

Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie der Universität Rostock

Direktorin: Prof. Dr. med. Gabriele Nöldge-Schomburg

**Aldehyde in der Ausatemluft als
Marker für Lungenkarzinome**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Christian Loeseken, geb. am 16.09.1983 in Velbert

aus Güstrow

Güstrow, den 10.02.2012

urn:nbn:de:gbv:28-diss2013-0010-6

Gutachter:

Prof. Dr. med. Dipl. Chem. Jochen K. Schubert,
Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie
Universitätsmedizin Rostock

PD Dr. med. Peter Julius,
Facharzt für Innere Medizin, Pneumologie, Pneumo-Onkologie und Allergologie
Trelleborger Straße 10 a, 18107 Rostock

Prof. Dr. med. Anton Amann,
Universitätsklinik für Anästhesie und Intensivmedizin
Medizinische Universität Innsbruck

Die öffentliche Verteidigung fand am 20.11.2012 an der Universität Rostock statt.

Inhaltsverzeichnis

1. Grundlagen.....	5
1.1. Das Lungenkarzinom: Epidemiologie, Ätiologie und Stellenwert der Früherkennung.....	5
1.2. Atemgasanalytik als diagnostische Methode	6
1.3. Oxidativer Stress bei Tumorerkrankungen	8
1.4. Entstehung von Aldehyden bei oxidativem Stress.....	8
2. Aufgabenstellung.....	10
3. Material und Methoden.....	11
3.1. Studienteilnehmer.....	11
3.2. Probennahme	13
3.3. Analyse.....	16
3.3.1. Präkonzentration mittels SPME	16
3.3.2. Derivatisierung.....	17
3.3.3. Analyse mittels Gaschromatographie und Massenspektrometrie (GC/MS)	18
3.3.4. Quantifizierung.....	20
3.3.5. Statistik	21
4. Ergebnisse	22
4.1. LOD, LOQ und linearer Bereich.....	22
4.2. Übersicht über die Messergebnisse der Ausatemluft	23
4.3. Übersicht über die Messergebnisse der Umgebungsluft	25
4.4. Ergebnisse der statistischen Auswertung	26
4.4.1. Ergebnisse für Acetaldehyd, Propanal, Butanal, Heptanal und Decanal (keine signifikanten Unterschiede).....	26
4.4.2. Ergebnisse für Formaldehyd, Hexanal, Octanal, Nonanal und Pentanal (signifikante Unterschiede)	28
4.5. Vergleich der ermittelten Atemgas-Marker mit Serum-Tumormarkern	31
4.5.1. Hexanal.....	32
4.5.2. Octanal	33
4.5.3. Nonanal	34
4.5.4. Pentanal.....	35
4.6. Subgruppenanalyse.....	36
4.6.1. Geschlechtsspezifische Unterschiede	36
4.6.2. Histologie-spezifische Unterschiede	36
5. Diskussion	38
6. Zusammenfassung	43
7. Thesen	44
8. Literaturverzeichnis	45
9. Anhang	50
9.1. Selbstständigkeiterklärung	50
9.2. Originalpublikationen und Tagungsbeiträge	51
9.3. Danksagung	52
9.4. Lebenslauf.....	53

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zusammensetzung der Ausatemluft	6
Abbildung 2: Radikalvermittelte Lipidperoxidation und Reaktionsprodukte (nach Miekisch et al. [30]).....	9
Abbildung 3: Für die Studie verwendetes Hauptstromkapnometer mit kapnographischer Darstellung eines Atemzyklus.....	13
Abbildung 4: Kapnogramm eines Atemzyklus und Unterteilung in Phasen	14
Abbildung 5: System zur alveolaren Probennahme (modifiziert nach Miekisch et al. [34]).....	14
Abbildung 6: Schema eines Halters zur manuellen Injektion einer SPME-Faser	16
Abbildung 7: Reaktionsschema der On-Fibre-Derivatisierung von Aldehyden	17
Abbildung 8: Schema der On-Fibre-Derivatisierung an der ausgefahrenen SPME-Faser..... (Modifiziert nach Sigma Aldrich [35])	17
Abbildung 9: Chromatogramm einer Atemgasprobe nach On-Fibre Derivatisierung (Massenspur m/z 181).....	19
Abbildung 10: Verdünnungsschritte zur Herstellung der Proben für die Kalibrierung aus dem gasförmigen Standard	20
Abbildung 11: Ausschnitt aus der Kalibrierkurve für Pentanal	21
Abbildung 12: Vergleich der Differenzen aus Exspirations- und Inspirationskonzentrationen von Acetaldehyd.....	26
Abbildung 13: Vergleich der Differenzen aus Exspirations- und Inspirationskonzentrationen von Propanal	26
Abbildung 14: Vergleich der Differenzen aus Exspirations- und Inspirationskonzentrationen von Butanal	27
Abbildung 15: Vergleich der Differenzen aus Exspirations- und Inspirationskonzentrationen von Heptanal	27
Abbildung 16: Vergleich der Differenzen aus Exspirations- und Inspirationskonzentrationen von Decanal	27
Abbildung 17: Vergleich der Differenzen aus Exspirations- und Inspirationskonzentrationen von Formaldehyd.....	28
Abbildung 18: Vergleich der Umgebungskonzentrationen von Formaldehyd	28
Abbildung 19: Vergleich der Differenzen aus Exspirations- und Inspirationskonzentrationen von Hexanal	29
Abbildung 20: Vergleich der Differenzen aus Exspirations- und Inspirationskonzentrationen von Octanal	29
Abbildung 21: Vergleich der Differenzen aus Exspirations- und Inspirationskonzentrationen von Nonanal	30
Abbildung 22: Vergleich der Differenzen aus Exspirations- und Inspirationskonzentrationen von Pentanal	30
Abbildung 23: Vergleich von Hexanal im Atemgas und den Serummarkern CEA, NSE & Cyfra 21-1 hinsichtlich Sensitivität und Spezifität	32
Abbildung 24: Vergleich von Octanal im Atemgas und den Serummarkern CEA, NSE & Cyfra 21-1 hinsichtlich Sensitivität und Spezifität	33
Abbildung 25: Vergleich von Nonanal im Atemgas und den Serummarkern CEA, NSE & Cyfra 21-1 hinsichtlich Sensitivität und Spezifität	34
Abbildung 26: Vergleich von Pentanal im Atemgas und den Serummarkern CEA, NSE & Cyfra 21-1 hinsichtlich Sensitivität und Spezifität	35
Abbildung 27: Vergleich der Lungenkrebspatienten mit NSCLC und SCLC hinsichtlich der Differenzen aus Exspirations- und Inspirationskonzentrationen von Hexanal	37

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Ausgewählte Kenndaten der Studienteilnehmer	12
Tabelle 2:	Ausgangsparameter des GC/MS	18
Tabelle 3:	Retentionszeiten und typische Fragmente der einzelnen Oxime	19
Tabelle 4:	Übersicht über die LOD, LOQ und die quadrierten Korrelationskoeffizienten der SPME–OFD–Methode.....	22
Tabelle 5:	Übersicht über die Exspirationskonzentrationen der Aldehyde im Atemgas	23
Tabelle 6:	Übersicht über die Differenzen aus den Exspirations- und Inspirationskonzentrationen der Aldehyde	24
Tabelle 7:	Übersicht über die Aldehyd-Konzentrationen in der Umgebungsluft	25
Tabelle 8:	Vergleich von Pentanal, Hexanal, Octanal, Nonanal und den Serummarkern NSE, CEA & Cyfra 21-1 hinsichtlich ausgewählter statistischer Gütekriterien.....	31
Tabelle 9:	Vergleich der Differenzen aus Exspirations- und Inspirationskonzentration von männlichen und weiblichen Probanden.....	36
Tabelle 10:	Vergleich der Differenzen aus Exspirations- und Inspirationskonzentration von Lungenkrebspatienten mit NSCLC und SCLC	37

Abkürzungsverzeichnis

C1–C10 Aldehyde	Aliphatische Aldehyde von Formaldehyd bis Decanal
CEA	Karzinoembryonales Antigen [Carcino-Embryonic Antigen]
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cyfra 21-1	Cytokeratinfragment 21–1 [Cytokeratine Fragment 21-1]
DNS [DNA]	Desoxyribonukleinsäure [Desoxyribonucleic Acid]
GC/MS	Gaschromatographie/Massenspektrometrie
LOD/LOQ	Nachweisgrenze/Bestimmungsgrenze [Limit of Detection/Limit of Quantification]
(N)SCLC	(Nicht-)Kleinzeliges Lungenkarzinom [(Non) Small Cell Lung Cancer]
NSE	Neuronen-Spezifische Enolase [Neuron-Specific Enolase]
OFD	Derivatisierung auf einer SPME-Faser [On-Fibre-Derivatization]
PDMS/DVB	Poly-Dimethylsiloxan/Divinylbenzol
PFBHA	Pentafluorobenzylhydroxylamin
PMN	Polymorphkernige Neutrophile Granulozyten
ppmV	Volumenteile pro Millionen [Parts per Million]
ppbV	Volumenteile pro Milliarde [Parts per Billion]
pptV	Volumenteile pro Billionen [Parts per Trillion]
PUFA	Mehrzahl ungesättigte Fettsäuren [Poly Unsaturated Fatty Acid]
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies [Reactive Oxygen Species]
SIM	Erfassung einzelner Massenspuren [Selected-Ion-Monitoring]
SPME	Festphasenmikroextraktion [Solid Phase Micro Extraction]
TNM	Stadien-Einteilung bei Malignomen: Tumor, Lymphknotenmetastasen, Fernmetastasen
VOC	Flüchtige organische Verbindungen [Volatile Organic Compounds]

1. Grundlagen

1.1. Das Lungenkarzinom: Epidemiologie, Ätiologie und Stellenwert der Früherkennung

In Deutschland erkranken 32 500 Männer und 14 600 Frauen jährlich an Lungenkrebs [1]. Aufgrund mangelnder Möglichkeiten der Früherkennung erfolgt die Diagnosestellung zumeist erst beim Auftreten von Spätsymptomen wie chronischem Husten, Hämoptysen, progredienter Dyspnoe oder anhand von metastasenbedingten Symptomen.

Das 5-Jahres-Überleben ist in erster Linie abhängig vom Stadium der Erkrankung und kann bei lokal begrenztem Befall 40,9 % bei Männern und 51,8 % bei Frauen betragen. Jedoch geht schon die Infiltration von umgebenden Weichteilen und damit der Übergang zur regional begrenzten Erkrankung mit einer erheblichen Abnahme des 5-Jahres-Überlebens einher. So beträgt sie in diesem Fall bei Männern 13,2 % und 16,2 % bei Frauen. Beim Auftreten von Metastasen ist die Prognose infaust, entsprechend beträgt das 5-Jahres-Überleben 1,1 % bei den Männern und 2,5 % bei den Frauen [2]. Die Prognose ist darüber hinaus abhängig vom histologischen Typ des Tumors. In der klinischen Praxis erfolgt die Unterscheidung von kleinzelligen Lungenkarzinomen mit schlechterer Prognose (SCLC) und Nicht-Kleinzelligen Lungenkarzinomen (NSCLC). Die kleinzelligen Lungenkarzinome haben ungefähr einen Anteil von einem Viertel an den Lungentumoren, bei Diagnosestellung liegt hier bei ungefähr 80 % der Patienten bereits eine Fernmetastasierung vor.

Hauptrisikofaktor für die Entwicklung eines Lungenkarzinoms ist das Tabakrauchen. 90 % der Erkrankungen bei den Männern und 60 % bei den Frauen sind auf den aktiven Konsum von Tabakprodukten zurück zu führen [1]. Das Risiko ist hierbei abhängig von der Anzahl der täglich konsumierten Zigaretten und der Gesamtdauer des Nikotinkonsums, zusammengefasst unter der Bezeichnung einer Anzahl von Packyears. Untergeordnete Risikofaktoren sind die natürliche Radon-Belastung sowie Asbest- oder Quarzstaub-Exposition.

Nach einer gemeinsamen Publikation der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister e. V. (GEKID) und des Robert-Koch-Instituts (RKI) aus dem Jahr 2010 [1] stellt Lungenkrebs bei beiden Geschlechtern die dritthäufigste Entität bei den Krebsneuerkrankungen dar. Bei Männern ist das Lungenkarzinom die am häufigsten zum Tode führende Krebserkrankung.

Diese epidemiologischen Kennziffern erlauben die Annahme, dass eine Methode zur Früherkennung von Lungentumoren einen großen Vorteil für die Betroffenen bieten würde. Ein optimaler, zum Screening geeigneter Test ist hierbei gekennzeichnet durch

- Hohe Sensitivität bei hoher Spezifität
- Nicht-invasives, einfaches Verfahren der Probennahme mit hoher Reproduzierbarkeit
- Keine Belastung des Probanden durch ionisierende Strahlung
- Einfache, kostengünstige, schnelle und standardisierte Analyse der Proben.

Eine Analyse der Atemluft stellt aufgrund der geringen Belastung des Probanden durch den Test einen viel versprechenden Ansatz dar.

1.2. Atemgasanalytik als diagnostische Methode

Schon seit Hippokrates gibt es Bemühungen, durch die Analyse der Ausatemluft eines Menschen Rückschlüsse auf pathologische Prozesse zu führen. In den Anfängen bediente man sich vornehmlich der Interpretation des Atemgeruches. So sind Krankheitsbilder wie ein entgleister Diabetes, Leberversagen und Urämie durch typische Geruchsmuster gekennzeichnet.

Heute ist man dank erheblicher Fortschritte in der analytischen Chemie in der Lage, selbst Substanzen in extrem geringer Konzentration in einem Gasgemisch nachzuweisen und somit Korrelationen dieser in der Ausatemluft enthaltenen Substanzen zu pathologischen und physiologischen Prozessen zu ermitteln.

Die menschliche Ausatemluft besteht zum größten Teil aus Stickstoff, gefolgt von Sauerstoff, Kohlenstoffdioxid und Wasser. Es folgen mit einem Anteil von circa 0,9 % Argon und weitere Edelgase mit geringen Konzentrationen im ppmV-Bereich (Abbildung 1).

Der geringe Volumenanteil, der als Rest verbleibt, setzt sich zusammen aus Kohlenstoffmonoxid, Stickstoffmonoxid und den so genannten Volatilen Organischen Komponenten (VOC).

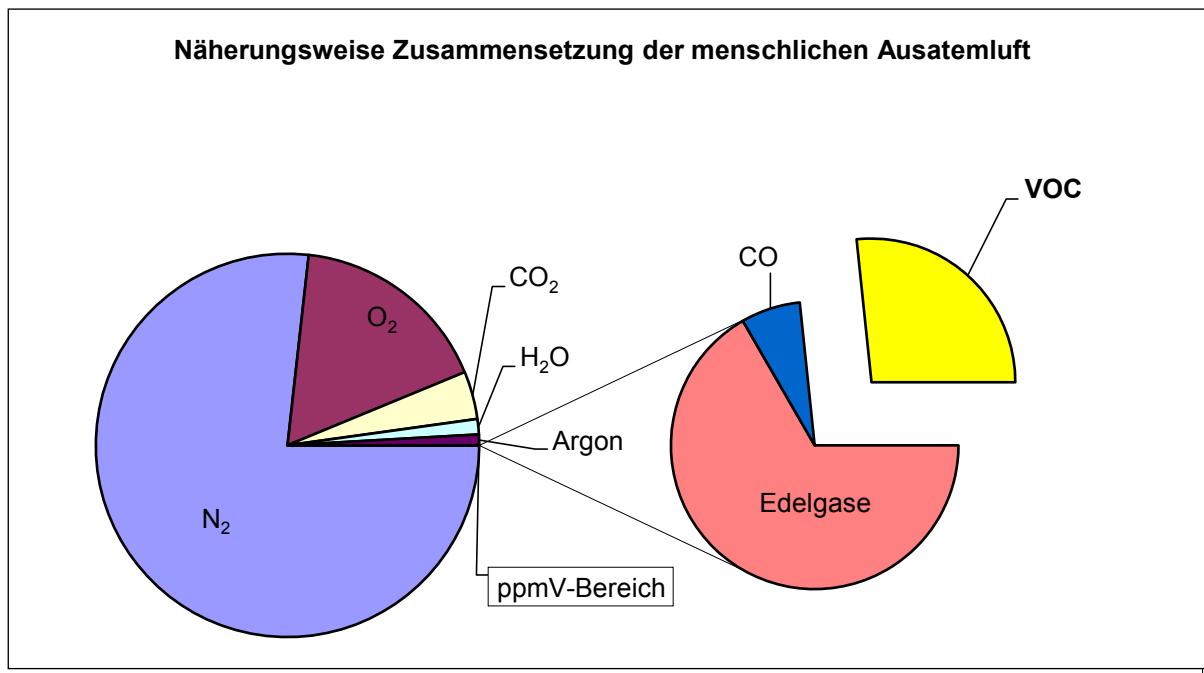


Abbildung 1: Zusammensetzung der Ausatemluft

Die VOC liegen in der Ausatemluft in sehr geringer Konzentration von 10^{-9} bis 10^{-12} mol/l (ppbV- bis pptV-Bereich) vor und weisen eine sehr hohe chemische Heterogenität auf. Die bisher detektierten über 500 verschiedenen VOC umfassen unter anderem gesättigte und ungesättigte Kohlenwasserstoffe (Alkane, Alkene), oxygenierte Kohlenwasserstoffe (Alkohole, Aldehyde), schwefel- und stickstoffhaltige Verbindungen und aromatische Verbindungen. VOC können sowohl endogenen Ursprungs sein als auch als Kontaminationen aus der Umgebungsluft aufgenommen werden.

Aus Untersuchungen von VOC im Atemgas verschiedener Patientengruppen geht hervor, dass einige dieser Substanzen bei verschiedenen Krankheitszuständen Konzentrationsänderungen zeigen.

- Alkane wie Ethan und Pentan stehen mit der Lipidperoxidation in Verbindung [3-6], Isopren steht im Zusammenhang mit dem Cholesterin-Metabolismus [7]
- Ketonkörper im Atem sind zum Beispiel bei diabetogener Hyperglykämie nachweisbar [8, 9]
- Schwefelhaltige VOC werden mit Lebererkrankungen in Zusammenhang gebracht [10, 11]
- Stickstoffhaltige Komponenten im Atemgas kommen in erhöhten Konzentrationen bei Nierenerkrankungen vor [12, 13].

In verschiedenen Studien wurde versucht, einen entsprechenden Zusammenhang auch zwischen bösartigen Tumoren und VOC herzustellen [14-23].

Für einen Einsatz zur Erkennung von Tumoren bietet die Atemgasanalytik Vorteile, da

- die erforderlichen Proben komplett nicht-invasiv gewonnen werden können und daher untersuchungsbedingte Komplikationen auf ein Minimum reduziert werden können,
- die Probennahme für den Patienten praktisch keine Belastung darstellt und daher beliebig oft wiederholt werden kann.

Somit bestehen gute Voraussetzungen für eine engmaschige Verlaufsbeobachtung und ein hohes Maß an Akzeptanz durch die Patienten. Wichtige Voraussetzungen für einen solchen diagnostischen Test sind die Eingrenzung potentieller Biomarker und deren biochemischer Entstehungswege sowie der zuverlässige quantitative Nachweis potentieller Markerverbindungen. Ein möglicher Entstehungsweg für volatile Krebsmarker stellen die Radikal-vermittelten oxidativen Schädigungen von Zellstrukturen bei erhöhtem oxidativen Stress dar.

1.3. Oxidativer Stress bei Tumorerkrankungen

Oxidativer Stress ist definiert als ein Ungleichgewicht von oxidativ wirksamen Verbindungen und den Antioxidantien beziehungsweise den antioxidativen Enzymen.

Oxidativ wirksame Verbindungen, wie z.B. das Superoxid-Radikal oder das Hydroxyl-Radikal, werden auch als reaktive oxidative Spezies (ROS) bezeichnet. Wichtige antioxidativ wirksame Verbindungen sind Gluthation, Transferrin, Albumin und Haptoglobin. Beispiele für die antioxidativen Enzyme sind die Superoxid-Dismutase, die Katalase oder die Glutathion-Peroxidase.

