stickstoffmonoxid-Produktion nachgewiesen werden (Phillip et al., 2002, Latzin et al., 2003). Mögliche Quellen einer Nitrit-Kontamination stellen die Mundhöhle (mikrobiell gebildet, Nahrung), die Oberfläche wiederverwendeter Materialien sowie der NO-Gehalt der Umgebungsluft dar (Zetterquist et al., 1999).

Das katalysierende Enzym der Stickstoffmonoxid-Bildung ist die NO-Synthase, die nach Funktion und exprimierendem Gewebe in 3 Isoformen unterteilt wird: die neurale (nNOS), induzierbare (iNOS) und endotheliale Form (eNOS). Aber auch eine mitochondriale Isoform wird in der Literatur beschrieben (Lacza et al., 2001). Stickstoffmonoxid entsteht bei der Umwandlung des Arginin zu Citrullin unter Wirkung weiterer Cosubstrate (NADPH, Sauerstoff) und Co-Faktoren (FAD, FMN, Tetrahydrobiopterin) (Abb. 5). Bei der neuralen und der endothelialen NOS bestehen hochaffine Bindungsstellen für Kalzium und Calmodulin. Nach deren Anlagerung wird eine Konformationsänderung und damit die Aktivierung des Enzymes induziert (Belvisi und Mitchell, 2003). Die Stickstoffmonoxid-abhängige proinflammatorische und anitnflammatorische Aktivität während entzündlichen Geschehen wird dabei durch die Vielzahl der möglichen Reaktionsprodukte gewährleistet (Abb. 5).

Bedingt durch die über proinflammatorischen Zytokine ($\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$) ausgelöste, Aktivitäts- und Expressionssteigerung der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) ist im Exhalat ein Stickstoffmonoxid (NO)-Anstieg nachzuweisen (Hibbs et al., 1992, Markewitz et al., 1993, Li et al., 2002). Dieser ist somit als ein Marker für die in den Atemwegen ablaufenden immunologischen Abwehrfunktion gegen Bakterien, Viren und Parasiten nutzbar (Nathan und Hibbs, 1991, Saura et al., 1999, Ascenzi et al., 2003). In Körperflüssigkeiten und im Atemkondensat ist NO selbst wegen der niedrigen Halbwertszeit und der hohen Reaktivität schlecht messbar. In der gasförmigen Phase, z.B. der Ausatemungsluft, ist Stickstoffmonoxid dagegen stabil. Es soll allerdings nur einen schlechten Marker für die endogene Aktivität der konstitutiven (eNOS, nNOS) und induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase darstellen (Ho et al., 1998). Im Kondensat nachweisbares Nitrit wird dagegen als geeigneter Marker bezeichnet (Ho et al., 1998). Eine Korrelation zwischen dem Nitrit-Gehalt des AKO und dem exhalieren Stickstoffmonoxid wurde, mit Ausnahme einer Publikation, in der Literatur jedoch nicht beschrieben (Horváth et al., 1997, Ho et al., 1998, Balint et al., 2000b, Horváth et al., 2002, Csoma et al., 2001a, Latzin, 2003, Geldmacher et al., 2004, Zetterquist et al., 2004, Ojoo et al., 2005 ($\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$)). Auch war die Abhängigkeit zu systemischen und pulmonalen Markern der Entzündung bisher nicht nachzuweisen (Gessner et al., 2003a).

Nitrit im Atemkondensat bzw. das Verhältnis $\text{AKO-NO}_2^-/\text{VT}$ wird zusätzlich als ein Marker für den mechanischen Stress der Lunge sowie, zwar weniger sensitiv als zur Entzündung, als Marker einer Schädigung der Atemwege bezeichnet (Ho et al., 1998, Gessner et al., 2003a, Skrahin et al., 2004). Nach Untersuchungen an gesunden und Pneumonie-kranken Kindern soll Nitrat den wichtigeren Marker des NO-Stoffwechsels darstellen. Nitrit dagegen konnte bei keinem der Kinder in der BALF nachgewiesen werden (Grasemann et al., 1997).

In der Literatur werden physiologische Nitrit-Konzentrationen im AKO des Menschen angegeben, die zwischen 0,55 $\mu\text{M/l}$ und 3,9 $\mu\text{M/l}$ liegen (Hunt et al., 2000, Balint et al., 2000b). Bei klinisch gesunden Schweinen war eine größere Schwankung der Messergebnisse (0,3 $\mu\text{M/l}$ bis 6,8 $\mu\text{M/l}$) nachweisbar (Reinhold et al., 2004b). Eine Erhöhung der Nitritabgabe wurde bei Asthma, der Mukoviszidose, der Cystischen Fibrose und auch dem ARDS Syndrom beobachtet (Ho et al., 1998, Balint et al., 2000b, Formanek et al., 2002, Gessner et al., 2003a). Ein Auszug der in der Literatur bereits beschriebenen Nitrit- bzw. Nitrat-Konzentrationen im Atemkondensat bei Menschen und Tieren wird in Tab. 4 wiedergegeben.

Tab. 4: Nitrit-Konzentration im AKO bei gesunden sowie lungenkranken Menschen und Tieren

Diagnose		Konzentration	n	AKO-Gewinnung	Autoren
gesund (NO_2^-)					
Mensch		0,55 $\mu\text{M/l}$ (0,31 - 2,33)	19	R-Tube	Hunt et al., 2000
		1,0 $\mu\text{M/l}$ (Kinder)	9	k.A.	Cunningham et al., 2000
		3,9 \pm 0,6 $\mu\text{M/l}$	10	EcoScreen	Balint et al., 2000b
Schwein		0,3 - 6,8 $\mu\text{M/l}$	12	EcoScreen	Reinhold et al., 2004b
gesund ($\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$)					
Mensch		0,64 \pm 0,2 $\mu\text{M/l}$	15	k.A.	Loukides et al., 2000
		4,3 $\mu\text{M/l}$ (3,0 - 6,1 $\mu\text{M/l}$) (oral)	20	EcoScreen	Chladek et al., 2003
		11,0 $\mu\text{M/l}$ (5,3 - 22,7 $\mu\text{M/l}$) (nasal)	20		
		26,13 \pm 3,5 $\mu\text{M/l}$	10	EcoScreen	Balint et al., 2000a
krank (NO_2^-)					
Mensch	CF	6,5 \pm 3 $\mu\text{M/l}$	7	EcoScreen	Balint et al., 2000b
		2,02 $\mu\text{M/l}$ (0,43 - 6,37 $\mu\text{M/l}$) (Kinder)	12	(nach Dohlmann et al., 1993)	Formanek et al., 2002
	ARDS	6,28 \pm 1,94 $\mu\text{M/l}$ (ventiliert)	15	EcoScreen	Gessner et al., 2003a
	Asthma	2,1 $\mu\text{M/l}$ (0,63 - 5,54 $\mu\text{M/l}$) (Kinder, Steroide)	29	(nach Dohlmann et al., 1993)	Formanek et al., 2002
	niedriger AKO-pH	0,77 $\mu\text{M/l}$ (0,18 - 4,85 $\mu\text{M/l}$)	22	R-Tube	Hunt et al., 2000
	hoher AKO-pH	1,5 $\mu\text{M/l}$ (0,45 - 2,71 $\mu\text{M/l}$)			
krank ($\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$)					
Mensch	CF	29,7 \pm 5,8 $\mu\text{M/l}$	7	EcoScreen	Balint et al., 2000a
	Asthma	4,3 $\mu\text{M/l}$ (2,7 - 6,9 $\mu\text{M/l}$) (oral)	20	EcoScreen	Chladek et al., 2003
		7,9 $\mu\text{M/l}$ (2,8 - 22,8 $\mu\text{M/l}$) (nasal)	20		

Erläuterungen zu Tab. 4:

