

**Diplomarbeit**

**SUCHE NACH POTENTIELLEN TUMORMARKERN IM  
KONDENSAT DER AUSATEMLUFT**

eingereicht von

**Sabine Elisabeth Rinner**

Mat.Nr.: 0433385

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktorin der gesamten Heilkunde**

**(Dr.<sup>in</sup> med. univ.)**

an der

**Medizinischen Universität Graz**

ausgeführt an der

**Universitätsklinik für Innere Medizin**

Abteilung Pulmonologie

unter der Anleitung von

**Dr. med. univ. Christoph Wohlkönig**

**Univ.-Prof. Dr. med. Horst Olschewski**

## EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

*Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.*

*Graz, Juli 2011*

# DANKSAGUNG

MEIN GRÖSSTER UND AUFRICHTIGER DANK GILT...

**...HERRN DR. MED. UNIV. CHRISTOPH WOHLKÖNIG**

für seine herzliche und großartige Betreuung, seine kompetente und tatkräftige Unterstützung in allen Situationen, seine motivierenden und aufmunternden Worte und seine unerschütterliche Geduld.

**...HERRN UNIV.-PROF. DR. MED. HORST OLSCHESKI**

für seine professionelle Beratung und seine ausgezeichnete Supervision.

**...DEM GESAMTEN TEAM DER UNIV.-KLINIK FÜR PULMONOLOGIE**

für die großartige Zusammenarbeit und das freundliche Entgegenkommen.

**...MEINEN WUNDERBAREN ELTERN, DIE IMMER AN MICH GEGLAUBT HABEN.**

Ich danke Euch für Euer Verständnis und Euren Rückhalt in allen Phasen meines Lebens und für Eure bedingungslose Unterstützung.  
Ich danke Euch für Eure liebevollen Worte, die mir immer wieder neue Kraft gegeben haben.  
Ich danke Euch, dass Ihr mich so sehr geprägt habt.  
Doch vor allem danke ich Euch für Eure Liebe.

**...MEINEM UNERSETZLICHEN BRUDER MARKUS.**

Ich bin glücklich und dankbar, dich an meiner Seite zu haben.

**...MEINEN GELIEBTEN GROSSELTERN.**

Danke für Euer warmherziges Wesen und Eure liebevolle Unterstützung.

**...MEINEN FANTASTISCHEN FREUNDEN.**

Danke, dass ihr mit mir durch alle Höhen und Tiefen gegangen seid.  
Ihr habt meine Studienzeit zu einem unvergesslichen Erlebnis gemacht.

# ZUSAMMENFASSUNG

**Hintergrund:** Bronchialkarzinome führen weltweit die Liste der malignomassoziierten Sterbefälle an. Die Ursache für die schlechte Prognose des Bronchialkarzinoms liegt vor allem darin begründet, dass sich bis dato noch kein adäquates Screeningverfahren etablieren konnte und die Diagnosestellung zumeist erst in einem weit fortgeschrittenen Erkrankungsstadium erfolgt. Die Detektion von Biomarkern im Kondensat der Ausatemluft (EBC) könnte eine neue, völlig risikofreie und non-invasive Möglichkeit der Früherkennung von Bronchialkarzinomen eröffnen. Das Ziel dieser klinisch-explorativen Studie war es, mittels kostenminimierter analytischer Verfahren die Existenz der noch weitgehend unerforschten, aber prognostisch relevanten Biomarker Carboanhydrase IX (CAIX), basic fibroblast growth factor (FGF-b) und Laktatdehydrogenase (LDH) im EBC von LungenkrebspatientInnen zu detektieren.

**Methodik:** Im Zeitraum von einem Jahr wurden an der Universitätsklinik für Innere Medizin, Abteilung für Lungenkrankheiten des LKH Graz, EBC-Proben von 20 PatientInnen mit histologisch gesicherten primären Lungenkarzinomen (13 NSCLC, 6 SCLC, 1 CUP) vor Therapiebeginn akquiriert und mit dem EBC von 20 bezüglich Alter und Geschlecht gematchten Kontrollen verglichen. Ziel der Studie war es, zu prüfen, ob ein signifikanter Unterschied der Konzentrationen von CAIX, FGF-b und LDH zwischen den beiden Gruppen besteht. Unmittelbar nach der Akquirierung erfolgte zusätzlich die Vermessung des pH-Wertes des Kondensats. Bis die entsprechende Probenanzahl zur Auswertung akquiriert werden konnte, wurde das EBC-Material bei  $-80^{\circ}$  tiefgefroren. Der analytische Nachweis der CAIX und des FGF-b erfolgte mittels ELISA, die LDH-Aktivität wurde mit einem enzymatisch-colorimetrischen Test detektiert.