Es gibt in der Literatur zahlreiche Belege, dass es in Tumorgewebe zu einem erhöhten Niveau von oxidativem Stress kommt. So wiesen Szatrowski und Nathan [24] in ihrer Studie in Krebszelllinien verschiedener histologischer Herkunft eine vergleichbar hohe Produktion von Hydrogenperoxid (H_2O_2) nach, wie sie beim oxidativen Burst aktiverter polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten (PMN) entsteht.

Toyokuni et al. [25] zeigten in ihrer Arbeit erhöhte Konzentrationen von 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosin, einem der Hauptprodukte der Modifikation von DNA durch ROS, in humanen Tumorzelllinien der Niere, Brust, Leber und Lunge im Vergleich zu humanen Kontrollzelllinien. In zahlreichen weiteren Studien wurde nachgewiesen, dass es in Tumorgewebe verschiedener Herkunft (unter anderem primäres Nierenzellkarzinom, Duktales Mammakarzinom, Kolorektales Adenokarzinom) vermehrt zu oxidativen Modifikationen von DNA, Proteinen und Lipiden kommt [25-28]. Die Ursache für die erhöhte Belastung von Tumorzellen mit ROS ist noch nicht abschließend geklärt. Diskutiert wird eine Kombination aus Unterdrückung der oben erwähnten antioxidativen Enzyme sowie eine vermehrte Produktion von ROS durch Flavoproteine und Nukleosid-Oxidasen der durch einen besonders aktiven Metabolismus und Dysregulation der Proliferation gekennzeichneten Tumorzellen [29].

Der erhöhte oxidative Stress führt zu einer Alteration zahlreicher Zellstrukturen, unter anderem auch der Bestandteile von Biomembranen.

1.4. Entstehung von Aldehyden bei oxidativem Stress

Die ROS führen zur Peroxidation von ungesättigten Fettsäuren der Biomembranen, vornehmlich Arachidonalsäure (20:4), Linolsäure (18:2) und Docosahexaensäure (22:6). Die oxidative Schädigung dieser Fettsäuren zieht deren Zusammenbruch nach sich.

Als Produkt des Zusammenbruchs entstehen chemisch heterogene Verbindungen. Unter anderem ist dieser Weg für die Entstehung von Pentan beschrieben, aber auch für Aldehyde (Abbildung 2).

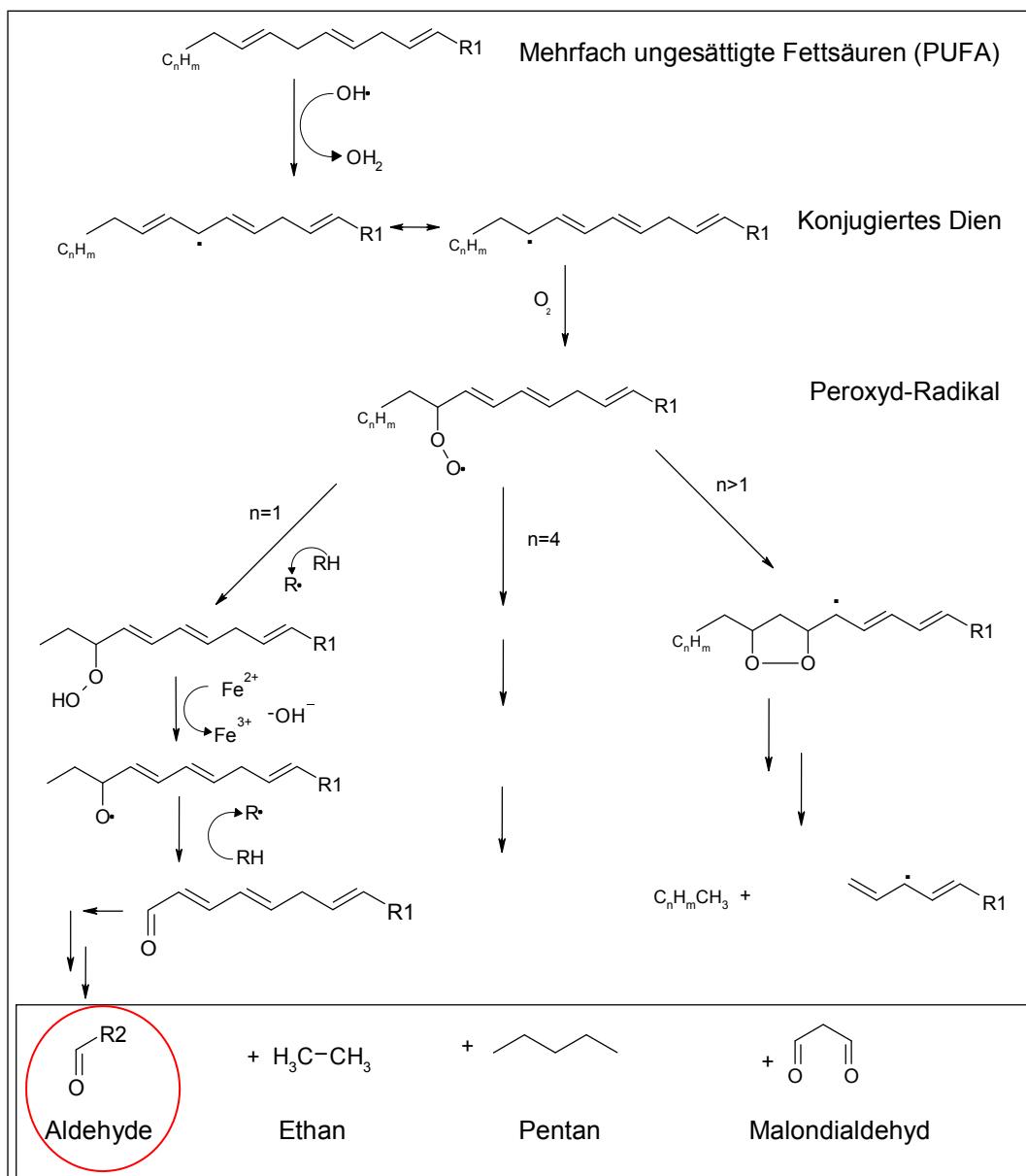


Abbildung 2: Radikalvermittelte Lipidperoxidation und Reaktionsprodukte (nach Miekisch et al. [30])

Im Gegensatz zu den relativ inerten Kohlenwasserstoffen weisen Aldehyde aufgrund ihrer Carbonyl-Gruppe eine hohe Reaktivität auf. Die Detektion dieser Verbindungen mittels analytischer Methoden, insbesondere in sehr geringen Konzentrationsbereichen, ist daher schwierig. Trotzdem erscheint die Untersuchung von Lungenkrebspatienten auf exhalierte Aldehyde aussichtsreich, da in verschiedenen Arbeiten ein Zusammenhang von erhöhten Aldehyd-Konzentrationen in unterschiedlichen Medien und Krebserkrankungen festgestellt wurde [14, 23, 31, 32].

2. Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit war es zu klären, ob volatile Aldehyde im Atemgas als Parameter zur Unterscheidung zwischen gesunden Menschen und an Lungenkrebs erkrankten Personen verwendet werden können.

Im Detail galt es folgende Aufgabenstellungen zu bearbeiten:

1. Können Aldehyde im Atemgas im Ultraspurenbereich reproduzierbar nachgewiesen werden?
2. Gibt es signifikante Unterschiede zwischen exhalierten Aldehyd-Konzentrationen bei gesunden Nicht-Rauchern, Rauchern und an Lungenkrebs Erkrankten?
3. Mit welcher Spezifität und Sensitivität ermöglichen die Serummarker NSE, CEA und Cyfra 21-1 die Erkennung von Patienten mit Lungenkarzinomen und sind Aldehyde im Atemgas in dieser Hinsicht vergleichbar?

3. Material und Methoden

3.1. Studienteilnehmer

Die durchgeführte Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Rostock genehmigt. Von allen teilnehmenden Probanden wurde nach entsprechender Aufklärung das schriftliche Einverständnis eingeholt.

Generelles Ausschlusskriterium war ein Tabakkonsum weniger als zwei Stunden vor der Probennahme.

In die Gruppe der gesunden Kontrollpatienten wurden 12 Probanden aufgenommen (7 männlich, 5 weiblich). Gruppenspezifische Ausschlusskriterien waren schwerwiegende chronische und akute Erkrankungen sowie Tabakkonsum von über einem Packyear.

Die Gruppe der gesunden Raucher setzte sich aus 12 Patienten zusammen (3 männlich, 9 weiblich). Einschlusskriterium war ein Nikotinkonsum von mindestens 8 Packyears, gruppenspezifisches Ausschlusskriterium war das Vorliegen von schwerwiegenden akuten oder chronischen Erkrankungen.

Die Gruppe der Lungenkrebspatienten bestand aus 12 Probanden (11 männlich, 1 weiblich). Einschlusskriterium war hier die histologisch bestätigte Erkrankung an einem Lungenkarzinom. Gruppenspezifisches Ausschlusskriterium war eine respiratorische Insuffizienz. Alle Patienten dieser Gruppe waren ehemalige Raucher mit 20-60 Packyears und wiesen ein Tumorstadium von mindestens T3 nach TNM-Klassifikation auf.

Tabelle 1 zeigt einen Überblick über ausgewählte Kenndaten der Probanden.

Bei jedem Probanden erfolgte die Dokumentation sämtlicher relevanter Befunde einschließlich des histologischen Befundes. In einer Befragung wurden vor Probennahme folgende Daten erfasst:

- Alter, Geschlecht, Körpergröße und Körbergewicht
- Lungenerkrankungen und weitere Diagnosen
- Rauch-Verhalten
- Medikamenteneinnahme
- Arbeits-Anamnese
- Letzter Genuss von Heißgetränken (Tee, Kaffee, Kakao), Alkohol, Kaugummi, Tabak sowie der Zeitpunkt des letzten Zähneputzens.

Vor und nach der Probennahme erfolgte die Dokumentation von Blutdruck, Puls, Zeit, Atemfrequenz und Kohlendioxid-Partialdruck in der Ausatemluft.

Tabelle 1: Ausgewählte Kenndaten der Studienteilnehmer

Nº	Alter in Jahren	Geschlecht	Raucher-Status/ seit x Jahren	Packyear	Diagnose	Gruppe
1	24	m	Nichtraucher	0	Gesunder Freiwilliger	Kontrolle
2	23	m	Nichtraucher	0	Gesunder Freiwilliger	Kontrolle
3	42	f	Nichtraucher	0	Gesunder Freiwilliger	Kontrolle
4	24	m	Nichtraucher	0	Gesunder Freiwilliger	Kontrolle
5	24	m	Nichtraucher	0	Gesunder Freiwilliger	Kontrolle
6	23	m	Nichtraucher	0	Gesunder Freiwilliger	Kontrolle
7	22	f	Nichtraucher	0	Gesunder Freiwilliger	Kontrolle
8	23	f	Nichtraucher	0	Gesunder Freiwilliger	Kontrolle
9	23	f	Nichtraucher	0	Gesunder Freiwilliger	Kontrolle
10	23	f	Nichtraucher	0	Gesunder Freiwilliger	Kontrolle
11	23	m	Nichtraucher	0	Gesunder Freiwilliger	Kontrolle
12	39	m	Nichtraucher	0	Gesunder Freiwilliger	Kontrolle
13	81	m	Ex Raucher/0,5	20	NSCLC	Lungenkrebs
14	73	m	Ex Raucher/1	20	NSCLC	Lungenkrebs
15	69	m	Ex Raucher/3	51	NSCLC	Lungenkrebs
16	71	m	Ex Raucher/16	30	NSCLC	Lungenkrebs
17	73	m	Ex Raucher/31	50	NSCLC	Lungenkrebs
18	67	f	Ex Raucher/19	20	NSCLC	Lungenkrebs
19	75	m	Ex Raucher/0,25	23	NSCLC	Lungenkrebs
20	51	m	Ex Raucher/0,5	30	NSCLC	Lungenkrebs
21	75	m	Ex Raucher/0,5	30	SCLC	Lungenkrebs
22	56	m	Ex Raucher/1	60	SCLC	Lungenkrebs
23	71	m	Ex Raucher/1	24	SCLC	Lungenkrebs
24	55	m	Ex Raucher/10	19	SCLC	Lungenkrebs
25	49	m	Raucher/32	16	Raucher*	Raucher
26	26	f	Raucher/12	8	Raucher*	Raucher
27	48	f	Raucher/29	8	Raucher*	Raucher
28	42	f	Raucher/21	12	Raucher*	Raucher
29	55	f	Raucher/26	13	Raucher*	Raucher
30	37	f	Raucher/19	19	Raucher*	Raucher
31	42	f	Raucher/20	10	Raucher*	Raucher
32	56	m	Raucher/39	39	Raucher*	Raucher
33	49	f	Raucher/24	18	Raucher*	Raucher
34	49	f	Raucher/37	9	Raucher*	Raucher
35	44	m	Raucher/28	49	Raucher*	Raucher
36	43	f	Raucher/12	9	Raucher*	Raucher

1 Packyear \triangleq 20 Zigaretten pro Tag/JahrNSCLC \triangleq Non Small Cell Lung CancerSCLC \triangleq Small Cell Lung Cancer* \triangleq Raucher ohne bösartige Grunderkrankung

3.2. Probennahme

Nach Miekisch et al. [33] sind die Konzentrationen von aus dem Blut stammenden VOC, die über die Lunge abgeatmet werden, in der alveolaren Atemluft um das 2-3 fache höher als in der aus Mischung von Alveolarluft und Totraumvolumen hervorgehenden gemischtexspiratorischen Atemluft. Daher wurde die Probennahme gezielt in der alveolaren Phase der Atmung durchgeführt. Zur Bestimmung der alveolaren Phase wurde ein Hauptstromkapnometer (Capnogard, Novametrix, USA) zur Messung des exspiratorischen CO₂-Partialdrucks verwendet (Abbildung 3).

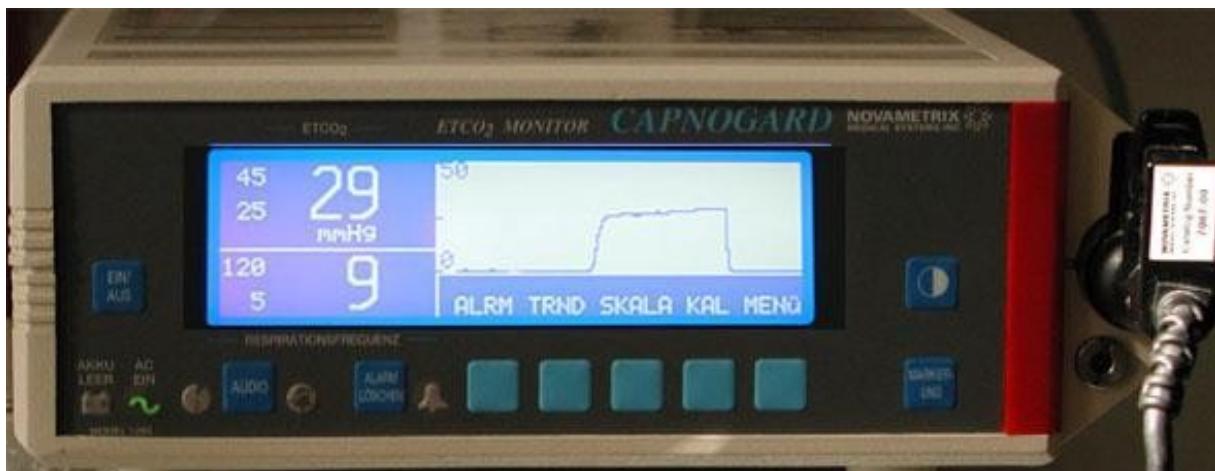


Abbildung 3: Für die Studie verwendetes Hauptstromkapnometer mit kapnographischer Darstellung eines Atemzyklus

Abbildung 4 stellt den typischen zeitlichen Verlauf der CO₂-Konzentration während eines Atemzyklus dar. Der Atemzyklus ist in vier Phasen unterteilt:

1. Phase: Endinspiratorische Phase. Die CO₂-Konzentration entspricht der der Umgebungsluft mit circa 0,04%. Am Ende der ersten Phase erfolgt der Umschlag in die Exspirationsphase.
2. Frühexspiratorische Phase. Durch das Abnahmesystem strömt in dieser Phase die Luft entsprechend der Anatomie der Luftwege (zunächst Luft aus Oropharynx, dann aus Larynx, Trachea, Bronchien, Bronchiolen). Die zunehmende Vermischung mit CO₂-haltigem Gas der am Gasaustausch teilnehmenden Lungenabschnitte spiegelt sich in der ansteigenden CO₂-Meßkurve wieder.
3. Plateau-Phase. Die hier durch das Abnahmesystem strömende Luft entstammt nahezu vollständig den am Gasaustausch teilnehmenden Lungenabschnitten. Der am Ende der dritten Phase gemessene Wert des CO₂-Partialdrucks entspricht näherungsweise dem kapillären CO₂-Partialdruck im Blut.
4. Übergang in die Inspiration, entsprechend starker Abfall der CO₂-Kurve im Kapnogramm.

Die Probennahme selbst erfolgte in Phase III, um selektiv Atemluft der alveolaren Phase der Atmung für die Analyse zu gewinnen.

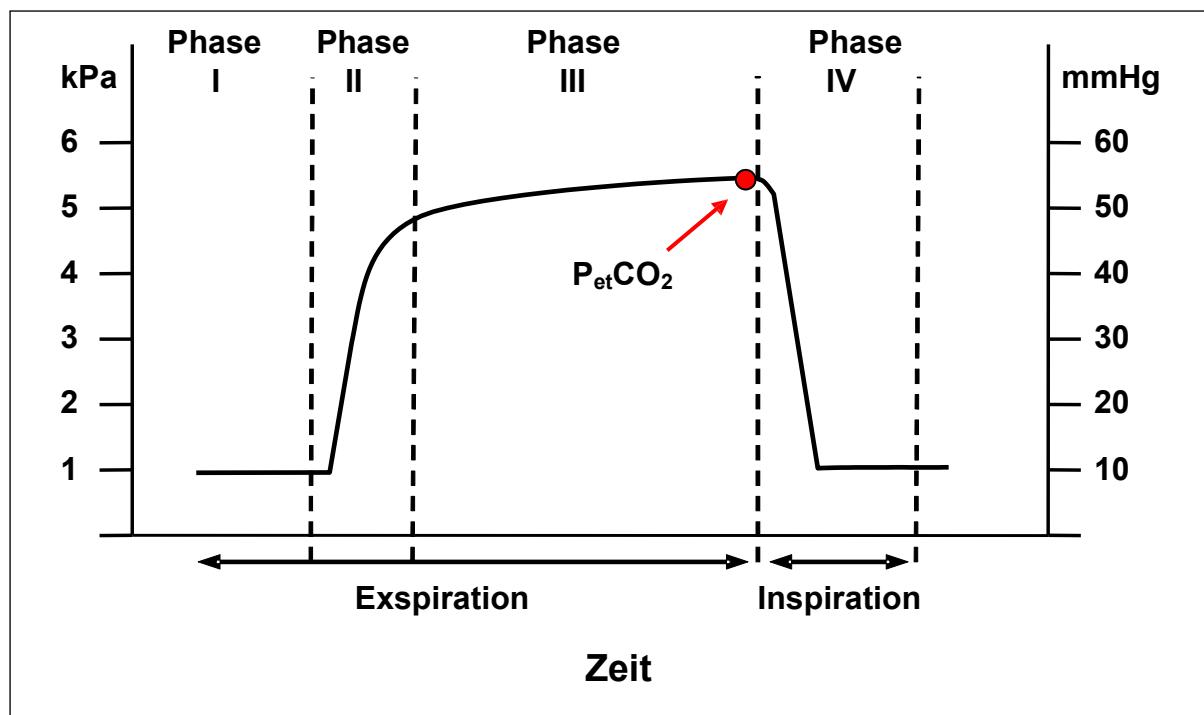


Abbildung 4: Kapnogramm eines Atemzyklus und Unterteilung in Phasen

Zur Probennahme wurde ein aus Polyethylen bestehendes Probennahmesystem (Abbildung 5) benutzt. Sämtliche Bestandteile des Systems wurden vor jedem Gebrauch desinfiziert.