Angabe der Nitrit-Konzentration erfolgte als Mittelwert ± Standardabweichung bzw. der Minima und Maxima

AKO = Atemkondensat

ARDS = akutes respiratorisches Dyspnoe-Syndrom

CF = Cystische Fibrose

COPD = Chronisch obstruktive Lungenerkrankung

k.A. = hierzu erfolgte keine Angabe

NO₂⁻/NO₃⁻ = Nitrit/Nitrat

pH = Protonen-Konzentration

Die inter-individuelle Variabilität bei Mensch und Tier soll für die Nitrit- und Nitrat-Bestimmung stärker von Bedeutung sein als intra-individuelle Unterschiede mehrerer Messungen (Becher und Schlichthaar 2003, Reinhold et al., 2004b). Bei Schweinen und Kälbern wurde die Wiederholbarkeit der Nitrit-Bestimmung im AKO innerhalb eines Tieres als hoch reproduzierbar bezeichnet, beim Menschen liegt diese nur bei 47 % (Anderson et al., 2003, Reinhold et al., 2004b, Knobloch, 2006). Für den Stickstoffmonoxid-Gehalt des Exhalates war ein Einfluss des Geschlechts, des Rauchens, aber nicht der Tageszeit beschrieben worden (Hacken et al., 1998, Yurdakul et al., 2000, Asakura et al., 2003). Die Corticosteroid-Einnahme beeinflusste die Nitrit-Konzentration im AKO nicht signifikant (Ho et al., 1998, Cunningham et al., 2000, Horváth et al., 2002).

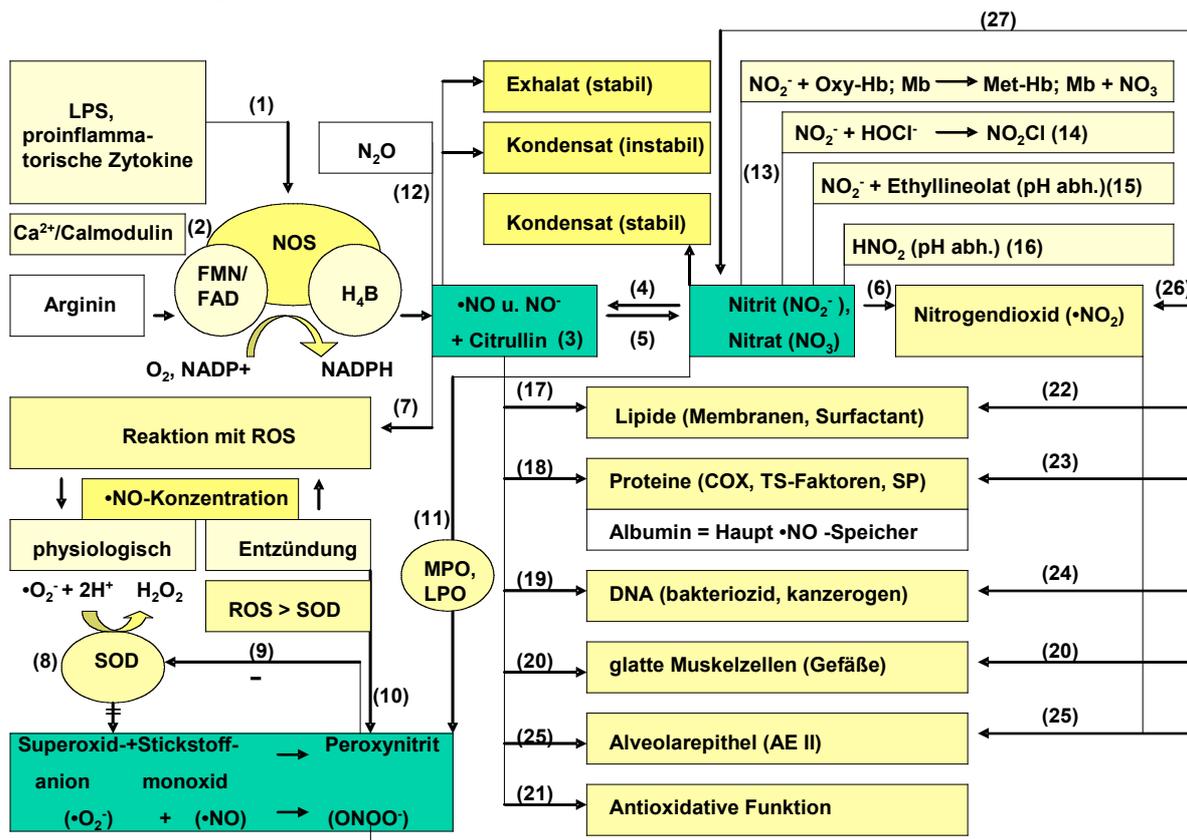


Abb. 5: Schematische Darstellung der Nitritbildung sowie weiterer Stoffwechselwege

Tab. 5: Erläuterungen zu den in Abb. 5 ausgewiesenen Reaktionsschritten

Rkt.-schritt	Bemerkung		Autoren	
1	iNOS-Induktion	LPS (NF κ B)	Li et al., 2002	
		Zytokine (TNF α , IFN γ , IL)	Hibbs et al., 1992, Markewitz et al., 1993	
2	Co-Faktoren- und -Substrate		Cho et al., 1992	
3	Nitroxyl-Anion/ \bullet NO-Bildung		Xia und Zweier, 1997, Schmidt et al., 1996	
4	bei niedrigem pH (Nitrit zu Stickstoffmonoxid)		Weitzberg und Lundberg, 1998, Hunt und Gaston, 2001	
5	Nitrit und Nitrat		Xia und Zweier, 1997	
	Hauptendprodukt	Nitrit	van der Vliet et al., 1997	
6	MPO, LPO-abhängig (+ Wasserstoffperoxid)		Baldus et al., 2001	
7	Peroxynitritbildung (Superoxidabhängig)		Beckman, 2001	
8	SOD schützt vor Peroxynitritbildung		Beckman et al., 1990	
9	Peroxynitrit hemmt SOD-Aktivität		Cuzzocrea et al., 2001	
10	Peroxynitritbildung bei hohem ROS-Spiegel		Gutierrez et al., 1996	
11	Peroxidasen-abhängige Peroxynitritbildung		Brennan et al., 2002	
12	über Nitroxylanion		Schmidt et al., 1996	
13	Nitrit-Umwandlung		Doyle et al., 1985, Eiserich et al., 1996	
15	nur bei niedrigem pH (Nitrit+Ethyllineolat)		Napolitano et al., 2000	
16	Protonierung des Nitrit bildet nitröse Säure		Klebanoff, 1993	
17	Lipide	Hemmung der Lipidperoxidation	Rubbo et al., 1994	
		Auslöser der Lipidperoxidation		
18	Protein (RS-NO)	Hämoglobin	Beckman und Koppenol, 1996	
		Albumin	Stamler et al., 1992	
		Enzyme (AK, DNA-Synthese, COX, LO, PGI $_2$, TXA $_2$)	Hibbs et al., 1988, Kanner et al., 1992, Wade und Fritzpatrick, 1997	
19	DNA-Schädigung (Deaminierung)		Hibbs et al., 1988, Wink et al., 1991	
20	Blutdruck, Oxygenation des Gewebes		Jia et al., 1996	
21	antioxidativ		Kanner et al., 1992, Gutierrez et al., 1996	
22	Lipide	Hemmung der Surfactantaggregation	Cuzzocrea et al., 2001	
		Induktion der Lipidperoxidation	Radi et al., 1991	
		Nitrolinolatbildung	Coles et al., 2002	
23	Protein	Surfactantprotein	Haddad et al., 1994	
		Antioxidantien (GSH)	van der Vliet et al., 1994	
		Strukturproteine(Neurofilamente, Aktin)	Beckman und Koppenol, 1996	
		Enzyme	Hemmung der AK, SOD	Cuzzocrea et al., 2001
			Förderung der PGHS	Goodwin et al., 1999
24	DNA	Körperzellen	Cuzzocrea et al., 2001	
		bakterizid	Zhu et al., 1992	
25	Hemmung der Natriumabsorbtion		Guo et al., 1998	
26	Nitrogendioxid-Bildung (MPO-abhängig)		Floris et al., 1993	
27	ONOO $^-$ (Kohlendioxid-abhängig) zu Nitrat (95 %)		Beckman et al., 1990	