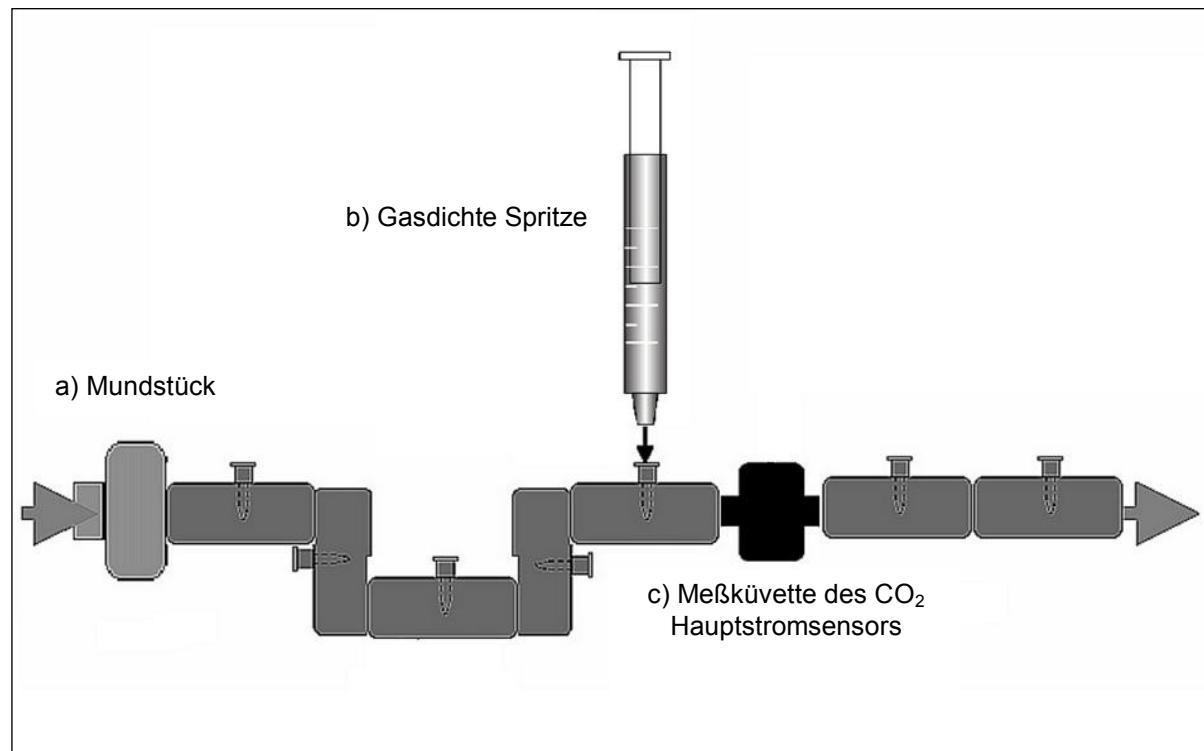


Abbildung 5: System zur alveolaren Probennahme (modifiziert nach Miekisch et al. [34])

Vor der Probennahme wurde eine mehrminütige Lüftung des Zimmers durchgeführt um eventuelle Kontaminationen der Umgebungsluft zu vermeiden. Nach Aufklärung des Patienten und Einholung einer schriftlichen Einverständniserklärung erfolgte die Erhebung einer spezifischen Anamnese. Dann wurde der Proband gebeten, über das Mundstück (a in Abbildung 5) unter Beibehaltung der normalen Atemfrequenz in das Probennahmesystem zu atmen. Die Atemphasen wurden kontinuierlich über eine in das Probennahmesystem installierte Meßküvette (c in Abbildung 5) mittels Hauptstrom -Kapnometer bestimmt. Die Probennahme erfolgte in der endexspiratorischen Phase. Zur Probennahme wurde eine silanisierte Glasspritze mit 10 ml Volumen genutzt (b in Abbildung 5). Die Atemgasproben wurden aus der Glasspritze mit Luer-Lock-Anschluss mittels steriler Einmal-Kanülen in silanierte 20 ml Glasgefäße überführt. Die Probengefäße waren im Vorfeld der Probennahme dreifach mit Stickstoff gespült, mit in Blechkappen eingefassten 1,3 mm starken Gummi-Teflon-Septen gasdicht verschlossen und mittels Vakuumpumpe evakuiert worden.

Abschließend erfolgte die Probennahme der Umgebungsluft (Inspirationsproben) sowie eine Blutentnahme zur serologischen Bestimmung der Tumormarker CEA, CYF 21.1 und NSE.

3.3. Analyse

Für die Anreicherung der reaktiven Aldehyde im Ultraspurenbereich wurde ein Präkonzentrationsverfahren mit Festphasenmikroextraktion und Derivatisierung (SPME-OFD) genutzt. Die Analyse der Derivate erfolgte nach thermischer Desorption mittels Gaschromatographie und Massenspektrometrie (GC/MS).

3.3.1. Präkonzentration mittels SPME

Aufgrund der polaren Eigenschaften der Aldehyde wurde eine polare 65 μ m Poly-Dimethylsiloxan/Divinylbenzol-Faser (PDMS/DVB) zur SPME-OFD-Analyse gewählt. Die Faser wurde in einen Halter für manuelle Injektionen installiert (Abbildung 6).

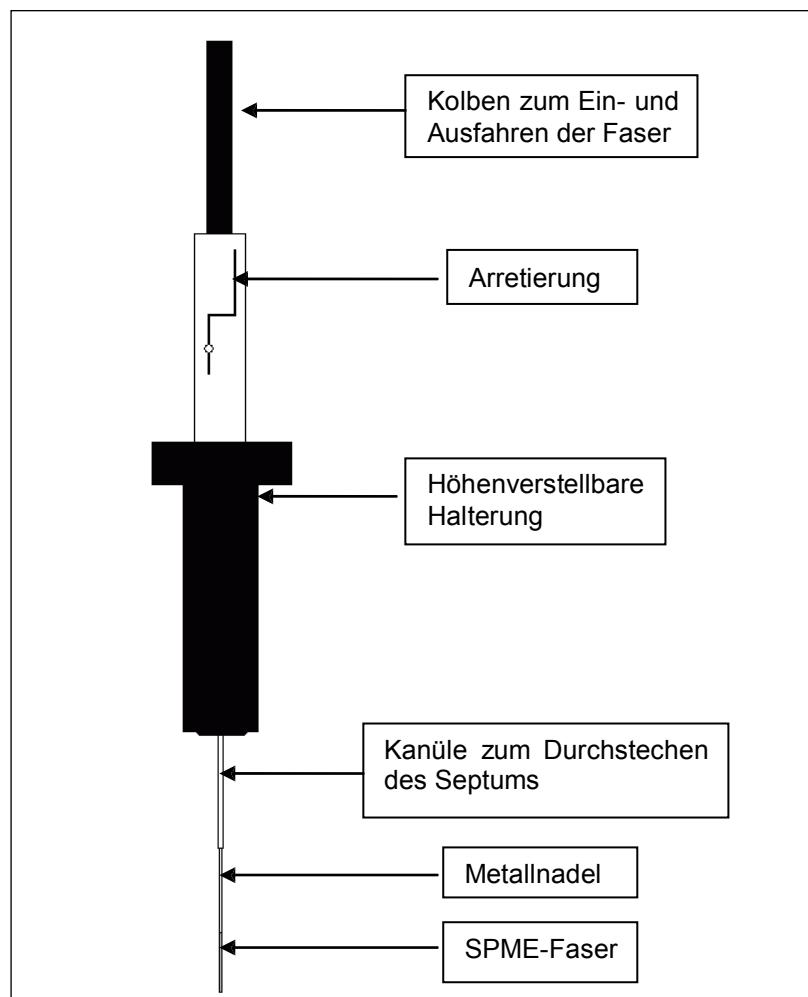


Abbildung 6: Schema eines Halters zur manuellen Injektion einer SPME-Faser

3.3.2. Derivatisierung

Aldehyde sind labile chemische Verbindungen und weisen eine hohe Flüchtigkeit und Reaktivität auf. Zur Erhöhung der Stabilität und zur besseren Detektierbarkeit der Aldehyde durch die GC/MS erfolgte eine On-Fibre Derivatisierung (OFD) mit Pentafluorobenzylhydroxylamin (PFBHA). Dazu wurde die SPME-Faser bei 40 °C über 10 Minuten dem Gasraum des trockenen Derivatisierungsreagenzes ausgesetzt. Die so konditionierte Faser wurde in die Probe eingebracht und dort bei 60 °C über 8 Minuten belassen. Durch Reaktion der Aldehyde aus der Atemluft mit dem Derivatisierungsreagenz entstehen cis- und trans- Isomere der korrespondierenden Oxime (Abbildung 7). Eine Ausnahme bildet Formaldehyd, da diese Substanz aufgrund ihrer Konfiguration (keine Seitenkette) keine cis-trans-Stereoisomere bilden kann.

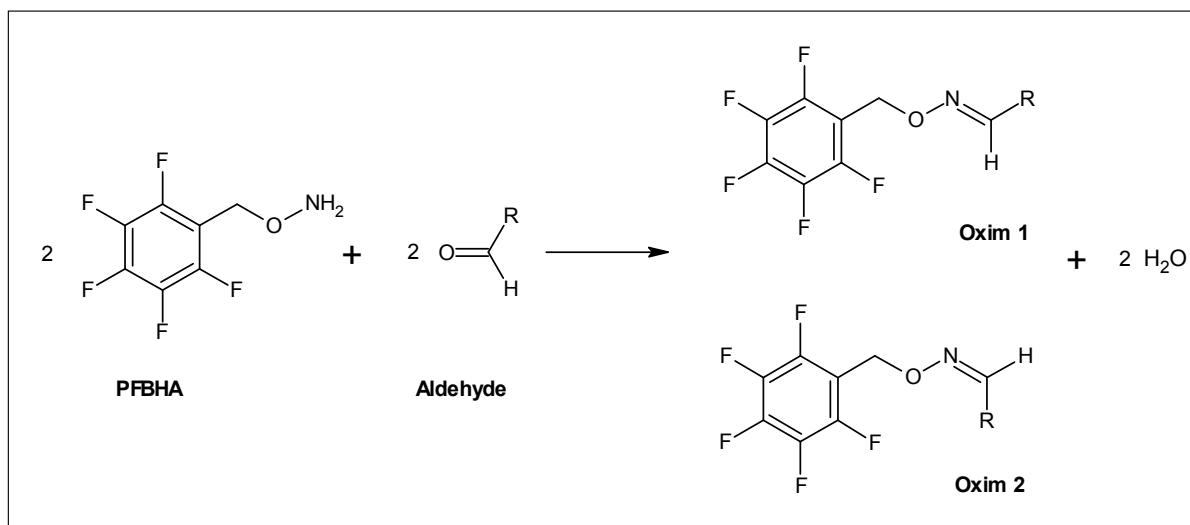
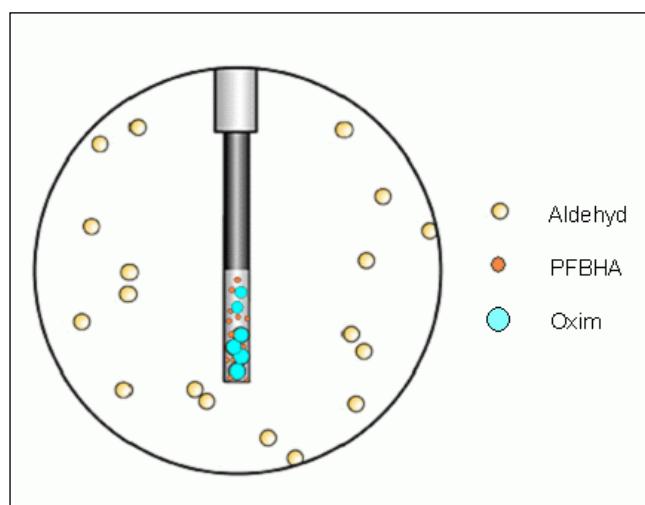


Abbildung 7: Reaktionsschema der On-Fibre-Derivatisierung von Aldehyden

Die Reaktionsprodukte werden in der Beschichtung der SPME Faser angereichert (Abbildung 8) und anschließend im Injektor des Gaschromatographen thermisch desorbiert.



**Abbildung 8: Schema der On-Fibre-Derivatisierung an der ausgefahrenen SPME-Faser
(Modifiziert nach Sigma Aldrich [35])**

3.3.3. Analyse mittels Gaschromatographie und Massenspektrometrie (GC/MS)

Die Gaschromatographie dient zur Auf trennung des Gasgemisches. Die Massenspektrometrie wird zur Identifizierung der Bestandteile des Gasgemisches anhand charakteristischer Fragmente eingesetzt.

Für die Analyse wurde ein Shimadzu GC 17C Gaschromatograph in Kombination mit einem MS QP5050a Massenspektrometer genutzt. Als Säule wurde eine MDN-5S fused-silica capillary column (15 m x 0.25 mm Innendurchmesser, 0.25 µm Filmdicke, Supelco, Bellefonte, PA, USA) verwendet. Die Analyse wurde nach manueller Injektion der SPME Faser durchgeführt. Ausgewählte analytische Parameter des GC/MS sind in Tabelle 2 wiedergegeben.

Tabelle 2: Ausgangsparameter des GC/MS

GC/MS Ausgangsparameter	Wert
Injectork-Temperatur	270 °C
Gesamtfluss	10 ml/min
Säulenfluss	1 ml/min
Injectork-Druck	5 kPa
Säulen-Temperatur	60 °C
Detektorttemperatur	280 °C
Ionisationsenergie	≈70 eV

Die Analyse wurde im splitless-Mode durchgeführt. Dabei wurde initial für 1 Minute sämtliches mit der SPME-Faser in Kontakt kommendes Trägergas (Helium 7.0, Reinheit > 99,99999%) auf die Säule des Gaschromatographen überführt. Eine Minute nach dem Start des Messzyklus ging der Gaschromatograph in den split-Modus über, bei dem nur noch ein geringer Teil des Trägergases aus dem Injektor auf die Säule übergeht (Split Ratio 1:10). Durch diese Prozedur wird sowohl der geringen Konzentration der Analyten als auch der erforderlichen Auflösung Rechnung getragen.

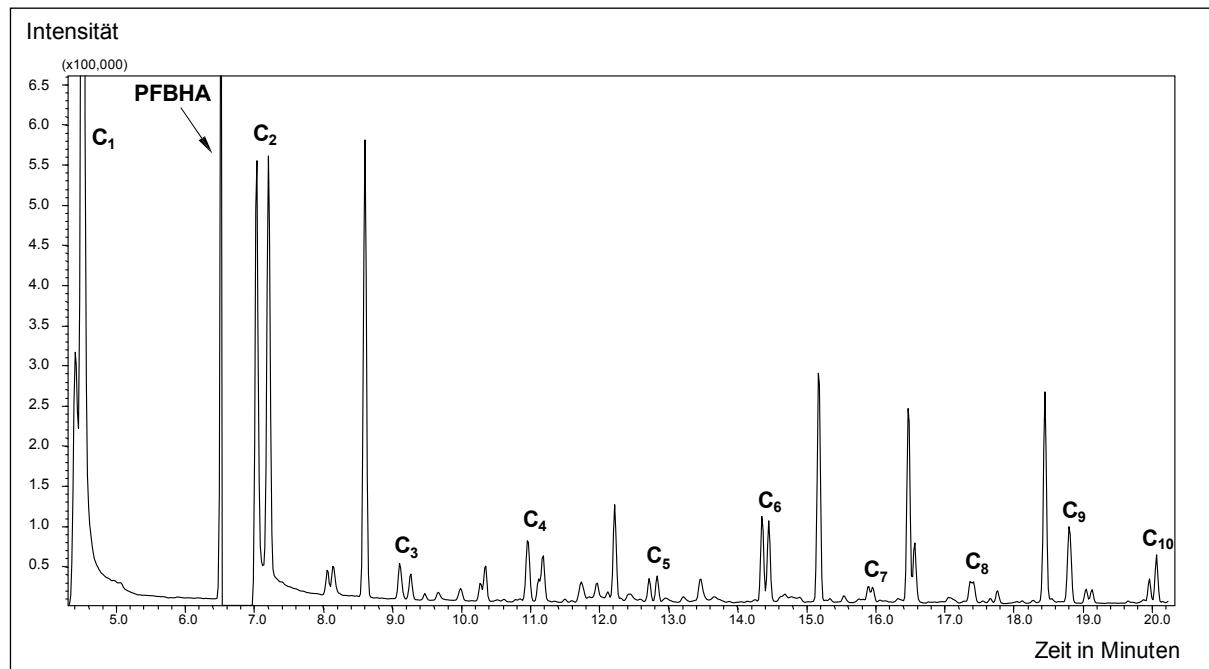
Nach Start des Programms wurde die Temperatur der Säule zunächst für 3 Minuten bei 60 °C belassen, danach mit einer Rate von 5 °C pro Minute auf 80 °C erhöht, dann mit einer Rate von 8 °C pro Minute auf 180 °C und schließlich mit einer Rate von 20 °C pro Minute auf 270 °C hochgeheizt.

Die aus der Säule eluierenden Verbindungen wurden mittel Elektronenstoß (EI ≈70 eV) ionisiert und anschließend über einen massenselektiven Quadrupoldetektor detektiert. Der Quadrupol des Massenspektrometers wurde im Selected-Ion-Monitoring Modus (SIM-Modus) auf die Massen-zu-Ladungs-Verhältnisse (m/z) 161, 181, 196 und 239 eingestellt. Diese Massenfragmente stellen spezifische Bruchstücke der Oxime dar. Zur Quantifizierung wurde für alle Analyten das m/z von 181 genutzt. Tabelle 3 gibt die Retentionszeiten sowie die typischen Fragmente der verschiedenen Oxime wieder.

Tabelle 3: Retentionszeiten und typische Fragmente der einzelnen Oxime

Substanz	Retentionszeit in Minuten	Typische m/z
Formaldehyd	4,48	169, 181, 195
Acetaldehyd	7,15	169, 181, 195, 239
Propanal	9,20	169, 181, 195
Butanal	11,1	169, 181, 195, 239
Pentanal	12,9	169, 181, 195, 239
Hexanal	14,5	169, 181, 195, 239
Heptanal	16,0	169, 181, 195, 239
Octanal	17,3	169, 181, 195, 239
Nonanal	18,8	169, 181, 195, 239
Decanal	20,0	169, 181, 195, 239

In Abbildung 9 ist ein exemplarisches Chromatogramm einer alveolaren Exspirationsprobe eines Lungenkrebspatienten dargestellt. Die Stereoisomere im Chromatogramm stellen sich in Form zweier getrennter Peaks dar. Nach Integration wurden die Flächen der beiden Peaks der jeweiligen Isomere summiert. Anschließend erfolgte die Quantifizierung im Vergleich mit zuvor untersuchten Standardmischungen definierter Konzentration.

**Abbildung 9: Chromatogramm einer Atemgasprobe nach On-Fibre Derivatisierung (Massenspur m/z 181)**

Alle Messungen erfolgten als Doppelbestimmungen, so dass sich die jeweilige Konzentration in der Ausatemluft als arithmetisches Mittel aus den beiden Proben ergab.

3.3.4. Quantifizierung

Zur Quantifizierung der Ergebnisse wurde eine Acht-Punkt-Kalibrierung mit gasförmigem Standard (Ionimed, Innsbruck) durchgeführt. Dieser Standard lagerte in einem beschichteten Stahlzylinder (SilicoSteel) und beinhaltete aliphatische Aldehyde von Formaldehyd bis Decanal in einer Konzentration von $1\text{ ppmV} \pm 5\text{ \%}$. Durch Verdünnung mit hochreinem Stickstoff wurden Proben definierter Konzentrationen hergestellt. Hierzu wurden zwei Tedlar-Beutel zunächst am Vortag drei Mal mit reinem Stickstoff gespült und anschließend mit Stickstoff gefüllt für mindestens acht Stunden im Wärmeschrank bei $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ belassen, um die Gefahr von Kontaminationen des für die Kalibrierungen genutzten Gasgemisches aus den Tedlarbeuteln zu minimieren. Anschließend erfolgte erneut die dreimalige Spülung der Beutels mit reinem Stickstoff und die Zubereitung des Gas-Standards, wie in Abbildung 10 schematisch dargestellt.

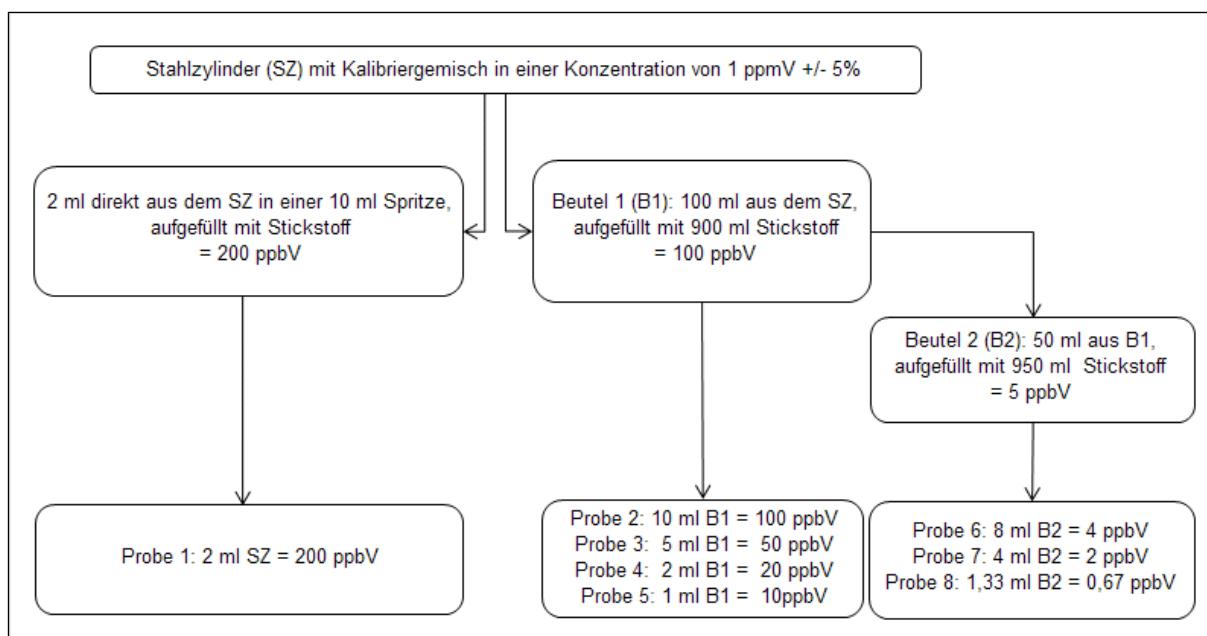


Abbildung 10: Verdünnungsschritte zur Herstellung der Proben für die Kalibrierung aus dem gasförmigen Standard

100 ml Standard aus der Gasbombe wurden zunächst in einen mit 900 ml hochreinem Stickstoff (99,999999 % N₂) gefüllten Tedlar-Beutel überführt, woraus sich ein kumulatives Volumen von 1000 ml im Beutel und eine Konzentration für die enthaltenen Aldehyde von 100 ppbV ergab (B1 in Abbildung 10).

Anschließend erfolgte die Überführung von 50 ml des Gasgemisches aus dem ersten Tedlar-Beutel in den mit 950 ml hochreinem Stickstoff gefüllten zweiten Tedlar-Beutel, so dass es auch hier zu einem kumulativen Volumen von 1000 ml kam. Die Konzentrationen der enthaltenen Aldehyde lagen im zweiten Beutel somit bei 5 ppbV (B2 in Abbildung 10).

Anschließend wurden die im Vorfeld bereits vorbereiteten, mit Stickstoff gespülten, gasdicht verschlossenen und anschließend evakuierten 20 ml-Probengefäße mit den hergestellten Standards

gefüllt. Der Unterdruck in den Probengläschen wurde mit hochreinem Stickstoff ausgeglichen. Die Proben wurden über SPME-OFD präkonzentriert und mittels GC/MS vermessen.

Aus dem Verhältnis der Fläche unter den zugehörigen Peaks und der Konzentration des entsprechenden Aldehyds im Gasgemisch ergab sich eine Kalibrierkurve.

In Abbildung 11 ist als Beispiel ein Ausschnitt aus der Kalibrierkurve für Pentanal dargestellt (0,667-100 ppbV).

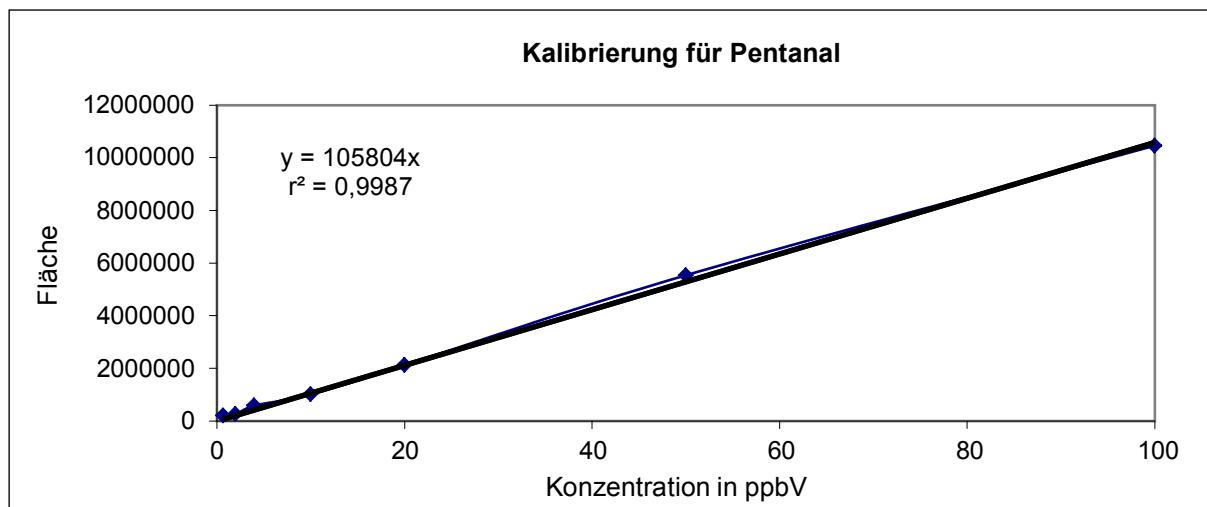


Abbildung 11: Ausschnitt aus der Kalibrierkurve für Pentanal

Die Bestimmung der Sensitivität der Methode erfolgte über die Ermittlung der Nachweisgrenze (Limit of Detection, LOD) und der Bestimmungsgrenze (Limit of Quantification, LOQ) aus den Signal-Rauschverhältnissen (Signal-to-Noise Ratios) von $\geq 3:1$ (LOD) respektive $\geq 10:1$ (LOQ). Für diese Untersuchungen wurden sequentiell an drei aufeinander folgenden Tagen jeweils 10 Blindwerte, d.h. mit 20 ml hochreinem Stickstoff gefüllte Probengefäße vermessen und die mittleren Signal-Rauschverhältnisse bestimmt.

Zur Abschätzung der Qualität der Kalibrierkurven wurde mittels linearer Regression der quadrierte Korrelationskoeffizient ermittelt (r^2).

3.3.5. Statistik

Sämtliche erhobene Daten wurden mittels einer Microsoft Access 2003-Datenbank archiviert und bearbeitet.

Zur statistischen Auswertung wurden Sigmaplot 3.5, Sigmaplot 10.0 und SPSS 10.0 genutzt.

Die Analyse auf Signifikanz erfolgte beim Vergleich der drei Studiengruppen anhand von Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks. Als Post-Hoc Test fand der Tukey-Test Anwendung. Zur Subgruppenanalyse wurde der Mann-Whitney Rank Sum Test genutzt.

Sofern sich für ein Aldehyd signifikante Ergebnisse ergaben, wurde dieser in einer ROC-Kurve den etablierten Serum-Tumormarkern gegenübergestellt.

4. Ergebnisse

4.1. LOD, LOQ und linearer Bereich

Die Nachweisgrenzen der SPME-OFD-Methode lagen im Bereich von 1,3 pmol/l (29 pptV) bis 56 pmol/l (1,3 ppbV), die Quantifizierungsgrenzen im Bereich von 4 pmol/l (96 pptV) bis 226 pmol/l (5,1 ppbV). Der quadrierte Korrelationskoeffizient im untersuchten Bereich lag bei Propanal (C3) bis Nonanal (C9) über 0,96. Bei Formaldehyd (C1), Acetaldehyd (C2) und Decanal (C10) wurden Werte von über 0,86 ermittelt (siehe Tabelle 4). Der lineare Bereich der Methode für die einzelnen Aldehyde erstreckte sich von der jeweiligen LOQ bis zu 200 ppbV, welches der höchsten Konzentrationsstufe der Kalibrierung entsprach.

Tabelle 4: Übersicht über die LOD, LOQ und die quadrierten Korrelationskoeffizienten der SPME–OFD–Methode

Aldehyd	LOD		LOQ		r^2
	nmol/l	ppbV	nmol/l	ppbV	
Formaldehyd	0,028	0,620	0,110	2,46	0,862
Acetaldehyd	0,051	1,15	0,205	4,60	0,908
Propanal	0,005	0,123	0,022	0,490	0,978
Butanal	0,004	0,097	0,017	0,389	0,984
Pentanal	0,001	0,026	0,005	0,103	0,999
Hexanal	0,010	0,235	0,042	0,940	0,975
Heptanal	0,003	0,074	0,013	0,295	0,973
Octanal	0,011	0,240	0,043	0,960	0,978
Nonanal	0,038	0,856	0,153	3,43	0,968
Decanal	0,091	2,04	0,364	8,16	0,915

4.2. Übersicht über die Messergebnisse der Ausatemluft

Wir konnten in der Ausatemluft aller Patienten Aldehyde von Formaldehyd (C1) bis zu Decanal (C10) nachweisen. In Tabelle 5 sind die 25te Perzentile, der Median sowie die 75te Perzentile der Konzentrationen dargestellt.

Tabelle 5: Übersicht über die Exspirationskonzentrationen der Aldehyde im Atemgas

Aldehyd		Kontrollpatienten					
Ex		25te Perzentile		Median		75te Perzentile	
		nmol/l	ppbV	nmol/l	ppbV	nmol/l	ppbV
Formaldehyd		2,68	60,0	12,3	275	29,1	652
Acetaldehyd		0,760	17,0	1,29	28,9	2,42	54,2
Propanal		0,046	1,03	0,081	1,80	0,178	4,00
Butanal		0,034	0,761	0,058	1,31	0,118	2,65
Pentanal		0,030	0,676	0,044	0,987	0,106	2,37
Hexanal		0,058	1,30	0,102	2,30	0,258	5,78
Heptanal		0,026	0,575	0,034	0,763	0,056	1,25
Octanal		0,055	1,24	0,066	1,48	0,098	2,19
Nonanal		0,237	5,32	0,269	6,03	0,322	7,22
Decanal		0,200	4,49	0,350	7,84	0,520	11,6
Raucher							
		25te Perzentile		Median		75te Perzentile	
		nmol/l	ppbV	nmol/l	ppbV	nmol/l	ppbV
Formaldehyd		0,000	0,000	0,976	21,9	3,06	68,5
Acetaldehyd		0,000	0,000	0,934	20,9	1,86	41,6
Propanal		0,045	1,02	0,201	4,50	0,287	6,43
Butanal		0,010	0,231	0,037	0,837	0,063	1,41
Pentanal		0,014	0,315	0,044	0,996	0,080	1,79
Hexanal		0,029	0,655	0,086	1,92	0,193	4,33
Heptanal		0,014	0,311	0,042	0,946	0,063	1,42
Octanal		0,030	0,680	0,055	1,22	0,120	2,68
Nonanal		0,215	4,83	0,418	9,37	0,634	14,2
Decanal		0,134	2,99	0,306	6,87	0,726	16,3
Lungenkrebs-Patienten							
		25te Perzentile		Median		75te Perzentile	
		nmol/l	ppbV	nmol/l	ppbV	nmol/l	ppbV
Formaldehyd		7,54	169	21,9	490	55,7	1249
Acetaldehyd		1,49	33,3	2,17	48,6	3,32	74,4
Propanal		0,103	2,31	0,152	3,42	0,176	3,95
Butanal		0,050	1,12	0,082	1,84	0,116	2,59
Pentanal		0,053	1,19	0,099	2,21	0,104	2,33
Hexanal		0,104	2,34	0,184	4,13	0,253	5,68
Heptanal		0,036	0,816	0,092	2,07	0,130	2,92
Octanal		0,059	1,32	0,181	4,06	0,304	6,82
Nonanal		0,279	6,26	0,654	14,7	1,36	30,5
Decanal		0,131	2,93	0,578	13,0	1,71	38,3

Um einen Einfluss von in der Umgebungsluft vorhandenen Aldehyden auf die Exspirationskonzentrationen sowie Effekte der Derivatisierungsreaktion beziehungsweise der Präkonzentration mittels SPME auszuschließen, erfolgte die Bildung von Differenzen der jeweiligen absoluten Werte der Expiration und Inspiration. Negative Resultate wurden als eine Konzentration von 0 nmol/l behandelt.

Aus Tabelle 6 gehen die 25te Perzentile, der Median sowie die 75te Perzentile der Differenzen hervor. Die Konzentrationen der Aldehyde in der Ausatemluft lagen im Bereich zwischen 7 pmol/l (161pptV) im Falle von Butanal (C4) bis hin zu einer maximalen Konzentration von 71nmol /l (1582ppbV) im Falle von Formaldehyd (C1).

Tabelle 6: Übersicht über die Differenzen aus den Exspirations- und Inspirations-Konzentrationen der Aldehyde

Aldehyd Ex - Ins	Kontrollpatienten					
	25te Perzentile		Median		75te Perzentile	
	nmol/l	ppbV	nmol/l	ppbV	nmol/l	ppbV
Formaldehyd	0,282	6,32	2,13	47,8	5,94	133
Acetaldehyd	0,013	0,291	0,224	5,02	0,949	21,3
Propanal	0,000	0,000	0,000	0,000	0,003	0,067
Butanal	0,000	0,000	0,000	0,000	0,006	0,134
Pentanal	0,000	0,000	0,002	0,045	0,011	0,247
Hexanal	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,022
Heptanal	0,000	0,000	0,003	0,067	0,010	0,224
Octanal	0,004	0,090	0,011	0,247	0,028	0,628
Nonanal	0,021	0,471	0,033	0,740	0,096	2,15
Decanal	0,017	0,381	0,063	1,41	0,222	4,98
Raucher						
	25te Perzentile		Median		75te Perzentile	
	nmol/l	ppbV	nmol/l	ppbV	nmol/l	ppbV
Formaldehyd	0,017	0,381	0,080	1,79	0,286	6,41
Acetaldehyd	0,000	0,000	0,073	1,64	0,435	9,75
Propanal	0,000	0,000	0,011	0,247	0,024	0,538
Butanal	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,022
Pentanal	0,000	0,000	0,000	0,000	0,005	0,112
Hexanal	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Heptanal	0,000	0,000	0,003	0,067	0,006	0,134
Octanal	0,001	0,022	0,006	0,134	0,016	0,359
Nonanal	0,015	0,336	0,085	1,91	0,300	6,72
Decanal	0,083	1,86	0,21	4,75	0,980	22,0
Lungenkrebs-Patienten						
	25te Perzentile		Median		75te Perzentile	
	nmol/l	ppbV	nmol/l	ppbV	nmol/l	ppbV
Formaldehyd	1,37	30,7	3,70	82,9	7,75	174
Acetaldehyd	0,018	0,403	0,265	5,94	1,54	34,5
Propanal	0,002	0,045	0,009	0,202	0,041	0,919
Butanal	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Pentanal	0,011	0,247	0,019	0,426	0,031	0,695
Hexanal	0,008	0,179	0,010	0,224	0,026	0,583
Heptanal	0,005	0,112	0,011	0,247	0,026	0,583
Octanal	0,026	0,583	0,052	1,17	0,087	1,95
Nonanal	0,128	2,87	0,239	5,36	0,496	11,1
Decanal	0,083	1,86	0,212	4,75	0,980	22,0

4.3. Übersicht über die Messergebnisse der Umgebungsluft

Die höchsten Konzentrationen in den Inspirationsproben wurden für Formaldehyd (C1) mit 0-64,9 nmol/l (0-1455 ppbV) und Acetaldehyd (C2) mit 0-13,2 nmol/l (0-296 ppbV) gemessen. Die geringsten Konzentrationen in der Umgebungsluft wiesen Heptanal (C7) mit 0,007 -0,169 nmol/l (0,16-3,79 ppbV) und Decanal (C10) mit 0-1,19 nmol/l (0-26,7 ppbV) auf. Aus Tabelle 7 sind die entsprechenden Quartile zu entnehmen.

Tabelle 7: Übersicht über die Aldehyd-Konzentrationen in der Umgebungsluft

Aldehyd	Kontrollpatienten						
	Ins	25te Perzentile		Median		75te Perzentile	
		nmol/l	ppbV	nmol/l	ppbV	nmol/l	ppbV
Formaldehyd		1,55	34,8	11,9	268	22,9	513
Acetaldehyd		0,297	6,67	0,824	18,5	2,36	52,8
Propanal		0,047	1,05	0,085	1,91	0,194	4,35
Butanal		0,035	0,783	0,059	1,32	0,122	2,73
Pentanal		0,028	0,637	0,036	0,817	0,097	2,17
Hexanal		0,073	1,63	0,109	2,43	0,326	7,30
Heptanal		0,023	0,524	0,030	0,682	0,049	1,10
Octanal		0,050	1,12	0,059	1,32	0,080	1,80
Nonanal		0,178	3,98	0,218	4,88	0,292	6,55
Decanal		0,130	2,91	0,194	4,35	0,439	9,85
Raucher							
	25te Perzentile		Median		75te Perzentile		
	nmol/l	ppbV	nmol/l	ppbV	nmol/l	ppbV	
Formaldehyd	0,000	0,000	0,609	13,7	2,74	61,4	
Acetaldehyd	0,000	0,000	0,086	1,93	1,39	31,1	
Propanal	0,035	0,776	0,120	2,68	0,283	6,35	
Butanal	0,010	0,233	0,040	0,887	0,067	1,51	
Pentanal	0,011	0,252	0,040	0,888	0,077	1,73	
Hexanal	0,032	0,723	0,083	1,86	0,218	4,89	
Heptanal	0,010	0,230	0,045	1,01	0,065	1,45	
Octanal	0,024	0,535	0,052	1,17	0,125	2,80	
Nonanal	0,141	3,16	0,206	4,61	0,677	15,17	
Decanal	0,087	1,96	0,196	4,39	0,612	13,73	
Lungenkrebs-Patienten							
	25te Perzentile		Median		75te Perzentile		
	nmol/l	ppbV	nmol/l	ppbV	nmol/l	ppbV	
Formaldehyd	4,44	99,4	18,7	418	48,4	1085	
Acetaldehyd	0,810	18,2	1,87	41,9	2,35	52,6	
Propanal	0,084	1,89	0,122	2,73	0,152	3,42	
Butanal	0,055	1,24	0,083	1,87	0,118	2,64	
Pentanal	0,039	0,872	0,055	1,23	0,078	1,74	
Hexanal	0,087	1,95	0,176	3,95	0,221	4,94	
Heptanal	0,034	0,772	0,071	1,59	0,092	2,06	
Octanal	0,052	1,16	0,105	2,35	0,205	4,60	
Nonanal	0,205	4,60	0,364	8,16	0,632	14,2	
Decanal	0,000	0,000	0,298	6,68	0,666	14,9	

4.4. Ergebnisse der statistischen Auswertung

In den folgenden Abbildungen sind die Ergebnisse der statistischen Auswertung der jeweiligen Aldehyd-Konzentrationen im Atemgas als Boxplot dargestellt. 5te Perzentile, 25te Perzentile, Median, 75te Perzentile, 95te Perzentile sowie gegebenenfalls signifikante Ergebnisse sind durch entsprechende Markierungen gekennzeichnet.

4.4.1. Ergebnisse für Acetaldehyd, Propanal, Butanal, Heptanal und Decanal (keine signifikanten Unterschiede)

Acetaldehyd- (C2), Propanal- (C3), Butanal- (C4), Heptanal- (C7) und Decanal- (C10) Konzentrationen zeigten im Vergleich der Gruppen keine signifikanten Unterschiede (Abbildungen 12 bis 16).