Erläuterungen zu Abb. 5 und Tab. 5:

AE = Alveolarepithelzelle (Pneumozyt)

AK = Atmungskette

Ca²⁺ = Kalzium

COX = Cyclooxygenase

DNA = Desoxyribonucleinsäure

FMN/FAD = Flavin-Coenzym

GSH = Glutathion

H⁺ = WasserstoffH₂O₂ = WasserstoffperoxidH₄B = Tetrahydrobiopterin

Hb = Hämoglobin

HNO₂ = Nitrit-stämmige SäureIFN_γ = Interferon gamma

IL = Interleukine

IP = Isoprostan

L-NO₂ = Nitrosolineolat

LO = Lipooxygenase

LPO = Laktoperoxidase

LPS = Lipopolysaccharid

Mb = Myoglobin

Met- = Metoxy-

MPO = Myeloperoxidase

NADP⁺/H = Pyridin-Nucleotid-Coenzyme

NfκB = nuklear factor kappaB

N₂O = Dinitrogenoxid

•NO = Stickstoffmonoxid

NO⁻ = Nitroxyl-AnionNO₂⁻ = Nitrit•NO₂ = NitrogendioxidNO₂Cl = NitrylchloridNO₃ = Nitrat

NOS = Stickstoffmonoxidsynthase

O₂ = Sauerstoff•O₂⁻ = SuperoxidanionONOO⁻/ONOOH = Peroxynitrit

PGHS = Prostaglandin-H Synthase

PGI₂ = Prostaglandin I₂

pH = Protonen-Konzentration

Rkt. = Reaktion

ROS = radikale Sauerstoff-Spezies

RS-NO = Nitrosothiole

SOD = Superoxiddismutase

SP = Surfactantprotein

TNF_α = Tumor Nekrose Faktor alpha

TS- = Transskriptions-

TXA₂ = Thromboxan A₂

2.2.3.2 Harnstoff

Zu den Endprodukten des Stickstoff-Stoffwechsels bei Wiederkäuern zählt der Ammoniak. Der Körper sieht einen Abbau dieses toxischen, lipidmembrangängigen Gases im Harnstoffzyklus der Leber vor, um so seine Konzentration im Extrazellularraum gering zu halten. Da Harnstoff frei permeabel zu sein scheint, wird seine Konzentration in der ASL auf die des Plasmas geschätzt. Es existieren bislang weder Beweise für aktive Transportprozesse noch für eine Harnstoff-Bildung oder Verstoffwechslung in der Lunge (Effros et al., 2003a, 2005). Bei Wiederkäuern werden 90 % des gebildeten Harnstoffs nicht ausgeschieden, sondern zum mikrobiellen Proteinaufbau wiederverwendet. Die Aufnahme aus dem Blut erfolgt dabei über ein durch mikrobielle Ureasen stets aufrecht erhaltenes Konzentrationsgefälle in die Speicheldrüsen und durch die Pansenwand (Kap. 2.2.3.3). Beim Menschen soll etwa ein Viertel des AKO-Harnstoff allein aus der Mundhöhle stammen, da bei trachealer Probenahme eine Verringerung der nachweisbaren Konzentration um 25 % zu beobachten war (Martens et al., 2004a).

Bisherige Untersuchungen zum Nachweis von Harnstoff im AKO sprechen dafür, dass dieser als Entzündungsmarker nutzbar sein könnte. Ein Konzentrationsanstieg im Kondensat wurde nach akuten Lungenparenchym-Schädigungen bei experimentell mit *Mannheimia-haemolytica*-infizierten Kälbern nachgewiesen (Reinhold et al., 2001b). Da von verschiedenen Autoren positive Korrelationen zwischen der Harnstoff-Konzentration im AKO und Serum beobachtet wurden, scheint die Harnstoff-Bestimmung als Marker für eine entzündlich bedingte Permeabilitätssteigerung der alveolo-kapillären Membran geeignet zu sein (Diegel et al., 2000, Reinhold et al., 2001b). Unter physiologischen Bedingungen war dagegen bei

Menschen und Schweinen keine Abhängigkeit zu beobachten (Diegel et al., 2000, Reinhold et al., 2001c). Harnstoff wurde auch als Bezugsgröße zur Standardisierung anderer Entzündungs-Mediatoren diskutiert, da für den durch die alveolo-kapilläre Membran frei permeablen Harnstoff eine positive Korrelation zum Gesamtprotein-Gehalt im AKO gesunder Schweine darstellbar war (Reinhold et al., 2001c). Auch wurde Harnstoff als ein Verdünnungsmarker (D) der Kondensattröpfchen diskutiert,

$$D_{\text{Harnstoff}} = [\text{Harnstoff}]_{\text{Serum}} / [\text{Harnstoff}]_{\text{lyophilisiertes Kondensat}}$$

mit dessen Hilfe eine Standardisierung der Kondensatgewinnung erreicht werden könnte (Effros et al., 2003a, 2004, 2005). Dieser Annahme widerspricht die unter physiologischen Bedingungen vorauszusetzende, aber in Untersuchungen weder für Menschen noch Tiere (Schwein, Kalb) nachgewiesene positive Korrelation zwischen der Serum- und AKO-Konzentration. Abschließend scheint Harnstoff daher kein geeigneter Standardisierungsmarker der Atemkondensat-Gewinnung zu sein (Reinhold et al., 2001c) (Kap. 5.1.2).

Im Atemkondensat klinisch gesunder Menschen waren niedrigere Harnstoff-Konzentrationen als bei Kälbern und Schweinen nachweisbar (Reinhold et al., 2001b, c) (Tab. 6). Im Mittel schwanken sie bei humanen Probanden zwischen 3,8 µg/ml und 9,5 µg/ml (Diegel et al., 2000, Gessner et al., 2000b). Bei Schweinen wurden dagegen physiologische Konzentrationen von $2,5 \pm 1,2$ mg/ml, bei Kälbern von $4,7 \pm 2,7$ mg/ml ermittelt (Reinhold et al., 2001b,c). Ein deutlicher Anstieg konnte bei der COPD des Menschen (Gessner et al., 2001) oder der Bronchopneumonie des Kalbes gezeigt werden (Reinhold et al., 2001a, b). Intra-individuelle Variationen der Harnstoffkonzentration im Atemkondensat liegen zwischen 100 - 200 %. Die Ursache für den Konzentrationsanstieg wird in einer durch die Dauer des Gewinnungsprozesses ausgelösten Reizung der Atemwege gesehen, ein Abfall ist damit jedoch nicht zu klären (Diegel et al., 2000).