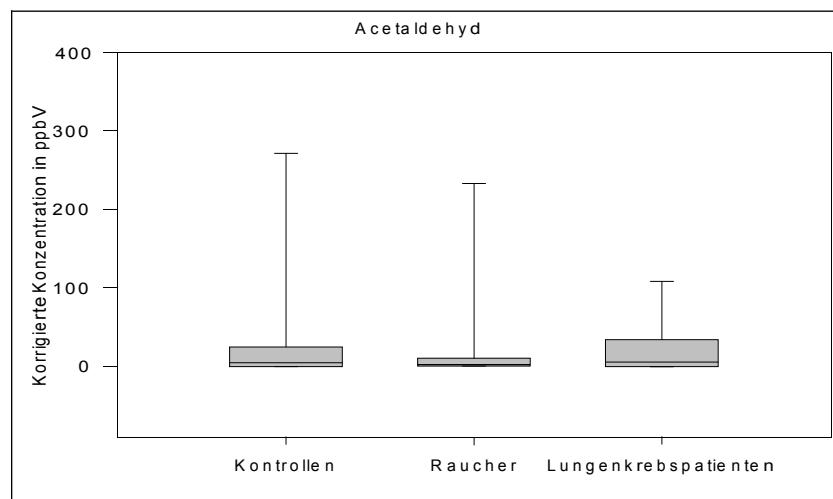


Abbildung 12: Vergleich der Differenzen aus Exspirations- und Inspirationskonzentrationen von Acetaldehyd

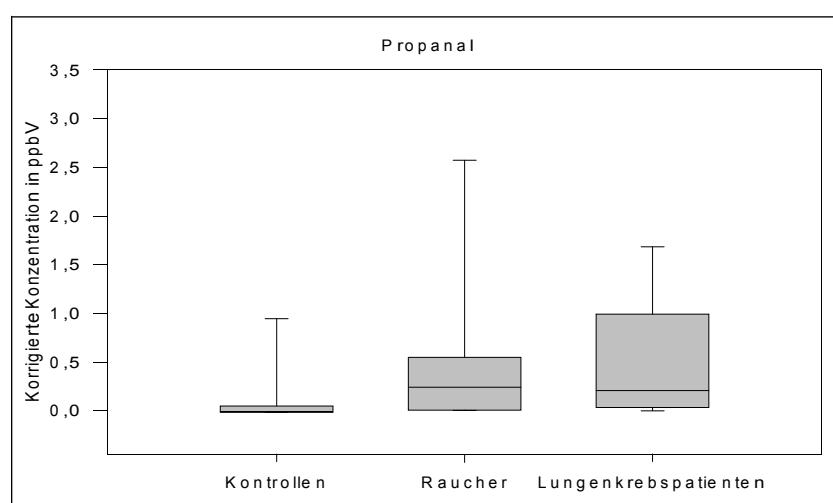


Abbildung 13: Vergleich der Differenzen aus Exspirations- und Inspirationskonzentrationen von Propanal

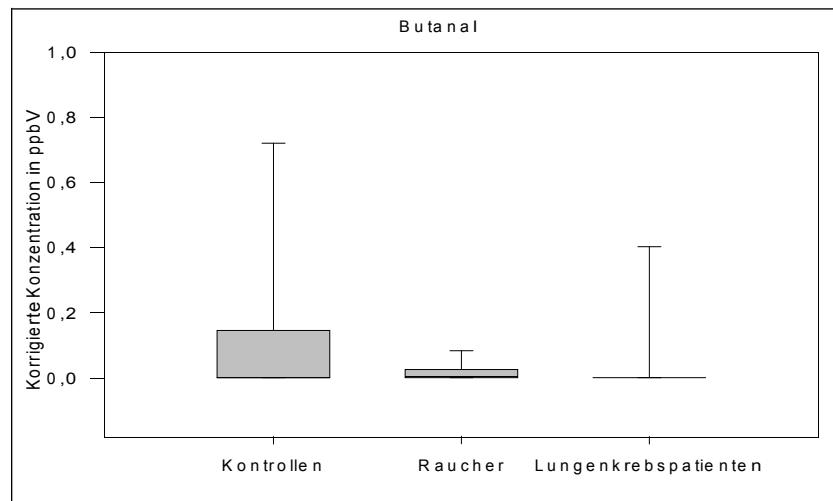


Abbildung 14: Vergleich der Differenzen aus Exspirations- und Inspirationskonzentrationen von Butanal

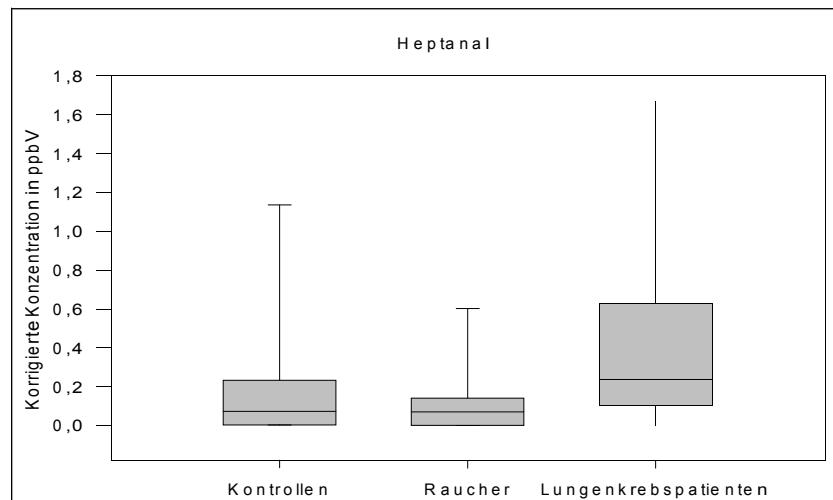


Abbildung 15: Vergleich der Differenzen aus Exspirations- und Inspirationskonzentrationen von Heptanal

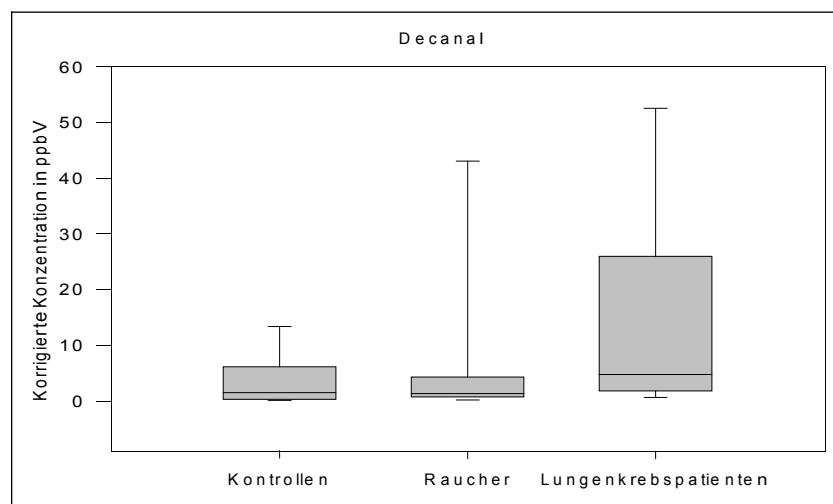


Abbildung 16: Vergleich der Differenzen aus Exspirations- und Inspirationskonzentrationen von Decanal

4.4.2. Ergebnisse für Formaldehyd, Hexanal, Octanal, Nonanal und Pentanal (signifikante Unterschiede)

Die Konzentration von Formaldehyd in der Ausatemluft von Rauchern war signifikant geringer im Vergleich zu den Werten der gesunden Nichtraucher und den Lungenkrebspatienten. Dagegen unterschieden sich die Konzentrationen bei gesunden Nichtrauchern und Lungenkrebspatienten nicht signifikant (Abbildung 17).

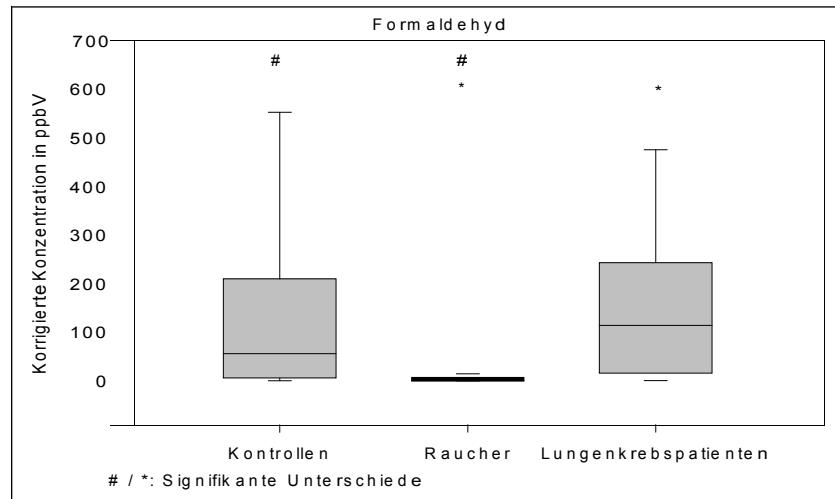


Abbildung 17: Vergleich der Differenzen aus Exspirations- und Inspirationskonzentrationen von Formaldehyd

Bei der statistischen Untersuchung der Umgebungskonzentrationen der Aldehyde ergab sich lediglich bei Formaldehyd ein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe der Lungenkrebspatienten und der Gruppe der Raucher (Abbildung 18).

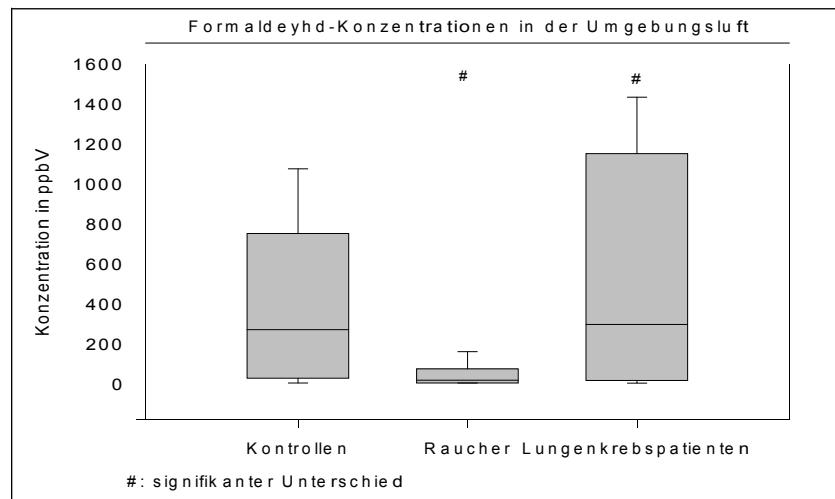


Abbildung 18: Vergleich der Umgebungskonzentrationen von Formaldehyd

Bei der statistischen Untersuchung der Konzentrationen von Hexanal (C6), Octanal (C8) und Nonanal (C9) in der Ausatemluft ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen je zwei Probandengruppen, eine Signifikanz hinsichtlich der jeweiligen dritten Probandengruppe bestand jedoch nicht.

So ergaben sich bei Hexanal signifikante Unterschiede zwischen den Konzentrationen in der Ausatemluft von Rauchern und an Lungenkrebs Erkrankten, nicht jedoch zwischen diesen Gruppen und der Kontrollgruppe der gesunden Nicht-Raucher (Abbildung 19).

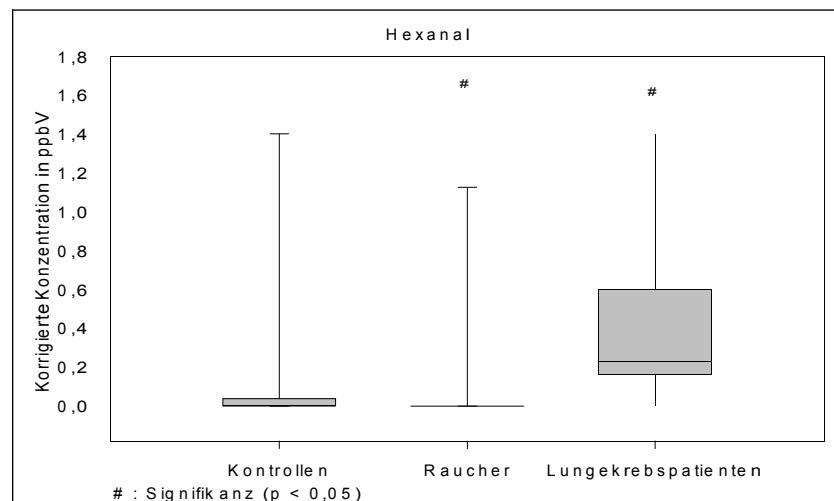


Abbildung 19: Vergleich der Differenzen aus Exspirations- und Inspirationskonzentrationen von Hexanal

Bei Octanal zeigten sich analog zu Hexanal signifikante Unterschiede zwischen den Konzentrationen in der Ausatemluft von Rauchern und an Lungenkrebs Erkrankten, nicht jedoch zwischen diesen Gruppen und der Kontrollgruppe der gesunden Nicht-Raucher (Abbildung 20).

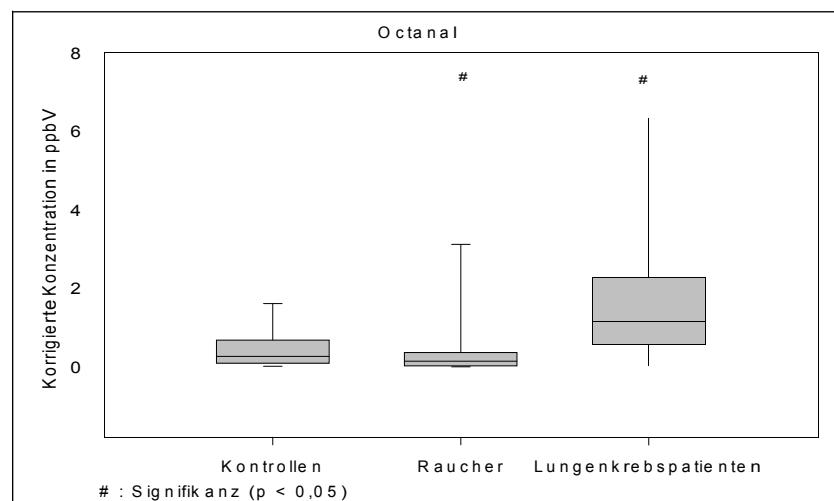


Abbildung 20: Vergleich der Differenzen aus Exspirations- und Inspirationskonzentrationen von Octanal

Bei Nonanal ergab die statistische Auswertung der Ergebnisse signifikante Unterschiede zwischen den Atemgaskonzentrationen der Probanden der Lungenkrebs-Gruppe und der Kontrollgruppe der gesunden Nicht-Raucher, nicht jedoch zwischen diesen beiden Gruppen und den Rauchern (Abbildung 21).

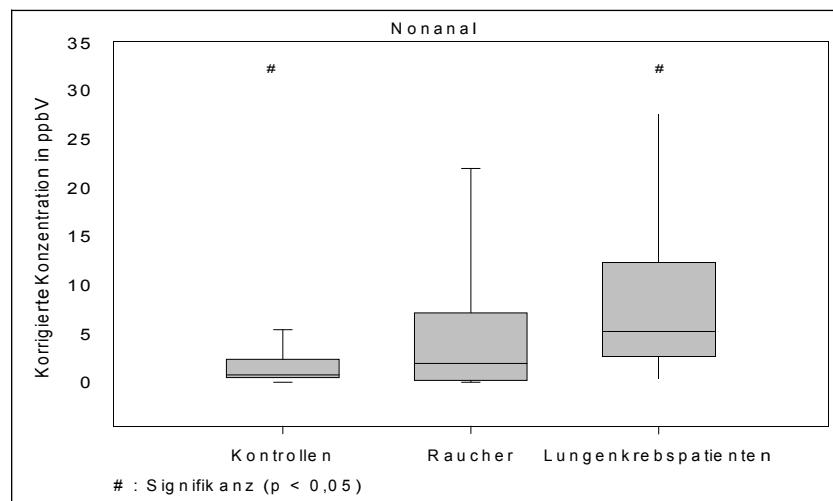


Abbildung 21: Vergleich der Differenzen aus Exspirations- und Inspirationskonzentrationen von Nonanal

Die statistische Untersuchung der Atemluftkonzentrationen von Pentanal ergab signifikante Unterschiede sowohl zwischen der Gruppe der Kontrollprobanden und der Gruppe der an Lungenkrebs erkrankten Patienten als auch zwischen Letzterer und der Gruppe der Raucher. Die Konzentrationen von Pentanal in der Ausatemluft bei Probanden aus den Kontrollgruppen der Raucher und der gesunden Nicht-Raucher unterschieden sich nicht signifikant (Abbildung 22).

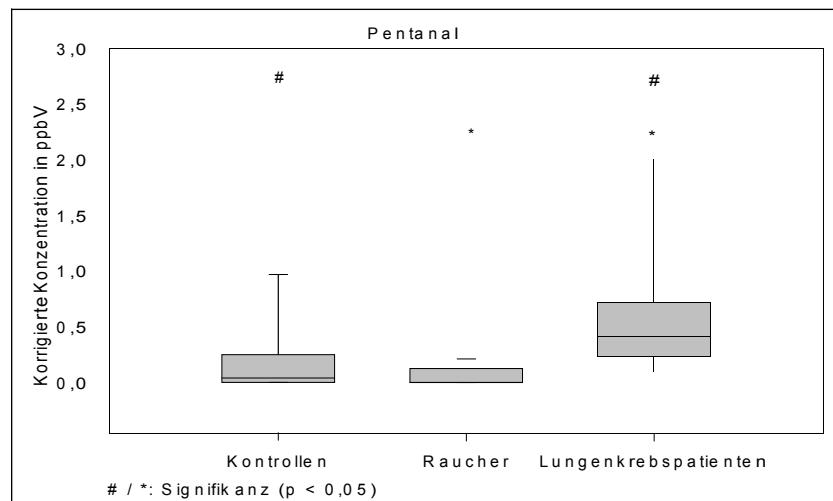


Abbildung 22: Vergleich der Differenzen aus Exspirations- und Inspirationskonzentrationen von Pentanal

4.5. Vergleich der ermittelten Atemgas-Marker mit Serum-Tumormarkern

Die in dieser Studie ermittelten Cut-off-Werte mit dazugehörigen Werten für Spezifität und Sensitivität sowie positiver und negativer Korrektheit der Serummarker NSE, CEA und Cyfra 21-1 sind nebst Vergleich mit den signifikant erhöhten Aldehyden im Atemgas aus Tabelle 8 ersichtlich.

Tabelle 8: Vergleich von Pentanal, Hexanal, Octanal, Nonanal und den Serummarkern NSE, CEA & Cyfra 21-1 hinsichtlich ausgewählter statistischer Gütekriterien

Marker	Cut-off	Sensitivität in %	Spezifität in %	Positive Korrektheit	Negative Korrektheit
Pentanal	0,118 ppbV	91,67	69,6	61,11	94,44
Hexanal	0,23 ppbV	50	87,5	66,67	76,92
Octanal	0,545 ppbV	83,33	79,17	66,67	90
Nonanal	0,653 ppbV	83,33	66,67	55,55	88,23
NSE	16,6 (15) ng/ml	75 (75)	78,3 (56,5)	64,29 (47,37)	85,71 (81,25)
Cyfra 21-1	2,01(3,3) ng/ml	91,7 (66,7)	95,7 (100)	91,7 (1)	95,7 (82,14)
CEA	2,74 (4,6) ng/ml	75 (58,33)	78,3 (95,65)	64,29 (87,5)	85,71 (81,48)

In Klammern: Cut-off-Werte laut Zentrallaboratorium des Instituts für klinische Chemie der Uniklinik Rostock

4.5.1. Hexanal

Die ROC-Kurve von Hexanal und den oben genannten Serummarkern ist in Abbildung 23 wiedergegeben. Der am besten geeignete Cut-off-Wert von 0,229 ppbV (0,01 nmol/l) würde mit einer Sensitivität von 50 % und einer Spezifität von 87,5 % einhergehen. Hinsichtlich der Serum-Tumormarker ist Hexanal somit mit CEA und NSE vergleichbar, während Cyfra 21-1 günstigere Testergebnisse liefert.

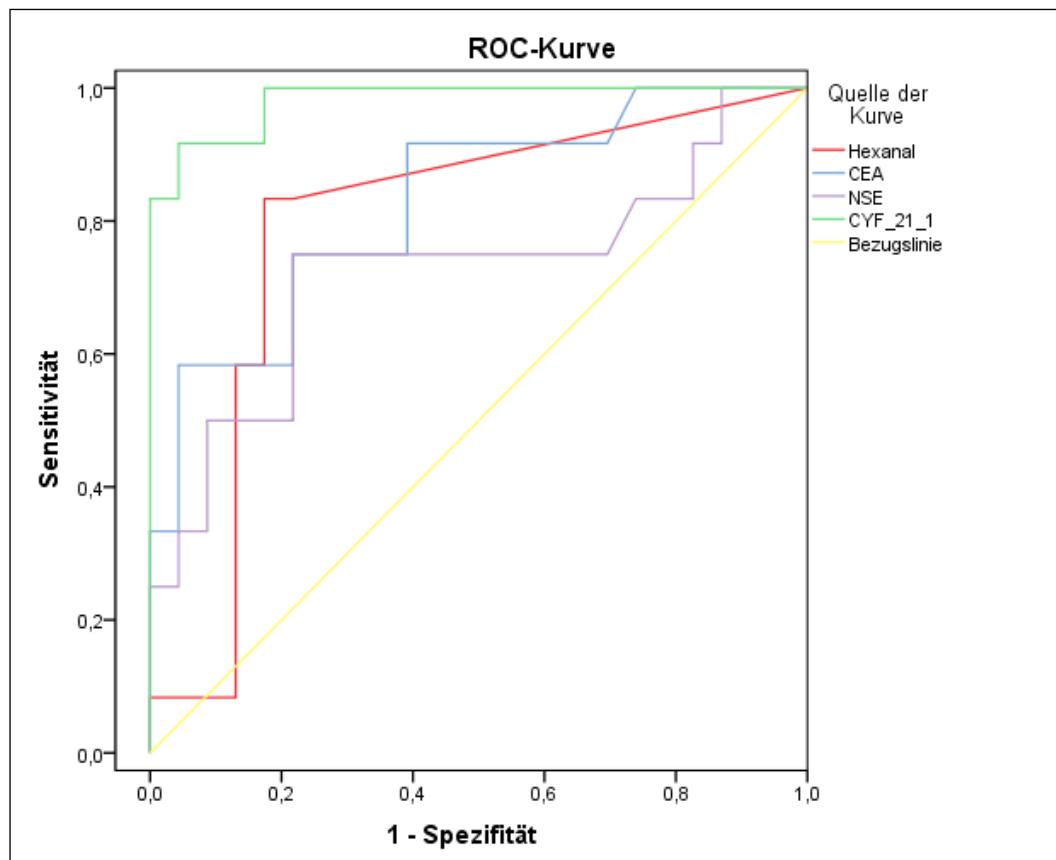


Abbildung 23: Vergleich von Hexanal im Atemgas und den Serummarkern CEA, NSE & Cyfra 21-1 hinsichtlich Sensitivität und Spezifität

4.5.2. Octanal

Die ROC-Kurve von Octanal und den oben genannten Serummarkern ist in Abbildung 24 wiedergegeben. Der für eine Screening-Untersuchung günstigste Cut-off-Wert wäre 0,545 ppbV (0,024 nmol/l). Daraus ergibt sich eine Sensitivität von 83,33 % bei einer Spezifität von 79,17 %.

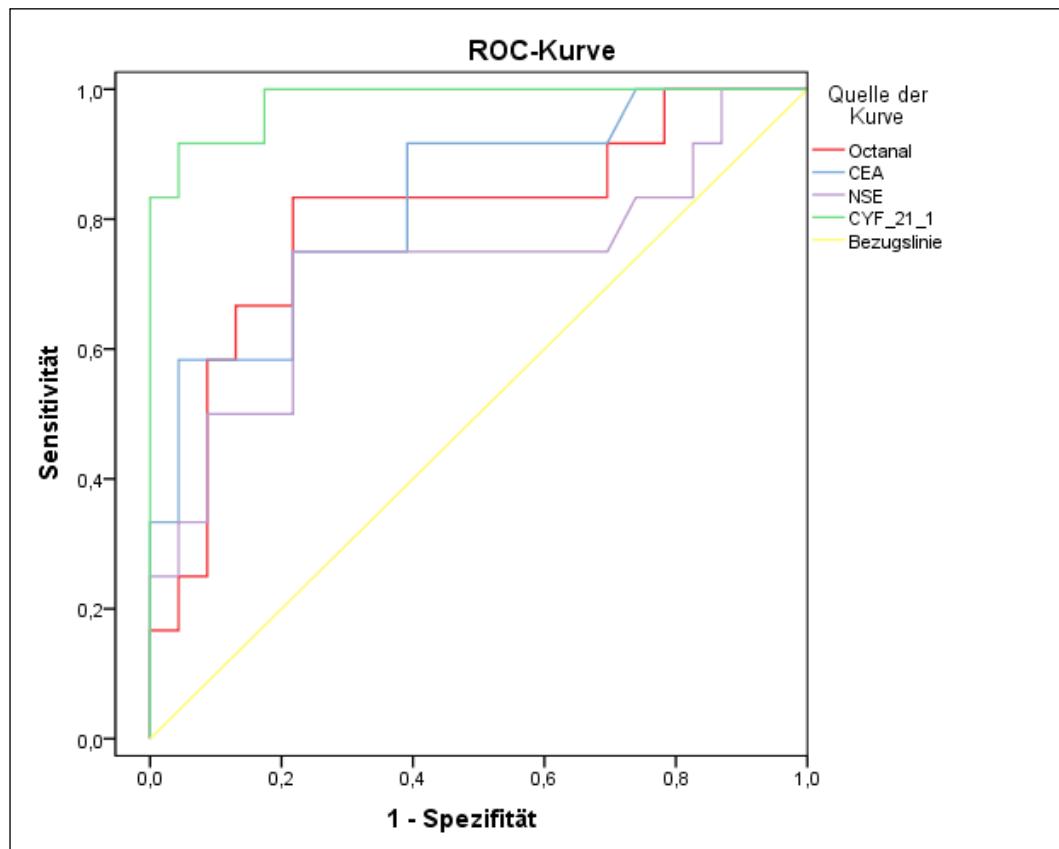


Abbildung 24: Vergleich von Octanal im Atemgas und den Serummarkern CEA, NSE & Cyfra 21-1 hinsichtlich Sensitivität und Spezifität

4.5.3. Nonanal

Die ROC-Kurve von Nonanal und den oben genannten Serummarkern ist in Abbildung 25 wiedergegeben. Es ergibt sich für Nonanal ein für eine Screening-Untersuchung günstigster Cut-off-Wert von 0,653 ppbV (0,029 nmol/l). Die Sensitivität und die Spezifität liegen bei 83,33 % und 66,67 %. Auch Nonanal zeigte im Vergleich mit den Serum-Markern eine ähnliche Performance wie CEA und NSE, während Cyfra 21-1 die günstigsten Testergebnisse lieferte.

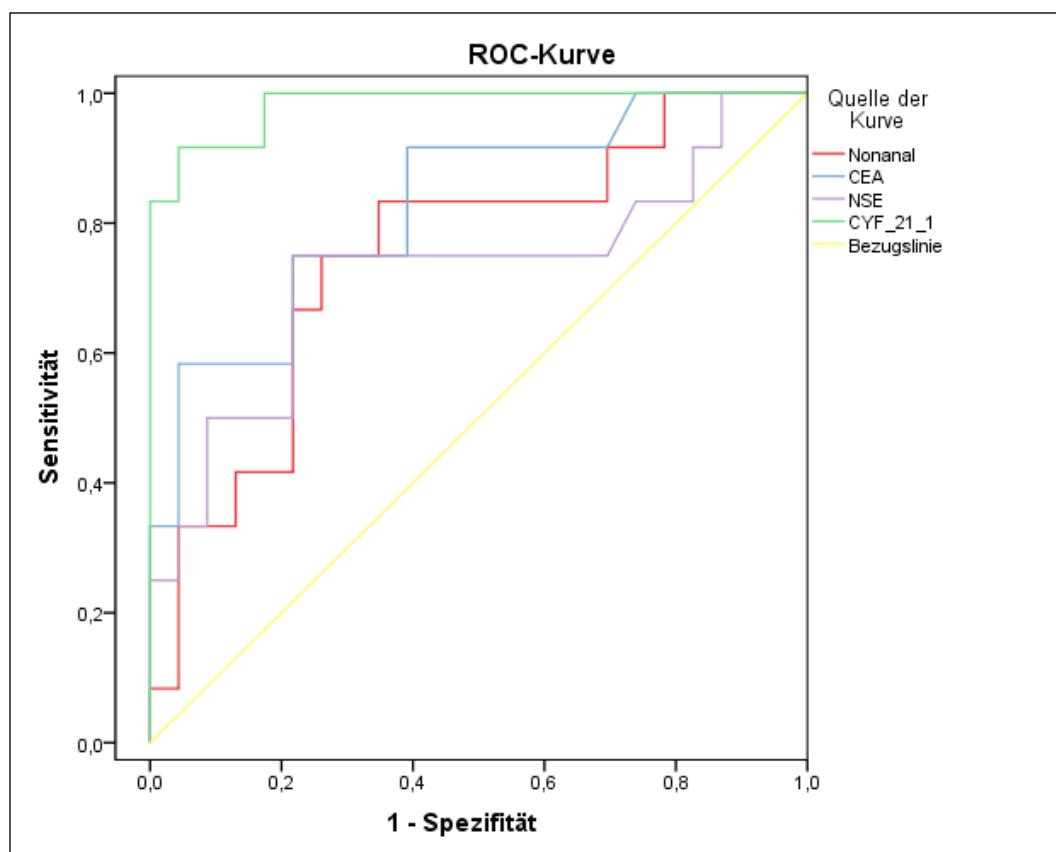


Abbildung 25: Vergleich von Nonanal im Atemgas und den Serummarkern CEA, NSE & Cyfra 21-1 hinsichtlich Sensitivität und Spezifität

4.5.4. Pentanal

Die ROC-Kurve von Pentanal und den oben genannten Serummarkern ist in Abbildung 26 wiedergegeben.

Ein Cut-off-Wert von 0,118 ppbV (5,27 pmol/l) würde mit einer Sensitivität von 91,67 % bei einer Spezifität von 69,6 % die beste Testperformance für eine Screening-Untersuchung bieten. Im Vergleich mit den Serum-Markern zeigte Cyfra 21-1 eine höhere Testperformance, während CEA und NSE einen ungünstigeren Kurvenverlauf aufwiesen.

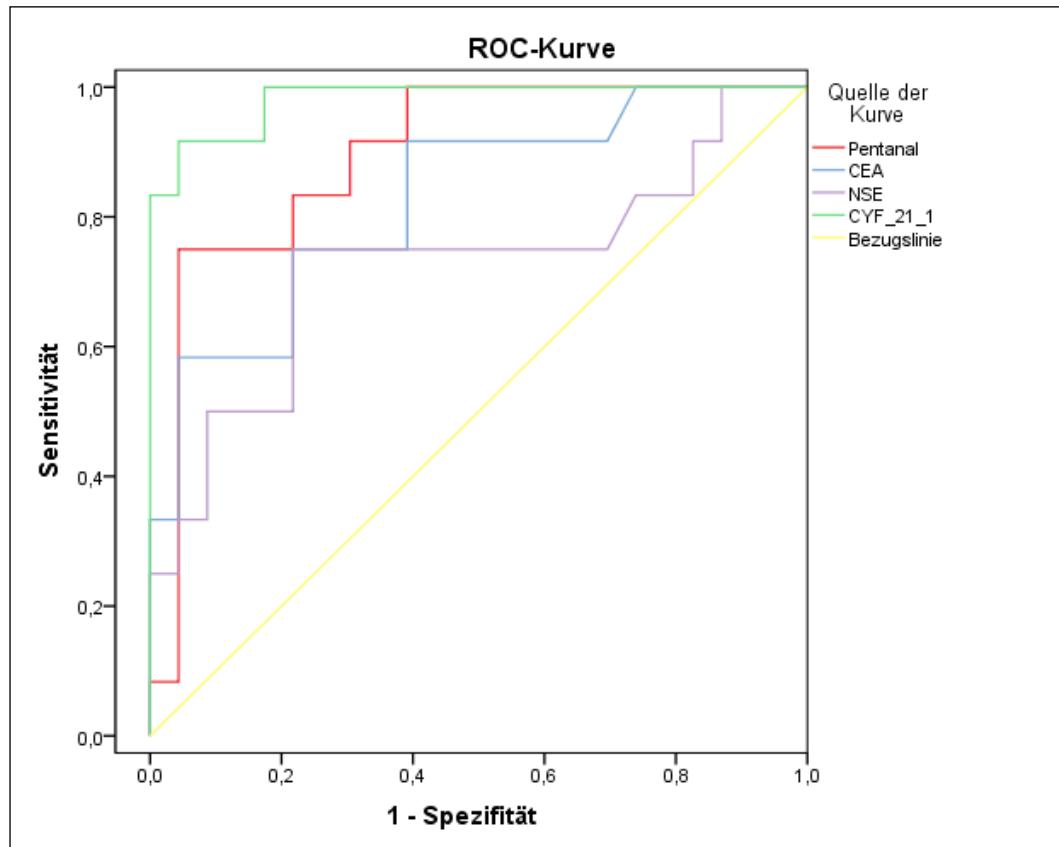


Abbildung 26: Vergleich von Pentanal im Atemgas und den Serummarkern CEA, NSE & Cyfra 21-1 hinsichtlich Sensitivität und Spezifität

4.6. Subgruppenanalyse

4.6.1. Geschlechtsspezifische Unterschiede

In der Subgruppenanalyse zeigten sich bezüglich der gemessenen Aldehyde keine signifikanten ($p<0,05$) geschlechtsspezifischen Unterschiede im Mann-Whitney Rank Sum Test. Formaldehyd, Pentanal und Hexanal zeigten mit p-Werten von 0,054-0,064 einen Trend zu signifikanten Werten. Die genauen Werte sind aus Tabelle 9 zu entnehmen.

Tabelle 9: Vergleich der Differenzen aus Exspirations- und Inspirationskonzentration von männlichen und weiblichen Probanden

	Männlich n = 22 Median	Weiblich n = 14 Median	Mann-Whitney Rank Sum Test
Aldehyd	nmol/l	ppbV	p-Wert
Formaldehyd	2,10	47	0,054
Acetaldehyd	0,22	5,02	0,134
Propanal	0,0035	0,078	0,606
Butanal	0	0	0,33
Pentanal	0,010	0,23	0,064
Hexanal	0,0075	0,169	0,062
Heptanal	0,0058	0,129	0,567
Octanal	0,026	0,593	0,306
Nonanal	0,094	2,1	0,961
Decanal	0,11	2,4	0,355

4.6.2. Histologie-spezifische Unterschiede

Bei der Histologie-spezifischen Betrachtung wurde aufgrund der geringen Fallzahl lediglich die klinisch etablierte, jedoch aus pathohistologischer Sicht unpräzise Unterscheidung zwischen den nicht-kleinzelligen Lungentumoren (NSCLC) und den mit einer schlechteren Prognose einhergehenden kleinzelligen Lungentumoren (SCLC) verwendet.

Bei dieser Betrachtung zeigte sich im Mann-Whitney Rank Sum Test ein signifikanter Unterschied bei Hexanal ($p=0,045$), welches die Patienten mit einem kleinzeligen Lungentumor in erhöhter Konzentration ausatmeten. Die genauen Werte sind Tabelle 10 zu entnehmen.

Tabelle 10: Vergleich der Differenzen aus Exspirations- und Inspirationskonzentration von Lungenkrebspatienten mit NSCLC und SCLC

	NSCLC n = 8 Median		SCLC n = 4 Median		Mann-Whitney Rank Sum Test
	nmol/l	ppbV	nmol/l	ppbV	
Aldehyd					
Formaldehyd	3,85	86,3	8,34	187	0,815
Acetaldehyd	0,095	2,14	1,02	22,9	0,214
Propanal	0,0031	0,07	0,013	0,298	0,368
Butanal	0	0	0	0	0,808
Pentanal	0,019	0,415	0,023	0,509	0,905
Hexanal	0,0079	0,177	0,030	0,68	0,045
Heptanal	0,0081	0,182	0,015	0,339	0,57
Octanal	0,043	0,97	0,054	1,21	0,57
Nonanal	0,28	6,17	0,21	4,64	0,887
Decanal	0,19	4,21	0,39	8,63	0,933

Abbildung 27 veranschaulicht die Ergebnisse der statistischen Histologie-spezifischen Untersuchungen bezüglich Hexanal in Form eines Boxplots. 25te Perzentile, Median, 75te Perzentile sowie die ermittelte Signifikanz sind entsprechend kenntlich gemacht.

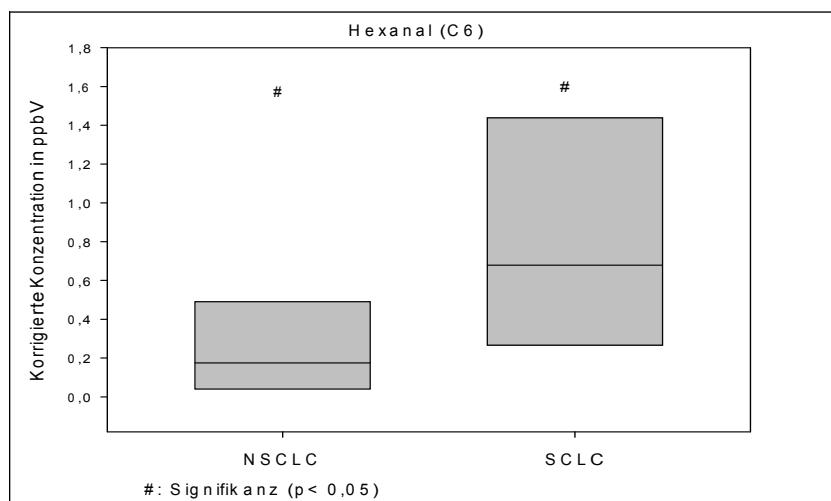


Abbildung 27: Vergleich der Lungenkrebspatienten mit NSCLC und SCLC hinsichtlich der Differenzen aus Exspirations- und Inspirationskonzentrationen von Hexanal

5. Diskussion

Durch die Kombination von Kapnometer-gesteuerter, gezielt-alveolarer Probennahme und einem stabilisierenden Derivatisierungsschritt in der Phase der Präkonzentration (SPME-OFD) ist eine zuverlässige und reproduzierbare Analyse volatiler Aldehyde im Spurenbereich möglich.

Im Ergebnis der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass Lungenkrebspatienten, gesunde Raucher und gesunde Nichtraucher in ihrer Ausatemluft signifikant unterschiedliche Konzentrationen von Aldehyden aufweisen.

Die in der Ausatemluft von Probanden mit Lungenkrebs signifikant erhöhten Aldehyde (C5, C7, C8, C9) bieten als non-invasiver Marker eine vergleichbare Test-Performance wie die etablierten Serum-Tumormarker (NSE, CEA, Cyfra 21-1).

Die untersuchten niedrig- bis mittelkettigen Aldehyde stellen schon aufgrund ihrer ausgeprägten Volatilität und Reaktivität hohe Ansprüche an die analytische Methode. Hinzu kommt, dass diese Aldehyde zum größten Teil lediglich im oberen pptV-Bereich (pmol/l) bis in den niedrigen ppbV-Bereich (nmol/l) in der Ausatemluft vorliegen.

Die ermittelten Werte der linearen Regression (r^2) sowie die Werte der Sensitivität (LOD/LOQ) dokumentieren die Zuverlässigkeit und Zulässigkeit der angewandten analytischen Methode. Die Messergebnisse sind mit denen anderer Studien vergleichbar, welche die SPME-OFD-Methode zur Aldehyd-Bestimmung in Blut oder Atemgas ebenfalls nutzten [31, 32, 36, 37].