Tab. 6: Harnstoff-Konzentration im AKO bei gesunden sowie lungenkranken Menschen und Tieren

Diagnose		originale Konzentration	Konzentration in µg/ml	n	AKO-Gewinnung	Autoren
gesund						
Mensch		-	3,8 (1,9 - 4,3)	19	EcoScreen	Diegel et al., 2000
		$183 \pm 56,3$ µM/l	9,5	22	EcoScreen	Gessner et al., 2000b
Kalb		$4,7 \pm 2,7$ mg/ml	-	20	EcoScreen	Reinhold et al., 2001b
Schwein		$2,5 \pm 1,2$ mg/ml	-	9	EcoScreen	Reinhold et al., 2001c
krank						
Mensch	COPD	$370,4 \pm 244,2$ µM/l	19,3	23	EcoScreen	Gessner et al., 2001
	obstr. Lungen- erkrankung	-	4,1 (3,0 - 6,2)	19	EcoScreen	Diegel et al., 2000
Kalb	Broncho- pneumonie	$12,2 \pm 10,9$ mg/ml	-	20	EcoScreen	Reinhold et al., 2001b

Erläuterungen zu Tab. 6:

Angabe der Harnstoff-Konzentration erfolgte als Mittelwert \pm Standardabweichung bzw. der Minima und Maxima

COPD = Chronisch obstruktive Lungen-
erkrankung

CF = Cystische Fibrose
obstr. = obstruktiv

2.2.3.3 Ammonium

Ammonium (NH_4^+) soll mit 93 ± 3 % das Hauptkation im Atemkondensat darstellen (Effros et al., 2003a). Als mögliche Quelle werden das Serum und die in dem Atemwegs- und dem Alveolarepithel sowie in Entzündungszellen exprimierte Glutaminase genannt (Abb. 6). Dem gegenüber steht die Theorie, nach der die Mehrheit des AKO-Ammonium primär aus der Mundhöhle stammen soll (Norwood et al., 1992, Effros et al., 2002, 2006). Nicht nur bei Wiederkäuern spielt der rumiohepatische Kreislauf eine bedeutende Rolle, sondern auch bei Menschen wurde Harnstoff im Speichel nachgewiesen, der durch mikrobielle Ureasen gespalten und in Ammoniak (NH_3) umgewandelt wird. Vergleichende Untersuchungen an Menschen scheinen dies zu bestätigen, da bei trachealer bzw. nasaler Probennahme jeweils eine signifikant niedrigere Ammonium-Konzentration im Kondensat nachzuweisen war (Martens et al., 2004a, b). Auch die Mundspülung mit sauren Lösungen, die eine verminderte Ammonianreicherung im AKO zur Folge hatte, deutet darauf hin (Norwood et al., 1992).

In der Literatur ist auch bekannt, dass die Lunge nur zu einem unbedeutenden Anteil über das Exhalat zur Exkretion des systemischen Ammoniak beiträgt (Huizenga et al., 1996). Pulmonal gebildetes Ammonium soll unter der Abgabe eines Protons von der ASL schneller in die Gefäße diffundieren als abgeatmet zu werden (Effros et al., 2003b). Das in der Mundhöhle freigesetzte Ammoniak soll dabei, einmal inhaliert, die Lungen nicht wieder verlassen können, wogegen an Hunden nach experimenteller NH_3 -Inhalation Retentionsraten von etwa 78 % nachgewiesen werden konnten (Egle, 1973).

Im Magen-Darm-Trakt entsteht Ammonium als Produkt des mikrobiellen Protein-Abbaues der Nahrung. Über die Portalvene werden beim Menschen etwa 71 mM des toxischen Ammoniak pro Tag zur Leber transportiert, der nach durchlaufen des Harnstoffzyklus in ein wasserlösliches, unschädliches Transportprodukt umgewandelt und renal ausgeschieden werden kann (Huizenga et al., 1996). Bei Wiederkäuern unterliegen dagegen 90 % des gebildeten Harnstoffs dem ruminohepatischen Kreislauf. Die Aufnahme aus dem Blut erfolgt dabei in den Speicheldrüsen und durch die Pansenwand. Das Konzentrationsgefälle, wird hier durch mikrobielle Ureasen stets aufrechterhalten. Ein erhöhter retikulärer NH_4^+ -Spiegel hemmt über einen noch unbekanntes Mechanismus diesen Diffusionspfad und hat so über einen erhöhten Blutharnstoffspiegel auch eine erhöhte renale Elimination zur Folge. Auf Grund des pK Wertes des Ammoniak von 9,25 liegen bei einem Pansen-pH von 6,25 99,9 % in Form des NH_4^+ und nur 0,1 % als NH_3 vor. Ammoniak tritt nun auf passivem Wege, mit dem Konzentrationsgefälle (3 - 10 mM/l vs. 200 $\mu\text{M/l}$) ins Blut über, wogegen Ammonium, bedingt durch die geringere Lipidlöslichkeit, apikale epitheliale Kaliumkanäle nutzt.

Aber auch das Glutamin stellt ein nicht toxisches Umwandlungsprodukt des Ammoniak dar. Trotz einer geringen Glutamin-Synthetaseaktivität, aber einer hohen Gesamtmasse stellt der Skelettmuskel (in Ruhe) die bedeutendste Glutaminquelle des Organismus dar.

Die Änderung der pulmonalen Ammonium-Produktion soll als ein Kennzeichen für Entzündungen dienen. In der Literatur finden sich dazu unterschiedliche Aussagen. Einerseits soll die Hemmung der Ammoniak-produzierenden Glutaminase durch proinflammatorische Zytokine wie $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IFN}\gamma$ für eine niedrigere Ammonium-Konzentration im AKO

verantwortlich sein (Hunt et al., 2002, MacGregor et al., 2003a, b). Im Gegensatz dazu konnte bei Kälbern Pneumonie-assoziiert eine signifikant erhöhte Ammonium-Konzentration im Atemkondensat nachgewiesen werden (Reinhold et al., 2001a).

Die mittlere Ammonium-Konzentration im Atemkondensat tracheotomierter, lungengesunder Patienten lag zwischen $11,4 \pm 15,8 \mu\text{M/l}$ und $26 \pm 13 \mu\text{M/l}$ (Vass et al., 2003b, Effros et al., 2003a). Bei oraler Expiration wurden weit höhere Werte von $73,9 \pm 54,7 \mu\text{M/l}$ bis zu $1404 \mu\text{M/l}$ (Median: $808 \mu\text{M/l}$) ermittelt (Vass et al., 2003a, Carraro et al., 2004) (Tab. 7). Die Ergebnisse der nasal gewonnenen Proben klinisch gesunder Schweine scheinen nach derzeitigem Kenntnisstand mit denen des Menschen vergleichbar (Reinhold et al., 2004a). Bei Asthma- und CF-Patienten waren im direkten Vergleich der Autoren niedrigere Messwerte nachweisbar (Hunt et al., 2002, MacGregor et al., 2003a).

Tab. 7: Ammonium-Konzentrationen im Atemkondensat bei gesunden sowie lungenkranken Menschen und Tieren

Diagnose		Konzentration	n	AKO-Gewinnung	Deaeration	Autoren
gesund						
Mensch		$11,4 \pm 15,8 \mu\text{M/l}$ (tracheal)	25	EcoScreen	k.A.	Vass et al., 2003b
		$26 \pm 13 \mu\text{M/l}$ (tracheal)	5	Polycarbonat-Tube	-	Effros et al., 2003a
		$73,9 \pm 54,7 \mu\text{M/l}$ (oral)	25	EcoScreen	k.A.	Vass et al., 2003a
		$428 \pm 245 \mu\text{M/l}$	44	EcoScreen	k.A.	MacGregor et al., 2003a
		$571 \pm 386 \mu\text{M/l}$	62	EcoScreen	k.A.	MacGregor et al., 2003b
		$808 \mu\text{M/l}$ (663 - 1404 $\mu\text{M/l}$) (Kinder)	12	k.A.	k.A.	Carraro et al., 2004
Schwein		$200 \pm 62 \text{ nM/ml}$ (entspricht $\mu\text{M/l}$)	12	EcoScreen	-	Reinhold et al., 2004a
krank						
Mensch	CF	$215 \pm 384 \mu\text{M/l}$ (stabil)	22	EcoScreen	k.A.	MacGregor et al., 2003b
		$160 \pm 189 \mu\text{M/l}$ (akut)	21	EcoScreen	k.A.	MacGregor et al., 2003b
	Asthma	$30 \mu\text{M/l}$	18	R-Tube	Ar	Hunt et al., 2002
		$258 \pm 154 \mu\text{M/l}$	62	EcoScreen	k.A.	MacGregor et al., 2003a
		$335 \mu\text{M/l}$ (202 - 601 $\mu\text{M/l}$) (Kinder)	19	k.A.	k.A.	Carraro et al., 2004