Die Kontamination der Raumluft mit potentiellen Markerverbindungen ist, insbesondere im klinischen Bereich, ein generelles Problem der Atemgasanalytik. Tatsächlich wiesen in unserer Untersuchung 15 % der Probanden höhere inspiratorische als exspiratorische Konzentrationen von Formaldehyd (C1) auf. Bei der statistischen Untersuchung der Aldehydkonzentrationen in der Umgebungsluft ergab sich für Formaldehyd ein signifikanter Unterschied. Dieser bestand zwischen der Gruppe der Raucher und der Gruppe der Lungenkrebspatienten. Ursächlich hierfür ist, dass die Probennahme bei den an Lungenkrebs Erkrankten im Gegensatz zu den gesunden Rauchern in medizinischen Einrichtungen stattfand, in denen routinemäßig Desinfektionsmittel verwendet wurden.

Die festgestellte Kontamination der Umgebungsluft mit Formaldehyd geht konform mit entsprechenden Untersuchungen in der Literatur [38, 39].

Trotzdem wurde Formaldehyd in zahlreichen Publikationen in der Vergangenheit wiederholt als möglicher Biomarker für eine Lungenkrebskrankung vorgeschlagen [15, 40]. Die erhebliche Umgebungskontamination verdeutlicht jedoch die fehlende Eignung von Formaldehyd im Atemgas als Marker für endogene Prozesse.

Auch Acetaldehyd (C2) konnte in erheblichen Konzentrationen in der Umgebungsluft gefunden werden [39]. Hinzu kommt, dass die endogene Produktion von Acetaldehyd eng an den Kohlenwasserstoff-Metabolismus gebunden ist. Zum Beispiel bestehen enge Beziehungen zum Ethanol-Metabolismus [41]. In der Gesamtschau scheint die Verwendung von Acetaldehyd als

spezifischer Marker für den Metabolismus von Tumorzellen beziehungsweise als Biomarker für tumorinduzierten oxidativen Stress daher unmöglich.

Propanal (C3) wurde als Produkt des Zusammenbruchs von ω -3 PUFA beschrieben [42]. Wir konnten in unseren Messungen jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen Lungenkrebspatienten, gesunden Rauchern und gesunden Nichtrauchern feststellen. Dies findet seine Begründung in den auch bei dieser Substanz erheblichen Konzentrationen in der Umgebungsluft, die eine Darstellung von Veränderungen im geringen Konzentrationsbereich unmöglich machen.

Butanal (C4) ist als typische Kontamination der Umgebungsluft beschrieben, die von medizinischen Produkten, insbesondere Plastikmaterialien, ausgestoßen werden [43]. Ebenso wie bei C1-C3 verhindern daher die inspiratorischen Konzentrationen von Butanal eine Verwendung als endogener Biomarker.

Im Gegensatz zu den niedrigkettigen Aldehyden C1-C4 lagen die in der Umgebungsluft festgestellten Konzentrationen für die Aldehyde von Pentanal (C5) bis Decanal (C10) in einem akzeptabel niedrigen Bereich.

Im Fall von Nonanal (C9) bestehen signifikante Unterschiede zwischen den Konzentrationen im Atemgas von gesunden Nichtrauchern und Lungenkrebspatienten, jedoch nicht zwischen diesen beiden Gruppen und der Gruppe der gesunden Raucher.

Ähnliche Ergebnisse sind auch den Arbeiten von Poli et al. [31] und Svensson et al. [32] zu entnehmen. Die Autoren untersuchten mit weitestgehend ähnlichen analytischen Methoden, jedoch mit unterschiedlichen Methoden der Probennahme die Ausatemluft von Lungenkrebs-Patienten. Die jeweilig ermittelten Konzentrationsbereiche der höherkettigen Aldehyde (C3-C9) stimmen mit den von uns bestimmten Bereichen überein. Beide Autorenteams konnten eine vermehrte Abatmung von Aldehyden im Falle einer Lungenkrebskrankung feststellen.

Hexanal (C6) und Octanal (C8) im Atemgas erlauben nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit aufgrund signifikanter Unterschiede eine Differenzierung zwischen gesunden Rauchern und an Lungenkrebs erkrankten Patienten, nicht jedoch zwischen gesunden Nichtrauchern und Lungenkrebspatienten.

Hexanal wurde in einer Untersuchung von Shahidi als Produkt des Zusammenbruchs von ω -6 PUFA (zum Beispiel Linolsäure oder Arachnoidsäure) beschrieben [42]. In klinischen Studien wurde Hexanal im Blut von Patienten mit verschiedenen Tumor-Erkrankungen nachgewiesen. So beschrieben Li et al. in ihrer Arbeit erhöhte Konzentrationen von Hexanal sowie Heptanal und Nonanal im Blut von Tumor-Patienten [14]. Auch wurde eine erhöhte Konzentration von Hexanal in kondensierter Ausatemluft und Sputum von Patienten mit chronisch-inflammatorischen Lungenerkrankungen festgestellt [44-46].

Beim Vergleich der Aldehyd-Konzentrationen in der Ausatemluft von Lungenkrebspatienten ergaben sich in den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit signifikante Unterschiede bei Hexanal zwischen Patienten mit NSCLC und Patienten, die an SCLC erkrankt waren. Hexanal wird als genereller Biomarker für oxidativen Stress betrachtet [46]. In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass

SCLC-Zellen erhöhte Proliferationsraten sowie eine erhöhte metabolische Aktivität im Vergleich mit NSCLC-Zellen aufweisen [47, 48]. Die erhöhten Konzentrationen von Hexanal lassen sich in diesem Zusammenhang als eine mit der vermehrten Aktivität einhergehende erhöhte Rate des oxidativen Stresses in den SCLC-Zellen interpretieren. Da jedoch die hier verglichenen Patientengruppen sehr klein sind (NSCLC n= 8; SCLC n= 4) lassen sich keine generalisierbaren Schlüsse ziehen.

Pentanal (C5) zeigte in dieser Studie die deutlichsten Unterschiede zwischen den verschiedenen Untersuchungsgruppen. Zudem ist nur bei Pentanal die Unterscheidung sowohl zwischen gesunden Nichtrauchern und an Lungenkrebs erkrankten Patienten als auch zwischen gesunden rauchenden Probanden und an Lungenkrebs erkrankten Patienten möglich.

Bei Anwendung von Aldehyden als Biomarker bei Tumorerkrankungen wird es von großer Bedeutung sein, ob das jeweilige Aldehyd unspezifisch durch oxidativen Stress und Membranperoxidation entsteht oder aber einen spezifischen Hinweis auf die Anwesenheit von Tumorzellen zu geben vermag.

Eine Theorie für die selektive Erhöhung bestimmter Aldehyde bei Tumorpatienten besteht in der Annahme, dass jene PUFA in der Zellmembran der Tumorzelle vermehrt vorkommt, die als Produkt des Zusammenbruchs bei oxidativer Schädigung das entsprechende Aldehyd aufweist. In der Literatur findet sich diesbezüglich für Pentanal lediglich eine Beschreibung als typischer Marker der Lipidperoxidation in Brustdrüsen-Zellen [49]. Jedoch konnte Yazdanpanah in seiner Arbeit erhöhte Konzentrationen von Pentanal im Plasma von Kindern feststellen, die an akuter myeloischer Leukämie litten [23].

Dagegen ist die nichtselektive Entstehung von oxygenierten Verbindungen wie Ketonen und Aldehyden im Gewebe aufgrund von oxidativem Stress gut untersucht und verstanden.

So findet in vivo eine entzündliche Abwehrreaktion des körpereigenen Immunsystems auf die Tumorzellen und die durch die unkontrollierte Proliferation im Tumorgewebe bedingten Nekrosen statt. Hierbei kommt es zu einer die antioxidativen Enzyme überfordernden Produktion von ROS und folglich zu erhöhtem oxidativen Stress.

In der Literatur gibt es zahlreiche Erkenntnisse, die auf erhöhten oxidativen Stress in Tumorgewebe hinweisen [24, 25, 27-29]. Es konnte darüber hinaus nachgewiesen werden, dass oxidativer Stress ein verursachender Faktor für die Entstehung von Tumoren sein kann [50].

Die entstandenen reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS) attackieren die mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA) in der Membran der Zellen. Die Folge ist eine oxydative Schädigung dieser PUFA und konsekutiv der Zusammenbruch derselben. In verschiedenen Arbeiten wurden C3-C10 Aldehyde als Produkt des Zusammenbruchs dieser oxydativ geschädigten PUFA beschrieben [21, 42, 51, 52].

Für die Unterscheidung der Genese von exhalierteren Aldehyden bedarf es weiterer Forschung, speziell im Bereich des Metabolismus von Tumorzellen. Mehrere Arbeitsgruppen haben diesem Gedanken folgend versucht, über die Analyse des Headspace über Tumorzellkulturen Substanzen nachzuweisen, die von den Tumorzellen selbst produziert wurden [53-56]. Die Ergebnisse der Studien sind jedoch sehr different. So stellten Smith et al. [56] erhöhte Konzentrationen von Acetaldehyd im Headspace fest. Dagegen ergaben die Untersuchungen von Filipiak et al. [54] und

von Sponring et al. [55] nicht nur verringerte Konzentrationen für Acetaldehyd, sondern auch für andere Aldehyde, wie 2-Methylpropanal, 3-Methylbutanal oder Hexanal. Sie zogen hieraus den Schluss, dass es durch mit der Kanzerogenese einhergehenden Aktivitätssteigerungen von Aldehyd-Dehydrogenasen [57-59] zu einem Konsum dieser Substanzen durch die Tumorzellen kommt.

Man muss feststellen, dass diese Pilotstudien anhand weniger Tumorzellreihen bislang nicht auf die Situation *in vivo* übertragbar sind. Dennoch können diese Studien als Hinweise dienen, dass die untersuchten niedrigkettigen Aldehyde nicht enzymatisch in der Tumorzelle in gesteigertem Umfang produziert werden. Pentanal, Heptanal und höhere Aldehyde wurden hierbei nicht untersucht, daher ist diesbezüglich auch keine entsprechende Aussage zu treffen.

Betrachtet man die Verteilung von Alter und Geschlecht in den unterschiedlichen Gruppen, fällt ein relatives Übergewicht der älteren männlichen Probanden in der Gruppe der Lungenkrebspatienten auf. Wir tolerierten diesen Unterschied zur Vermeidung von bislang unentdeckten Tumorerkrankungen in den Kontrollgruppen, sowie im Fall der gesunden Nichtraucher auch zur Vermeidung anderer chronischer Erkrankungen, wie zum Beispiel COPD, die die Ergebnisse hätte beeinflussen können.

Die statistische Untersuchung unserer Ergebnisse ergab, ebenso wie die entsprechenden Untersuchungen in der Literatur [60-62], keine signifikante Abhängigkeit der Konzentrationen von Aldehyden in der Ausatemluft von Alter oder Geschlecht der Probanden. Pentanal und Hexanal zeigten in der geschlechtsspezifischen Betrachtung der Resultate lediglich tendenziell erhöhte Werte bei den Männern, ohne jedoch in dieser Hinsicht signifikant zu sein. Aufgrund des deutlichen Übergewichts des männlichen Geschlechts bei der Patientengruppe mit Lungentumor (11 männlich, 1 weiblich) wird diese Tendenz als Resultat der in der Lungentumorgruppe signifikanten Erhöhung der entsprechenden Aldehyde in der Ausatemluft gesehen.

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Eignung von Aldehyden als Biomarker für Lungenkrebs. Daher führten wir die Studie mit Probanden durch, die an histologisch gesicherten Tumorerkrankungen der Lunge litten. Entsprechend der zugrunde liegenden Problematik der fehlenden Möglichkeiten zur Früherkennung dieser Erkrankungen lagen bei allen teilnehmenden Patienten bereits Tumorerkrankungen mindestens im Stadium IIIA (nach der American Joint Commission on Cancer, AJCC) vor. In einem nächsten Schritt wäre eine Studie notwendig, in der die Probanden vor dem Auftreten von Symptomen untersucht werden, um die Test-Leistung in Hinsicht auf eine Früherkennung der Erkrankung zu untersuchen. Hierzu wird eine entsprechend höhere Grundgesamtheit an Probanden notwendig sein.

In den vergangenen Jahren wurden einige Studien veröffentlicht, die zum Ziel hatten, an Lungenmalignomen erkrankte Patienten in einem möglichst frühen Stadium der Erkrankung anhand der Analyse des Atemgases zu erkennen. Diesbezüglich schlugen Phillips et al. verschiedene Sets von Biomarkern vor, die im Sinne eines „fingerprint of lung cancer“ als Profil betrachtet die Identifikation von Lungenkrebspatienten ermöglichen sollten [19]. Hierunter waren zum Beispiel eine Kombination von verschiedenen Kohlenwasserstoffen (wie Pentan, Heptan und verzweigte Kohlenwasserstoffe wie Tridecan-3-Methyl).

Demselben Prinzip folgend empfahlen Poli et al. in ihrer Arbeit eine Kombination von dreizehn aliphatischen und aromatischen Kohlenwasserstoffen in einem Profil [21]. Für diese Studien führten die Autoren eine ungezielte Analyse von Atemgasproben an Lungenkrebs erkrankter Patienten im Sinne eines Screenings durch und suchten so nach signifikant veränderten Konzentrationen von VOCs. Jedoch konnten sie keine nachvollziehbaren Entstehungswege der meisten von ihnen postulierten Biomarker, insbesondere im Zusammenhang mit dem Metabolismus von Tumorzellen, darlegen.

Bei der Betreuung von an Lungenkrebs erkrankten Patienten wird in der klinischen Praxis neben der Bildgebung oftmals auch die Bestimmung von Tumormarkern aus dem Serum herangezogen (NSE, CEA, Cyfra 21-1). Die Spezifität und Sensitivität dieser Tumormarker ist generell eher gering, daher finden sie in erster Linie Verwendung bei der Verlaufsbeobachtung.

Da sie jedoch, abgesehen von der Bildgebung, die einzigen etablierten Tests auf Lungentumore darstellen, führten wir einen Vergleich dieser Serummarker mit den von uns ermittelten Aldehyd-Biomarkern im Atemgas durch.

Hierbei zeigte sich im Ergebnis eine den Serum-Markern vergleichbare Test-Performance der Atemgas-Marker. Die ermittelten Cut-off Werte für die Serum-Tumormarker wichen von den durch das Zentrallaboratorium des Instituts für klinische Chemie der Universität Rostock angegebenen Werten ab. Dies ist zum einen auf die geringe Grundgesamtheit dieser Studie zurückzuführen. Zum anderen wurden in dieser Studie Patienten mit fortgeschrittener Tumorerkrankung untersucht, die entsprechend hohe Werte für Serum-Tumormarker aufwiesen.

Eine Screening-Methode als nicht-invasiver einfacher Test muss in erster Linie eine hohe Sensitivität bei möglichst hoher negativer Korrektheit aufweisen. So können Patienten selektiert werden, die weiteren invasiven diagnostischen Maßnahmen zugeführt werden. Dabei muss eine hohe positive Korrektheit garantieren, dass möglichst wenig Patienten umsonst den physischen und psychischen Belastungen ausgesetzt werden, die mit der weiteren Diagnostik einhergehen.

Die in Hinsicht auf ein Screening bislang am weitesten entwickelte Methode stellt die engmaschige Verlaufsbeobachtung von Risikopopulationen mittels Low-Dose-CT dar. In den Vereinigten Staaten wurde eine 53 454 Probanden umfassende Studie aufgelegt (National Lung Screening Trial , NLST), in dem Low-Dose-CT und konventionelle Röntgenaufnahmen des Thorax hinsichtlich einer Reduktion der Mortalität untersucht wurden [63]. Im Ergebnis wurde festgestellt, dass ein Screening mittels Low-Dose-CT die Mortalität von Lungenkrebs um 20% zu senken vermag. Der große Nachteil dieser Screeningvariante ist in der schlechten Spezifität zu finden. So ergab die Befundung bei 24.2% der Probanden ein positives Ergebnis. Hiervon waren 96.4% falsch positive Ergebnisse. Zur Erlangung dieser Resultate war zudem eine Strahlenbelastung der Probanden in Höhe einer mittleren effektiven Dosis von 4,5 mSv über 3 Jahre notwendig.

Zusammenfassend erweist sich die Analyse des Atemgases als hoffnungsvoller Ansatz für eine Screening-Methode auf Lungenkrebs.

6. Zusammenfassung

Durch die Kombination von alveolarer Probennahme und einem Derivatisierungsschritt in der Phase der Präkonzentration (SPME-OFD) war ein zuverlässiger Nachweis volatiler Aldehyde im Atemgas bis in den Spurenbereich (pptV) möglich. Die Konzentrationen der Aldehyde in der Ausatemluft lagen im Bereich zwischen 7 pmol/l (161 pptV) im Falle von Butanal (C4) bis hin zu einer maximalen Konzentration von 71 nmol/l (1582 ppbV) im Falle von Formaldehyd (C1).

In einer Pilot-Studie mit 36 Teilnehmern konnten signifikante Unterschiede der Konzentrationen volatiler Aldehyde im Atemgas zwischen Lungenkrebspatienten, gesunden Rauchern und gesunden Nicht-Rauchern nachgewiesen werden. Kontaminationen volatiler Aldehyde in der Raumluft – insbesondere im klinischen Umfeld – waren bei allen Untersuchungen vorhanden und müssen bei den Tests berücksichtigt werden.

Hinsichtlich Acetaldehyd (C2), Propanal (C3), Butanal (C4), Heptanal (C7) sowie Decanal (C10) konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Bei Formaldehyd bestehen signifikante Konzentrationsunterschiede in der Ausatemluft zwischen den einzelnen Gruppen, jedoch sind diese Unterschiede auch bei der Untersuchung der Umgebungsluft zu finden. Da Formaldehyd, Acetaldehyd und Propanal in der Raumluft im klinischen Bereich in hohen Konzentrationen nachweisbar sind, können sie nicht als Markersubstanzen für endogene Prozesse verwendet werden.

Lungenkrebspatienten in fortgeschrittenem Krankheitsstadium atmen signifikant höhere Konzentrationen von Pentanal (C5), Hexanal (C6), Octanal (C8) und Nonanal (C9) ab.

Es konnte des Weiteren gezeigt werden, dass Patienten mit SCLC im Vergleich zu Patienten mit NSCLC höhere Konzentrationen an Hexanal (C6) in der Ausatemluft aufweisen.

Hinsichtlich Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer Korrektheit ergaben sich für die ermittelten Atemgasmarker vergleichbare Ergebnisse zu den in der Praxis zur Verlaufsbeobachtung angewendeten Serummarkern CEA, NSE und Cyfra 21-1.

Zusammenfassend bietet der Nachweis volatiler Aldehyde im Atemgas ein großes diagnostisches Potential im Hinblick auf ein Screeningverfahren für Lungenkrebskrankungen.

7. Thesen

1. Aldehyde in der Ausatemluft sind mittels SPME-OFD und GC/MS vom oberen pptV- (pmol/l) bis in den mittleren ppbV- (nmol/l) Bereich mit guter Reproduzierbarkeit nachweisbar.
2. Umgebungskontaminationen mit Aldehyden müssen bei der Analytik im Spurenbereich quantitativ berücksichtigt werden.
3. Formaldehyd (C1), Acetaldehyd (C2) und Propanal (C3) sind in so hohen Konzentrationen als Kontamination in der Umgebungsluft enthalten, dass eine Verwendung als endogener Marker nicht in Frage kommt.
4. Lungenkrebspatienten exhalieren im fortgeschrittenen Stadium ihrer Erkrankung in der Ausatemluft signifikant höhere Konzentrationen von Pentanal (C5) im Vergleich zu Rauchern und gesunden Kontrollpersonen.
5. Patienten mit fortgeschrittenem Lungenkarzinom atmen signifikant höhere Konzentrationen von Nonanal (C9) ab als gesunde Kontrollpersonen, jedoch besteht keine Signifikanz beim Vergleich mit Rauchern.
6. Lungenkrebspatienten im fortgeschrittenen Krankheitsstadium weisen in ihrer Ausatemluft höhere Konzentrationen von Hexanal (C6) und Octanal (C8) auf als Raucher, jedoch besteht keine Signifikanz im Vergleich zu gesunden Nicht-Rauchern.
7. Das Geschlecht des Patienten hat keinen signifikanten Einfluss auf die Konzentration der exhalierten Aldehyde.
8. Pentanal, Hexanal, Octanal und Nonanal weisen im Vergleich zu den etablierten Serummarkern CEA, NSE und Cyfra 21-1 eine vergleichbare Test-Performance hinsichtlich Spezifität und Sensitivität auf.
9. Patienten mit SCLC weisen höhere Konzentrationen an Hexanal (C6) in der Ausatemluft auf als Patienten mit NSCLC.