Erläuterungen zu Tab. 7:

Angabe der Ammonium-Konzentration erfolgte als Mittelwert \pm Standardabweichung bzw. der Minima und Maxima

CF = Cystische Fibrose

nach Mac Gregor et al., 2005: keine Entgasung

k.A. = hierzu erfolgte keine Angabe

nach Carraro et al., 2005: Argon-Spülung

Die Ammonium-Konzentration im Atemkondensat unterlag physiologischen intra-individuellen Schwankungen zwischen 9,6 und 184,5 % (Median: 64,3 %), sowie einer tageszeitlich bedingten Variation zwischen 1 - 140,5 % (Median: 60,4 %) (Wells et al., 2005). Auch Vaughan et al., (2003b) wies bei vergleichenden Untersuchungen innerhalb eines Tages als auch zwischen mehreren Untersuchungstagen Variationskoeffizienten von 51 und 57 % nach. Ebenso wie für die Bestimmung der Protonen-Konzentration schienen kürzere Probenahmezeiten (2 vs. 7 min) die intra-individuelle Variabilität zu senken (11,6 vs. 15,8 %) (Hunt und Vaughan, 2002) (Kap. 2.2.4). Daten zu individuellen bzw. spezies-spezifisch bedingten Schwankungen der Ammonium-Konzentration des AKO bei Tieren wurden in der Literatur bisher nicht beschrieben.

2.2.4 pH-Wert

Die Eignung des AKO, die Protonen-Konzentration der Flüssigkeitsschicht auf den Atemwegen darzustellen, ist umstritten, da zwischen dem AKO und der ASL bisher nur eine schwache und nicht signifikante Korrelation nachgewiesen werden konnte (Inglis et al., 2003, Gessner et al., 2003b, Effros 2004, Effros et al., 2004, 2006). An frisch exenterierten Lungen gesunder Rinder bestand dagegen zwischen dem pH der ASL und der *post mortem* durch Intubation gewonnenen Kondensatprobe eine positive Korrelation (Bunyan et al., 2005). Nach Effros et al. (2005) erscheint es allerdings zweifelhaft, dass der pH des Atemkondensates überhaupt durch die Lunge beeinflusst wird.

Die Atemwege stellen die größte Angriffsfläche des Körpers gegenüber der Außenwelt dar. Ein Schutz vor eindringenden Erregern und Fremdstoffen muß bei gleichzeitigem Erhalt der Gasaustauschfunktion durch die alveolo-kapilläre Membran ermöglicht werden. Die ASL (periziliäre Schicht + Mucus) stellt mit einer durchschnittlichen Dicke von nur 1 – 5 μm ein entscheidendes, über die mucociliäre Clearance, antimikrobielle Inhaltsstoffe (Mucine, Surfactant, Proteine) sowie die von vielen Untersuchern beschriebene spezies-spezifische Azidität ein streng reguliertes Abwehrsystem dar (Adamson et al., 1969, Kyle et al., 1990, Jayaraman et al., 2001a, Fischer et al., 2002).

Bereits geringste ASL-pH-Wert Änderungen beeinflussen die Funktionen und Eigenschaften der Atemwege dramatisch. Dazu gehören die Konstriktion der Bronchien, die erhöhte Mucus-Viscoelastizität, die Permeabilitätserhöhung des Epithels sowie die Hemmung oder irreversible Schädigung des Zilienschlages, die Abgabe inflammatorischer Mediatoren oder die Anreicherung von Enzymen, RNS/ROS und vakuolären Protonen untergegangener Entzündungszellen (Holma et al., 1977, Holma und Hegg, 1989, Aris et al., 1990, Baud et al., 1997, Wardle, 2001, Ishizuka et al., 2001, Hunt et al., 2002). Zusätzlich konnten unter sauren Bedingungen verbesserte Bindungseigenschaften von Mikroorganismen an das Epithel, ein Einfluss auf deren Virulenzfaktoren und auch ein höherer Widerstand gegenüber Antibiotika, wie z.B. Aminoglycosiden beobachtet werden (Bodem et al., 1983, Ishizuka et al., 2001, McShane et al., 2003). Die Pufferungs- und Regulationseigenschaften innerhalb der ASL sind damit überlebenswichtig (Abb. 6).

Zwischen dem Serum und der ASL konnte ein physiologischer Gradient der Protonen-Konzentration nachgewiesen werden, der durch verschiedene Mechanismen aufrecht-erhalten wird. Dabei scheinen z.B. die alveolären Epithelzellen apikal und interzellulär impermeabel gegenüber Säuren und Basen zu sein (Joseph et al., 2002). Gleichzeitig wird aber in der Literatur ein ubiquitärer Protonen-Transport durch Membranprotein-Seitenketten gebundene Wassermoleküle (hydrogen-bound chain conduction), Protonierung von Phosphatgruppen und Fettsäureketten, die NADPH-Oxidase oder direkten Wassertransport (Aquaporine, transient water wires) beschrieben (Onsager, 1967, Gutknecht, 1988, DeCoursey, 2003, Schwarzer et al., 2004). Die Protonen-Permeabilität des humanen Atemwegsepithels scheint dabei unter der alveolärer Epithelzellen vom Typ II zu liegen (Fischer et al., 2002).

Die drei bedeutendsten apikalen Ionentransporter sollen die H^+ -ATPase, die K^+/H^+ -ATPase und H^+ -Kanäle darstellen, deren Anteil an der Protonen-Abgabe 11, 15 und 49 % ausmacht (Fischer et al., 2002). Dem widersprechen Annahmen, nach denen Ionen-abhängigen Protonen-Transportern (Na^+/H^+ -exchanger, K^+-H^+ -ATPase) keine entscheidende Rolle auf den Atemwegen zukommt (Fischer et al., 2002). Zusätzlich werden aber auch hier spezies-spezifische Besonderheiten angenommen (Fischer et al., 2002). Die Bildung der Hypochloren-, der Essig- oder der Milchsäure sowie der Peroxynitrit- oder Nitrit-stämmigen Säure nimmt ebenfalls Einfluss auf den pH-Wert der ASL (Koppenol et al., 1992, Klebanoff, 1993, Adolphson und Gleich, 1995, Eiserich et al., 1996, Goncharova et al., 1996, Vaughan et al., 2001, Gessner et al., 2003b). Auch die Abgabe vakuolärer Protonen untergegangener Zellen trägt zur Erhöhung der Protonen-Konzentration der ASL bei. Gleichzeitig findet eine Sekretion basischer Äquivalente über parazelluläre Pfade, die Expression der Glutaminase (Ammoniak vs. Bicarbonat (HCO_3^-)) oder des Cystic fibrosis conductance regulator (CFTR) statt (Hunt et al., 2002, Griffith, 2002, Coakley et al., 2003).

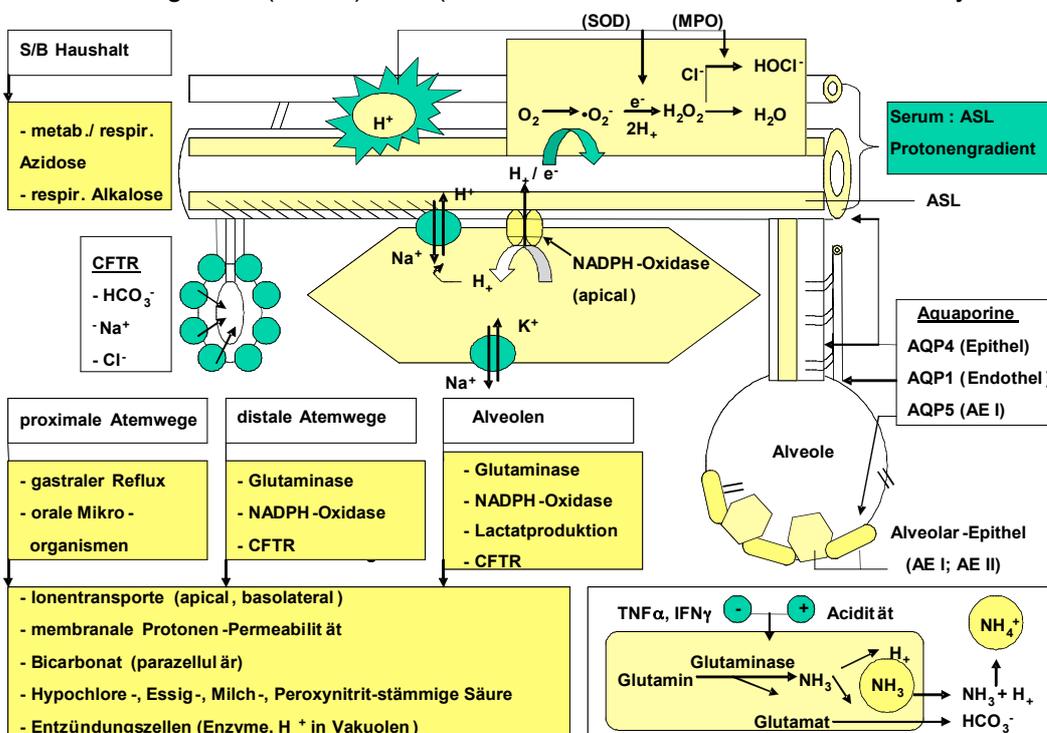


Abb. 6: Schematische Darstellung der vermuteten Regulationsmechanismen der ASL-Protonen-Konzentration

Erläuterungen zu Abb. 6:

AE = alveoläre Epithelzelle (Pneumozyt)

AQP = Aquaporin

ASL = airway surface layer

CFTR = Cystic fibrosis conductance regulator

Cl⁻ = Chloride⁻ = ElektronH⁺ = ProtonH₂O₂ = Wasserstoffperoxid (ROS)HCO₃⁻ = Bicarbonat

HOCl = hypochlore Säure

IFN_γ = Interferon gammaK⁺ = Kalium

met. = metabolisch

MPO = Myeloperoxidase

Na⁺ = Natrium

NADPH = Nicotinamid Adenin Dinucleotid

Phosphat

NADPH-Oxidase = Nicotinamid Adenin

Dinucleotid Phosphat-Oxidase

NH₃ = AmmoniakNH₄⁺ = AmmoniumO₂ = Sauerstoff•O₂⁻ = Sauerstoff-Radikal (ROS)

respir. = respiratorisch

S/B = Säure/Basen

SOD = Superoxiddismutase

TNF_α = Tumor Necrose Faktor alpha

Im AKO gesunder Probanden soll das CO₂/HCO₃⁻ Puffersystem alle anderen nicht-volatilen Puffer übertreffen. Die Konzentrationen anderer Ionen werden im Vergleich dazu auf unter 10 % geschätzt (Effros et al., 2005). Entgegen der Untersuchungen von Hunt et al., (2002a), die Ammoniak als Sekretionsprodukt glutaminasehaltiger Zellen eine alkalisierende Wirkung auf den ASL-pH zuschreiben, soll die eigentliche Bedeutung aber in der glutamatabhängigen Bicarbonatbildung bestehen (Transaminierung zu Alanin, Kohlendioxid und Bicarbonat) (Griffith, 2002). Der Einfluss respiratorischer und metabolischer Veränderungen im Säure-Basen-Haushalt werden widersprüchlich diskutiert (Jayaraman et al., 2001b, Vaughan et al., 2003a). Abb. 6 stellt die bisher vermuteten Regulationsmechanismen dar.

Wie in Tab. 8 dargestellt, wurde eine Untersuchung der Protonen-Konzentration des AKO bei Menschen, Hunden, Pferden, Schweinen sowie Kälbern beschrieben. Dabei kann neben der direkten Bestimmung des pH-Wertes (nativ) nach Beendigung des Gewinnungsvorganges bzw. nach dem Auftauen der Probe, eine Entfernung des gelösten Kohlendioxides, z.B. durch Argon- oder Stickstoffspülung (Deaeration) durchgeführt werden, der zu einem signifikanten Abfall der Protonen-Konzentration und zu einer verbesserten Reproduzierbarkeit der Ergebnisse führen soll (Hildebrand et al., 2004, Borill et al., 2005). Die notwendige Dauer ist dabei von der AKO-Menge abhängig, eine Überschreitung von 5 Minuten aber nicht erforderlich (Borill et al., 2005). Um das gesamte Kohlendioxid der Probe zu entfernen müsste dagegen mehr als eine Stunde unter anaeroben Bedingungen gespült werden (zitiert nach Effros et al., 2005). Eine parallele Bestimmung des Kohlendioxidpartialdruckes (PCO₂) oder die Festlegung eines standardisierten PCO₂ zum Messzeitpunkt scheint daher zusätzlich sinnvoll (Borill et al., 2005, Effros et al., 2005). In der Literatur beschriebene pH-Werte des Atemkondensates nach der Deaeration lagen für gesunde Probanden im Mittel zwischen 7,4 ± 0,9 und 8,26 ± 0,2 (Lehmann et al., 2003a, Niimi et al., 2004). Da durch die Spülung auch andere pH bestimmende flüchtige Inhaltsstoffe entfernt werden, Ab- und Umbauprozessen unterliegen oder durch die Dehydratation eine Erwärmung und Aufkonzentrierung der Probe stattfindet, bevorzugen andere Autoren die Untersuchung frischer Kondensate (Tate et al., 2002, Effros et al., 2004, Anaev und Chuchalin, 2004, Reinhold et al., 2006). Der in der Literatur angegebene physiologische Schwankungsbereich lag im Mittel zwischen 5,9 (5,0 - 7,3) und 7,3 ± 0,3 (Niimi et al., 2004,

Mc Gregor et al., 2005). Nach den Empfehlungen der ATS/ERS Task Force sollte die benötigte Zeit bis zur Bestimmung des pH-Wertes dokumentiert werden, da das Entweichen des CO₂ zu einem Anstieg des pH-Wertes führt (Horváth et al., 2005).

Eine Wiederholung der Untersuchung gesunder Menschen erreichte Schwankungen des AKO-pH zwischen 0,6 % und 5,49 % (Carpagnano et al., 2003c, Vaughan et al., 2003a,b, Gajdosci et al., 2003a). Bei klinisch gesunden Hunden wurde die Variabilität zwischen den Messtagen mit $1,4 \pm 0,8$ %, innerhalb eines Versuchstages mit $1,5 \pm 0,9$ % angegeben (Hirt et al., 2003). Tageszeitlich und wochentags bedingte Variationen gesunder menschlicher Probanden lagen im Mittel bei weniger als 5 % (Vaughan et al., 2003b, Ngamtrakulpanit et al., 2004, Wells et al., 2005). In Einzelfällen konnten aber auch zirkadiane Schwankungen von bis zu 23 % beobachtet werden (Wells et al., 2005). Die Bestimmung der Protonen-Konzentration wird dennoch als reproduzierbar und robust bezeichnet (Kostikas et al., 2002, Tate et al., 2002, Gessner et al., 2003b, Vaughan et al., 2003a, b, Hildebrand et al., 2004, Wells et al., 2005). Andere Untersucher halten eine korrekte aerobe Messung des pH dagegen für nicht möglich oder schlecht reproduzierbar (Palaiologou et al., 2000, Effros et al., 2004, 2005). Die Sammelzeit (2 vs. 7 min) schien dagegen den intra-individuellen Variationskoeffizienten (5,3 vs. 4,1 %) geringgradig zu senken (Hunt und Vaughan, 2002).