8. Literaturverzeichnis

1. Deutschland, Robert Koch-Instituts/Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in, *Krebs in Deutschland*. Gesundheitsberichterstattung des Bundes, 2010. 7. überarbeitete Auflage.
2. Sagerup, C. M., Smastuen, M., Johannessen, T. B., Helland, A., and Brustugun, O. T., *Sex-specific trends in lung cancer incidence and survival: a population study of 40,118 cases*. Thorax. **66**(4): p. 301-7.
3. Kazui, M., Andreoni, K. A., Norris, E. J., Klein, A. S., Burdick, J. F., Beattie, C., Sehnert, S. S., Bell, W. R., Bulkley, G. B., and Risby, T. H., *Breath ethane: a specific indicator of free-radical-mediated lipid peroxidation following reperfusion of the ischemic liver*. Free Radic Biol Med, 1992. **13**(5): p. 509-15.
4. Miller, E. R., 3rd, Appel, L. J., Jiang, L., and Risby, T. H., *Association between cigarette smoking and lipid peroxidation in a controlled feeding study*. Circulation, 1997. **96**(4): p. 1097-101.
5. Wade, C. R. and van Rij, A. M., *In vivo lipid peroxidation in man as measured by the respiratory excretion of ethane, pentane, and other low-molecular-weight hydrocarbons*. Anal Biochem, 1985. **150**(1): p. 1-7.
6. Weitz, Z. W., Birnbaum, A. J., Sobotka, P. A., Zarling, E. J., and Skosey, J. L., *High breath pentane concentrations during acute myocardial infarction*. Lancet, 1991. **337**(8747): p. 933-5.
7. Stone, B. G., Besse, T. J., Duane, W. C., Evans, C. D., and DeMaster, E. G., *Effect of regulating cholesterol biosynthesis on breath isoprene excretion in men*. Lipids, 1993. **28**(8): p. 705-8.
8. Lebovitz, H. E., *Diabetic ketoacidosis*. Lancet, 1995. **345**(8952): p. 767-72.
9. Nelson, N., Lagesson, V., Nosratabadi, A. R., Ludvigsson, J., and Tagesson, C., *Exhaled isoprene and acetone in newborn infants and in children with diabetes mellitus*. Pediatr Res, 1998. **44**(3): p. 363-7.
10. Chen, S., Zieve, L., and 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**(4): p. 628-35.
11. Scislowski, P. W. and Pickard, K., *The regulation of transaminative flux of methionine in rat liver mitochondria*. Arch Biochem Biophys, 1994. **314**(2): p. 412-6.
12. Davies, S., Spanel, P., and Smith, D., *Quantitative analysis of ammonia on the breath of patients in end-stage renal failure*. Kidney Int, 1997. **52**(1): p. 223-8.
13. Simenhoff, M. L., Burke, J. F., Saukkonen, J. J., Ordinario, A. T., and Doty, R., *Biochemical profile of uremic breath*. N Engl J Med, 1977. **297**(3): p. 132-5.
14. Deng, C., Zhang, X., and Li, N., *Investigation of volatile biomarkers in lung cancer blood using solid-phase microextraction and capillary gas chromatography-mass spectrometry*. J Chromatogr B, 2004. **808**(2): p. 269-77.
15. Ebeler, S. E., Clifford, A. J., and Shibamoto, T., *Quantitative analysis by gas chromatography of volatile carbonyl compounds in expired air from mice and human*. J Chromatogr B, 1997. **702**(1-2): p. 211-5.

16. Gordon, S. M., Szidon, J. P., Krotoszynski, B. K., Gibbons, R. D., and O'Neill, H. J., *Volatile organic compounds in exhaled air from patients with lung cancer*. Clin Chem, 1985. **31**(8): p. 1278-82.
17. Machado, R. F., Laskowski, D., Deffenderfer, O., Burch, T., Zheng, S., Mazzone, P. J., Mekhail, T., Jennings, C., Stoller, J. K., Pyle, J., Duncan, J., Dweik, R. A., and Erzurum, S. C., *Detection of lung cancer by sensor array analyses of exhaled breath*. Am J Respir Crit Care Med, 2005. **171**(11): p. 1286-91.
18. Phillips, M., Altorki, N., Austin, J. H., Cameron, R. B., Cataneo, R. N., Kloss, R., Maxfield, R. A., Munawar, M. I., Pass, H. I., Rashid, A., Rom, W. N., Schmitt, P., and Wai, J., *Detection of lung cancer using weighted digital analysis of breath biomarkers*. Clin Chim Acta, 2008. **393**(2): p. 76-84.
19. Phillips, M., Cataneo, R. N., Cummin, A. R., Gagliardi, A. J., Gleeson, K., Greenberg, J., Maxfield, R. A., and Rom, W. N., *Detection of lung cancer with volatile markers in the breath*. Chest, 2003. **123**(6): p. 2115-23.
20. Phillips, M., Cataneo, R. N., Ditkoff, B. A., Fisher, P., Greenberg, J., Gunawardena, R., Kwon, C. S., Tietje, O., and Wong, C., *Prediction of breast cancer using volatile biomarkers in the breath*. Breast Cancer Res Treat, 2006. **99**(1): p. 19-21.
21. Poli, D., Carbognani, P., Corradi, M., Goldoni, M., Acampa, O., Balbi, B., Bianchi, L., Rusca, M., and Mutti, A., *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**: p. 71.
22. Poli, D., Goldoni, M., Cagliari, A., Ceresa, G., Acampa, O., Carbognani, P., Rusca, M., and Corradi, M., *Breath analysis in non small cell lung cancer patients after surgical tumour resection*. Acta Biomed, 2008. **79 Suppl 1**: p. 64-72.
23. Yazdanpanah, M., Luo, X., Lau, R., Greenberg, M., Fisher, L. J., and Lehotay, D. C., *Cytotoxic aldehydes as possible markers for childhood cancer*. Free Radic Biol Med, 1997. **23**(6): p. 870-8.
24. Szatrowski, T. P. and Nathan, C. F., *Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells*. Cancer Res, 1991. **51**(3): p. 794-8.
25. Toyokuni, S., Okamoto, K., Yodoi, J., and Hiai, H., *Persistent oxidative stress in cancer*. FEBS Lett, 1995. **358**(1): p. 1-3.
26. Kong, Q., Beel, J. A., and Lillehei, K. O., *A threshold concept for cancer therapy*. Med Hypotheses, 2000. **55**(1): p. 29-35.
27. Smith, T. A., *Mammalian hexokinases and their abnormal expression in cancer*. Br J Biomed Sci, 2000. **57**(2): p. 170-8.
28. Toyokuni, S., *Oxidative stress and cancer: the role of redox regulation*. Biotherapy, 1998. **11**(2-3): p. 147-54.
29. Hileman, E. O., Liu, J., Albitar, M., Keating, M. J., and Huang, P., *Intrinsic oxidative stress in cancer cells: a biochemical basis for therapeutic selectivity*. Cancer Chemother Pharmacol, 2004. **53**(3): p. 209-19.

30. Miekisch, W., Schubert, J. K., and Noeldorf-Schomburg, G. F., *Diagnostic potential of breath analysis--focus on volatile organic compounds*. Clin Chim Acta, 2004. **347**(1-2): p. 25-39.
31. Poli, D., Goldoni, M., Corradi, M., Acampa, O., Carbognani, P., Internullo, E., Casalini, A., and Mutti, A., *Determination of aldehydes in exhaled breath of patients with lung cancer by means of on-fiber-derivatisation SPME-GC/MS*. J Chromatogr B, 2010. **878**(27): p. 2643-51.
32. Svensson, S., Larstad, M., Broo, K., and Olin, A. C., *Determination of aldehydes in human breath by on-fibre derivatization, solid-phase microextraction and GC-MS*. J Chromatogr B, 2007. **860**(1): p. 86-91.
33. Miekisch W, Schubert JK., *From highly sophisticated analytical techniques to life-saving diagnostics : Technical developments in breath analysis*. TrAC. Trends in analytical chemistry 2006. **25**: p. 665-673
34. Miekisch W, Kischkel S, Sawacki A, Liebau T, Mieth M, Schubert J., *Impact of sampling procedures on the results of breath analysis*. JBR, 2008. **2**(2).
35. www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/sample-preparation/spme.html#spmeanim, Internetseite:SigmaAldrich/Animation-SPME sample adsorption. 2010.
36. Deng, C., Li, N., and Zhang, X., *Development of headspace solid-phase microextraction with on-fiber derivatization for determination of hexanal and heptanal in human blood*. J Chromatogr B, 2004. **813**(1-2): p. 47-52.
37. Deng, C. and Zhang, X., *A simple, rapid and sensitive method for determination of aldehydes in human blood by gas chromatography/mass spectrometry and solid-phase microextraction with on-fiber derivatization*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2004. **18**(15): p. 1715-20.
38. Gilbert, N. L., Guay, M., David Miller, J., Judek, S., Chan, C. C., and Dales, R. E., *Levels and determinants of formaldehyde, acetaldehyde, and acrolein in residential indoor air in Prince Edward Island, Canada*. Environ Res, 2005. **99**(1): p. 11-7.
39. Lovreglio, P., Carrus, A., Iavicoli, S., Drago, I., Persechino, B., and Soleo, L., *Indoor formaldehyde and acetaldehyde levels in the province of Bari, South Italy, and estimated health risk*. J Environ Monit, 2009. **11**(5): p. 955-61.
40. Kushch, I., Schwarz, K., Schwentner, L., Baumann, B., Dzien, A., Schmid, A., Unterkofler, K., Gastl, G., Spanel, P., Smith, D., and Amann, A., *Compounds enhanced in a mass spectrometric profile of smokers' exhaled breath versus non-smokers as determined in a pilot study using PTR-MS*. J Breath Res, 2008. **2**(2): p. 026002.
41. Kamat, P. C., Roller, C. B., Namjou, K., Jeffers, J. D., Faramarzalian, A., Salas, R., and McCann, P. J., *Measurement of acetaldehyde in exhaled breath using a laser absorption spectrometer*. Appl Opt, 2007. **46**(19): p. 3969-75.
42. Shahidi, F., *Headspace volatile aldehydes as indicators of lipid oxidation in foods*. Adv Exp Med Biol, 2001. **488**: p. 113-23.
43. Wahl, H. G., Hoffmann, A., Haring, H. U., and Liebich, H. M., *Identification of plasticizers in medical products by a combined direct thermodesorption--cooled injection system and gas chromatography--mass spectrometry*. J Chromatogr A, 1999. **847**(1-2): p. 1-7.

44. Andreoli, R., Manini, P., Corradi, M., Mutti, A., and Niessen, W. M., *Determination of patterns of biologically relevant aldehydes in exhaled breath condensate of healthy subjects by liquid chromatography/atmospheric chemical ionization tandem mass spectrometry*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2003. **17**(7): p. 637-45.
45. Corradi, M., Folesani, G., Andreoli, R., Manini, P., Bodini, A., Piacentini, G., Carraro, S., Zanconato, S., and Baraldi, E., *Aldehydes and glutathione in exhaled breath condensate of children with asthma exacerbation*. Am J Respir Crit Care Med, 2003. **167**(3): p. 395-9.
46. Corradi, M., Pignatti, P., Manini, P., Andreoli, R., Goldoni, M., Poppa, M., Moscato, G., Balbi, B., and Mutti, A., *Comparison between exhaled and sputum oxidative stress biomarkers in chronic airway inflammation*. Eur Respir J, 2004. **24**(6): p. 1011-7.
47. Soomro, I. N., Holmes, J., and Whimster, W. F., *Predicting prognosis in lung cancer: use of proliferation marker, Ki67 monoclonal antibody*. J Pak Med Assoc, 1998. **48**(3): p. 66-9.
48. Soomro, I. N. and Whimster, W. F., *Growth fraction in lung tumours determined by Ki67 immunostaining and comparison with AgNOR scores*. J Pathol, 1990. **162**(3): p. 217-22.
49. Eggink, M., Wijtmans, M., Ekkebus, R., Lingeman, H., Esch, I. J., Kool, J., Niessen, W. M., and Irth, H., *Development of a Selective ESI-MS Derivatization Reagent: Synthesis and Optimization for the Analysis of Aldehydes in Biological Mixtures*. Anal Chem, 2008.
50. Toyokuni, S., *Molecular mechanisms of oxidative stress-induced carcinogenesis: from epidemiology to oxygenomics*. IUBMB Life, 2008. **60**(7): p. 441-7.
51. Orhan, H., van Holland, B., Krab, B., Moeken, J., Vermeulen, N. P., Hollander, P., and Meerman, J. H., *Evaluation of a multi-parameter biomarker set for oxidative damage in man: increased urinary excretion of lipid, protein and DNA oxidation products after one hour of exercise*. Free Radic Res, 2004. **38**(12): p. 1269-79.
52. Reinheckel, T., Noack, H., Lorenz, S., Wiswedel, I., and Augustin, W., *Comparison of protein oxidation and aldehyde formation during oxidative stress in isolated mitochondria*. Free Radic Res, 1998. **29**(4): p. 297-305.
53. Chen, X., Xu, F., Wang, Y., Pan, Y., Lu, D., Wang, P., Ying, K., Chen, E., and Zhang, W., *A study of the volatile organic compounds exhaled by lung cancer cells in vitro for breath diagnosis*. Cancer, 2007. **110**(4): p. 835-44.
54. Filipiak, W., Sponring, A., Mikoviny, T., Ager, C., Schubert, J., Miekisch, W., Amann, A., and Troppmair, J., *Release of volatile organic compounds (VOCs) from the lung cancer cell line CALU-1 in vitro*. Cancer Cell Int, 2008. **8**: p. 17.
55. Sponring, A., Filipiak, W., Mikoviny, T., Ager, C., Schubert, J., Miekisch, W., Amann, A., and Troppmair, J., *Release of volatile organic compounds from the lung cancer cell line NCI-H2087 in vitro*. Anticancer Res, 2009. **29**(1): p. 419-26.
56. Smith, D., Wang, T., Sule-Suso, J., Spaniel, P., and El Haj, A., *Quantification of acetaldehyde released by lung cancer cells in vitro using selected ion flow tube mass spectrometry*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2003. **17**(8): p. 845-50.
57. Balicki, D., *Moving forward in human mammary stem cell biology and breast cancer prognosis using ALDH1*. Cell Stem Cell, 2007. **1**(5): p. 485-7.

58. Chang, J. W., Jeon, H. B., Lee, J. H., Yoo, J. S., Chun, J. S., Kim, J. H., and Yoo, Y. J., *Augmented expression of peroxiredoxin I in lung cancer*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **289**(2): p. 507-12.
59. Patel, M., Lu, L., Zander, D. S., Sreerama, L., Coco, D., and Moreb, J. S., *ALDH1A1 and ALDH3A1 expression in lung cancers: correlation with histologic type and potential precursors*. Lung Cancer, 2008. **59**(3): p. 340-9.
60. Phillips, M., Cataneo, R. N., Greenberg, J., Gunawardena, R., Naidu, A., and Rahbari -Oskoui, F., *Effect of age on the breath methylated alkane contour, a display of apparent new markers of oxidative stress*. J Lab Clin Med, 2000. **136**(3): p. 243-9.
61. Phillips, M., Cataneo, R. N., Greenberg, J., Gunawardena, R., and Rahbari-Oskoui, F., *Increased oxidative stress in younger as well as in older humans*. Clin Chim Acta, 2003. **328**(1-2): p. 83-6.
62. Phillips, M., Greenberg, J., and Cataneo, R. N., *Effect of age on the profile of alkanes in normal human breath*. Free Radic Res, 2000. **33**(1): p. 57-63.
63. Aberle, D. R., Adams, A. M., Berg, C. D., Black, W. C., Clapp, J. D., Fagerstrom, R. M., Gareen, I. F., Gatsonis, C., Marcus, P. M., and Sicks, J. D., *Reduced lung-cancer mortality with low-dose computed tomographic screening*. N Engl J Med, 2011. **365**(5): p. 395-409.

9. Anhang

9.1. Selbstständigkeitserklärung

Ich versichere hiermit, die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und ohne fremde Hilfe verfasst sowie keine außer der von mir angegebenen Hilfsmitteln und Quellen dazu verwendet zu haben. Die den benutzten Werken inhaltlich und wörtlich entnommenen Stellen sind als solche gekennzeichnet.

Güstrow, den 10.02.2012

Christian Loeseken

9.2. Originalpublikationen und Tagungsbeiträge

■ Fuchs P, Loesken C, Schubert JK, Miekisch W. (2007)

Exhaled aldehydes as markers of disease in critically ill patients. ERS 2007, Stockholm (Vortrag).

■ Straker E, Fuchs P, Loesken C, Miekisch W, Schubert JK. (2009)

Exhaled aldehydes as markers of disease in lung cancer patients. ERS 2009, Wien (E-communication).

■ Fuchs P, Loesken C, Schubert JK, Miekisch W. (2010)

Breath gas aldehydes as biomarkers of lung cancer. Int J Cancer 2010; 126(11):2663–2670.

■ Kamysek S, Fuchs P, Schwoebel H, Roesner JP, Kischkel S, Wolter K, Loesken C, Schubert JK, Miekisch W. (2011)

Drug detection in breath: effects of pulmonary blood flow and cardiac output on propofol exhalation. Anal Bioanal Chem 2011;401(7): 2093-102

9.3. Danksagung

Ich möchte mich bei Prof. Dr. med. Dipl. Chem. Jochen Schubert für die freundliche Überlassung des Themas bedanken. Trotz seiner Verpflichtungen im alltäglichen klinischen Betrieb gelang es ihm, eine intensive Betreuung meiner Arbeit zu gewährleisten.

Ein großer Dank gilt Dr. Dipl. Chem. Wolfram Miekisch für seine ständige Ansprechbarkeit bei Problemen, seinen kompetenten Rat sowie den zahlreichen anregenden Diskussionen und hochinteressante Einblicke in die komplexe Welt der analytischen Chemie.

Ein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Dipl. Chem. Patricia Fuchs für die kompetente Einarbeitung in die analytische Methode, die enge Zusammenarbeit und die stete Begleitung meiner Arbeit. Ihre Motivationskünste sowie ihre geduldige, jedoch nicht minder fordernde Betreuung haben einen großen Anteil insbesondere an der Fertigstellung dieser Dissertation.

Als besonders wertvoll empfand ich, dass ich bei der Entwicklung und Verfolgung meiner eigenen Ideen und Theorien stets unterstützt und konstruktiv begleitet wurde.

Herrn Dr. Dipl. Chem. Günter Merkel danke ich herzlich für die Bereitstellung der Räumlichkeiten sowie seinen überaus freundlichen und kompetenten Rat bei technischen Problemen.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Atemgasanalytik danke ich herzlich für die jahrelange hervorragende Zusammenarbeit. Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. med. Gabriele Nöldge-Schomburg und den Mitarbeitern der Klinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie der Universität Rostock für ihre Unterstützung.

Dr. med. Annika Sawacki und Dr. med. Tina Görl gilt mein Dank für die Einarbeitung in die Probennahme und für die gute Zusammenarbeit bei der Durchführung der klinischen Studien.

Abschließend gilt mein ganz besonderer Dank meinen Eltern, die mir mein Hochschulstudium sowie die Promotion durch jahrelange liebevolle Unterstützung erst ermöglicht haben.

9.4. Lebenslauf

Christian Loesken

Bleicherstraße 8

18273 Güstrow

Persönliche Daten

- geboren am 16.09.1983 in Velbert
- ledig
- Staatsangehörigkeit deutsch

Schulische Laufbahn

- Grundschule Grasleben 1990-1994
- Orientierungsstufe Helmstedt 1994-1996
- Gymnasium Julianum Helmstedt 1996-2000
- Gymnasium Beetzendorf 2000-2003
- Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife 05/2003

Studium

- Aufnahme des Studiums der Humanmedizin an der Universität Rostock 10/2003
- Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 09/2005
- Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 12/2009

Berufliche Laufbahn

- Seit dem 01.02.2010 Arzt im Common Trunk der Weiterbildung zum Facharzt für Unfallchirurgie und Orthopädie, KMG Klinikum Güstrow