Eine Absenkung der Protonen-Konzentration im AKO ist bei akuten (und in geringerem Maße auch bei chronischen) entzündlichen Veränderungen auf den Atemwegen zu beobachten (Hunt et al., 2000, Kostikas et al., 2002, Tate et al., 2002, Gessner et al., 2003b) (Tab. 8). Als Ursache werden in der Literatur verschiedene Mechanismen diskutiert, die in den Abbildungen 6 und 26 dargestellt sind.

Tab. 8: pH-Wert des AKO, verwendete Geräte und Angaben bezüglich der Deaeration bei gesunden sowie lungenkranken Menschen und Tieren

Diagnose	pH-Wert	n	AKO-Gewinnung	Deaeration	Autoren
gesund					
Mensch	5,9 (5,0 - 7,3) (Kinder)	47	EcoScreen	nein	MacGregor et al., 2005
	$6,05 \pm 0,07$	15	k.A.	nein	Ojoo et al., 2003
	6,16 (6,02 - 6,58)	12	EcoScreen	nein	Hilgendorff et al., 2003
	$6,41 \pm 0,13$	16	EcoScreen	Ar	Gajdosci et al., 2003a
	7,04 (6,87 - 7,21) (oral)	17	EcoScreen	nein	Anaev und Chuchalin, 2004
	$7,29 \pm 0,25$	7	EcoScreen	nein	Niimi et al., 2004
	8,0 (4,5 - 8,4)	404	R-Tube	Ar	Paget-Brown et al., 2006
	$7,4 \pm 0,9$	18	EcoScreen, R-Tube, Eigenkonstruktion	N ₂	Lehmann et al., 2003a
	$7,46 \pm 0,48$	12	EcoScreen	Ar	Gessner et al., 2003b

		7,65 ± 0,2	19	R-Tube	Ar	Hunt et al., 2000
		7,70 ± 0,49	790	R-Tube	Ar	Vaughan et al., 2003a
		7,83 ± 0,03	12	R-Tube	Ar	Ngamtra-kulpanit et al., 2003
		7,85 ± 0,02	13	k.A.	Ar	Carraro et al., 2005
		8,26 ± 0,2	7	EcoScreen	Ar	Niimi et al., 2004
Hund		7,6 - 7,8	6	Stahl-Tube	k.A.	Hirt et al., 2003
Schwein		5,83 ± 0,15	24	EcoScreen	nein	Reinhold et al., 2006
Kalb		5,87 ± 0,16	24			
krank						
Mensch	CF	5,32 ± 0,38 <i>(akut)</i>	11	Teflon-Perfluoroalkoxy-Tube	k.A.	Tate et al., 2002
		5,88 ± 0,32 <i>(stabil)</i>	19		k.A.	
		6,62 ± 0,14 <i>(akut)</i>	18	k.A.	nein	Ojoo et al., 2003
		7,23 ± 0,03 <i>(Kinder)</i>	20	k.A.	k.A.	Carpagnano et al., 2003b
	COPD	5,18 ± 0,18	9	eisgekühlter Plastik-Tube	nein	Hogg et al., 2003
		6,39 (6,22 - 6,56) <i>(oral)</i>	47	Ecoscreen	nein	Anaev et al., 2003a
		7,16 (7,09 - 7,23)	20	EcoScreen	Ar	Kostikas et al., 2002
	Pneumonie	5,85 (5,74 - 5,97) <i>(oral)</i>	19	Ecoscreen	nein	Anaev et al., 2003b
	Allerg. Rhinitis	7,21 ± 0,16 <i>(nasal)</i>	8	EcoScreen	Ar	Carpagnano et al., 2003c
		7,67 ± 0,01	8			
	Bronchiektasie	7,11 (7,04 - 7,19)	20	EcoScreen	Ar	Kostikas et al., 2002
	IPF	5,98 (5,76 - 6,2)	14	Ecoscreen	nein	Anaev et al., 2003a
	Asthma	5,23 ± 0,21	22	R-Tube	Ar	Hunt et al., 2000
		6,05 (4,7 - 7,6)	74	EcoScreen	nein	MacGregor et al., 2005
		6,17 (6,01 - 6,33)	43	Ecoscreen	nein	Anaev et al., 2003a
		7,43 (7,35 - 7,52)	80	EcoScreen	Ar	Kostikas et al., 2002
	chron. Husten	6,95 ± 0,29	15	EcoScreen	nein	Niimi et al., 2004
		7,91 ± 0,3	15	EcoScreen	Ar	

Erläuterungen zu Tab. 8:

Angabe des pH-Wertes erfolgte als Mittelwert \pm Standardabweichung bzw. der Minima und Maxima

AW = Atemwege

CF = Cystische Fibrose

chron. = chronisch

COPD = Chronisch obstruktive

Lungenerkrankung

IPF = Idiopathische Lungenfibrose

2.3 Gewinnung von Atemkondensat

2.3.1 Sammelgeräte zur AKO-Gewinnung

Seit dem 19. Jahrhundert werden Versuche unternommen, Atemgase aufzufangen und einen Nachweis der enthaltenen flüchtigen Inhaltsstoffe vorzunehmen (Regnault und Reiset, 1876, Haldane und Priestley, 1905). Das Hauptproblem lag hier in einer schwierigen Handhabung des Probenmaterials.

Um die exhalierte Luft in ein geeigneteres Untersuchungsmedium zu überführen, werden in der Literatur zwei Methoden beschrieben. Neben der Absorptionmethode stellt hierbei das Ausfrieren des Exhalates das Grundprinzip der Atemkondensat-Gewinnung dar. Erste Versuche gehen bis ins Ende des 19. Jahrhundert zurück (Frerichs, 1883). Zurzeit sind für den human- und veterinärmedizinischen Gebrauch neben verschiedenen Eigenkonstruktionen zwei patentierte Geräte kommerziell erhältlich:

Ecoscreen® (Viasys Healthcare, Höchberg, Deutschland): Dieses 1998 als Patent angemeldete transportable Gerät zur Atemkondensat-Gewinnung besteht aus einer Kühleinheit und einer, an einem schwenkbaren Arm angebrachten Sammelvorrichtung. Über ein Nicht-Rückatmungsventil, findet ein gerichteter Atemfluss durch einen doppelwandigen, mehrfach gekammerten und gekühlten Teflon-Zylinder statt, an dessen Oberfläche (ca. 0 °C) die Flüssigkeit des Exhalates kondensiert und damit aufgefangen werden kann (Kap. 3.6).

Auch bei Kälbern und Schweinen wurde dieses Gerät, über eine Nasen- und Maulöffnung umspannende Maske, zur AKO-Gewinnung angewendet. Die Tiere akzeptieren diese Manipulation nach kurzer Eingewöhnungszeit gut (Kalb), z.T. ist aber eine Sedation erforderlich (Schwein) (Abb. 7).



Abb. 7: Anwendung der AKO-Gewinnung beim stehenden, unsedierten Kalb und fixierten, sedierten Schwein (Reinhold et al., 2006)

R-tube® (Respiratory Research, Charlottesville, USA): Dieses Polypropylen-Röhrchen wird im Unterschied zum EcoScreen nicht während der AKO-Gewinnung gekühlt. Vor der eigentlichen Probennahme des Kondensates ist daher eine Tiefkühl-Lagerung bei -20 °C erforderlich. Der exhalierte Atemstrom in das aufrecht gehaltene Röhrchen wird über eine Einengung in eine turbulente Strömung versetzt, um so einen engen Kontakt mit der Kondenserwand zu erreichen. Eine Speichelkontamination soll hier allein durch die Schwerkraft ausgeschlossen werden. Eine Lagerung oder Versendung der Probe innerhalb des R-Tube ist ebenfalls möglich. Eine Anwendung bei Tieren ist nicht beschrieben.

Eigenkonstruktionen zur Atemkondensat-Gewinnung beim Tier: Bei intubierten Hunden wurde von Pietra et al. (2003) Kondensat über einen Glaszylinder gewonnen, der spiralförmig mit eisgekühlter Luft umströmt wurde. Aber auch an wachen Hunden konnte unter Verwendung einer Atemmaske über ein gekühltes Stahlröhrchen Atemkondensat gewonnen werden (Hirt et al., 2003).

Untersuchungen zur Atemkondensat-Gewinnung an wachen Katzen wurden ebenfalls beschrieben. Mit Hilfe eines Bodyplethysmographen wurde das Exhalat in einem über Eiswasser gekühlten Stahlröhrchen kondensiert (Sparks et al., 2004, Kirschvink et al., 2004). Bei Pferden wurde auf Grund des höheren Expirationsvolumens im Vergleich zum Menschen ein modifiziertes humanmedizinisches Sammelgerät (AKO-Gewinnungs-Prototyp, FILT-Patentanmeldung 1995) verwendet. An sedierten und fixierten Tieren wurde über eine endotracheale Sonde (ohne Cuff) ein undefinierter Anteil des Exhalates über ein Nitrückatmungsventil in ein Sammelröhrchen (-20 °C) geleitet und aufgefangen (Schack, 2002). Deaton beschrieb die Atemkondensatgewinnung an wachen, unsedierten Pferden (Deaton et al., 2004a). Unter Verwendung einer Atemmaske wurde die Expirationsluft über ein auf 35 °C erwärmtes flexibles PVC-Rohr in ein nachgeschaltetes gekühltes Stahlröhrchen eingeleitet. Somit konnte eine vorzeitige Kondensation ausgeschlossen werden.

2.3.2 Standardisierung der AKO-Gewinnung

In der Literatur wird dem Bedarf an Standardisierungsmaßnahmen zu Gewinnungs- sowie Nachweisverfahren durch eine steigende Anzahl an veröffentlichten Artikeln und Vorträgen Rechnung getragen. Diese werden durch einen Bericht der ERS/ATS-Task Force („Exhaled breath condensate: Methodical recommendations and unresolved questions“) zusammengefasst dargestellt und mit Empfehlungen versehen (Horváth et al., 2005). Dabei liegt das grundsätzliche Hauptproblem im Fehlen eines Verdünnungsmarkers des Kondensates (Kap. 5.1), ohne den die Konzentrationsangabe der Inhaltsstoffe nicht zu beurteilen ist. Das AKO-Volumen selbst wird durch eine Vielzahl an sammlungs-methodischen, umgebungsbedingten, individuellen und ventilatorischen Faktoren beeinflusst. Deren Bedeutung für den Feuchtigkeitsgehalt der Dampfphase, die Aerosolentstehung, die Passage oder Sedimentation innerhalb der Atemwege und auch den Kondensationsprozess ist aber nicht abschließend geklärt. Die hier nachfolgend aufgeführten Punkte geben nur einen kurzen Überblick zu den in der Literatur diskutierten Fragestellungen.

Sammlungsmethodik: In der AKO-Diagnostik konnte die Abhängigkeit des insgesamt gewonnenen Volumens von dem Material, der Oberfläche, der Form und dem Temperaturgradienten des verwendeten Kondensers nachgewiesen werden (Winsel et al., 1999, Rothe, 2001, Gessner et al., 2001, Becher et al., 2003a). Auch die Bedeutung

eines Nasenclips (orale vs. nasale Inspiration) bei menschlichen Probanden wurde beschrieben (Vass et al., 2003a, Hunt, 2002).

Vergleichende Untersuchungen zur Verwendung einer Atemmaske bei Kälbern, Schweinen oder Pferden gegenüber der endotrachealen Probennahme (Pferd, Hund) oder der Ganzkörper-Plethysmographie (Katze) wurden bisher nicht durchgeführt.

Parallel zum Mediator-Nachweis wird aber stets eine α -Amylasebestimmung angeraten, auch wenn eine Speichelkontamination z.B. mittels EcoScreen oder R-Tube ausgeschlossen werden kann, soll die tatsächliche Ursache in einer zu geringen Nachweissensibilität liegen (Diegel et al., 1999, Hunt, 2002).

Umgebungsbedingungen: Untersuchungen am Menschen und Katzen wiesen einen Einfluss der Luftfeuchtigkeit und der Umgebungstemperatur auf das zu gewinnende Kondensatvolumen nach (Mutulu et al., 2001, Mc Cafferty et al., 2004, Kirschvink et al., 2004). Bei Pferden konnte dagegen in Bezug auf beide Parameter keine Abhängigkeit bestätigt werden (Schack, 2002).

Individuelle Einflussfaktoren: Eine signifikante Abhängigkeit des AKO-Volumens vom Alter adulter Pferde und der Körpertemperatur bei Kälbern konnte nicht nachgewiesen werden (Reinhold et al., 1999, Schack, 2002). Bei Kälbern konnte eine positive Korrelation zwischen dem AKO-Volumen und der Körpermasse gezeigt werden, die bei Menschen oder Pferden nicht bestand (Reinhold et al., 1999, Gessner et al., 2001, Schack, 2002). Daten zur individuellen Reproduzierbarkeit des AKO-Volumens wurden bisher nur bei Katzen beschrieben. Schwankung von bis zu 20 % konnten zwischen und innerhalb eines Versuchstages beobachtet werden (Kirschvink et al., 2005). Auch Untersuchungen bezüglich der Bedeutung der Körpertemperatur beim Menschen oder der Pneumonie bei Tieren auf das Kondensatvolumen fehlen bisher in der Literatur. Die Abhängigkeit der AKO-Gesamtprotein-, 8-Isoprostan-, Leukotrien B₄-, Nitrit-, Harnstoff-, Ammonium- und Protonen-Konzentration von der Fütterung und dem Alter klinisch gesunder Kälber wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben.

Ventilatorische Parameter: Der Einfluss des Atmungsmusters auf die Kondensatabgabe ist für Menschen und Tiere vielfach beschrieben. Die Abhängigkeit des AKO-Volumens vom expiratorischen Atemminuten- und Tidalvolumen, von der Atmungsstromstärke und der Atmungsfrequenz konnte bei Menschen und Tieren bestätigt werden (Reinhold et al., 1999, 2000, Schack 2002, Becher et al., 2003b, McCafferty et al., 2004, Reinhold et al., 2006). Die Durchführung von Atemmanövern ist bei Menschen und bedingt auch bei Tieren möglich. Eine Standardisierung beschränkt sich hier nur auf eine parallele Dokumentation der ventilatorischen Parameter. Bisher wurde der Einfluss der maximalen expiratorischen Atmungsstromstärke und des expiratorischen Atemzug- sowie Atemminutenvolumens auf die Gesamtprotein-Konzentration des AKO nachgewiesen (Reinhold et al., 2006). Die LTB₄-Konzentration erwies sich dagegen statistisch unabhängig von den expiratorischen Kenngrößen der Ventilation (Atemzugvolumen [l], Atmungsfrequenz [je min]) (Reinhold et al., 1999). Weitere Publikationen, die den Einfluss der expiratorischen Atmungsparameter: maximale Atmungsstromstärke [l/s], Atemzugvolumen [l], Atemzugvolumen je kg/KM [l/kg KM], Atemminutenvolumen [l], Atmungsfrequenz [je min] auf die verschiedenen Entzündungs-Mediatoren des AKO bei Kälbern untersuchen, existieren bislang nicht.