**Ergebnisse:** Mittels der genannten Methodik konnte weder CAIX noch FGF-b in den untersuchten Proben nachgewiesen werden. Für die LDH-Aktivität ergab sich eine Diskrepanz der gemessenen Werte zu Gunsten des respiratorisch unauffälligen Kontrollkollektivs ( $p < 0,001$ ). Bei der Analyse des pH-Wertes konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen dokumentiert werden. Allerdings zeigte sich bei den PatientInnen mit NSCLCs eine signifikante Erhöhung

der pH-Werte im Tumorstadium IV, verglichen mit weniger fortgeschrittenen Stadien. Bei den PatientInnen mit SCLCs konnte keine derartige Korrelation nachgewiesen werden.

**Schlussfolgerung:** Trotz ähnlicher Probengewinnung und Analyseverfahren im Vergleich zu anderen Studien, konnten in der vorliegenden Arbeit keine relevanten Konzentrationen der untersuchten Tumormarker nachgewiesen werden. Die aufwendigere Probenaufarbeitung in anderen Studien hätte durch die empfindlicheren Analyseverfahren in dieser Studie ausgeglichen werden müssen. Es bleibt also abzuwarten, ob sich die Suche nach Tumormarkern im Atemkondensat mittels einfachen Methoden, als Verfahren für die Frühdiagnostik von Lungentumoren etablieren kann.

## ABSTRACT

**Background:** Lung cancer is the leading cause of cancer death worldwide. The poor prognosis of this cancer partly results from the absence of any adequate screening, thus, in the majority of cases, the diagnosis can only be confirmed at extensive stages of disease. The detection of markers in the exhaled breath condensate (EBC) would provide a new option of earlier lung cancer diagnosis by a non-invasive and completely risk-free procedure. The aim of the present exploratory study was to investigate the presence of the potential tumor markers carbonic anhydrase IX (CAIX), basic fibroblast growth factor (FGF-b) and lactate dehydrogenase (LDH) in the EBC of patients with lung cancer by using cost-efficient methods.

**Methods:** Within one year we acquired EBC of 20 patients with primary lung cancer (13 NSCLC, 6 SCLC, 1 CUP) at the division of pulmonology at LKH Graz and compared them with EBC of 20 healthy, age- and gender-matched controls. EBC from patients was collected before any treatment. The intention of the study was to evaluate differences in the CAIX-, FGF-b- and LDH-levels between lung cancer patients and the control group. Additionally, pH-levels were measured directly after EBC collection. Until all EBC-samples were acquired, the samples were stored at -80°C. The analysis of CAIX- and FGF-b-levels were assessed by ELISA-kits, LDH-activity was done by an enzymatic-colorimetric assay.

**Results:** Based on the aforementioned analytical methods, no CAIX and FGF-b was detected in the EBC-samples. Concerning the LDH-activity, we observed a significant difference ( $p < 0,001$ ) between the compared groups. pH was not different between patients and healthy controls. However, the correlation between different stages of NSCLCs indicated a significant pH-elevation in stage IV patients compared with less advanced stages of disease. By contrast, such a correlation was not found in SCLC patients.

**Conclusion:** Despite comparable acquiring- and analytical methods as compared to other studies, in this study no relevant concentrations of the investigated tumor

markers could be detected. The more elaborated sample processing in the other studies should have been equalized by the more sensitive analytical methods in the present study. Therefore it remains to be seen, if searching for tumor markers in EBC using simple methodology, turns out to be a suitable tool for early diagnosis of lung cancer.

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1 EPIDEMIOLOGIE DES LUNGENKARZINOMS</b>	<b>1</b>
<b>1.2 ÄTIOLOGIE DES LUNGENKARZINOMS</b>	<b>3</b>
<b>1.3 PATHOGENESE DES LUNGENKARZINOMS</b>	<b>5</b>
<b>1.4 KLASSIFIZIERUNG DES LUNGENKARZINOMS</b>	<b>9</b>
1.4.1 Histologie	9
1.4.2 Immunhistochemische Marker	11
<b>1.5 DIAGNOSTIK</b>	<b>12</b>
1.5.1 Klinische Symptomatik	12
1.5.2 Bildgebende Diagnostik	12
1.5.3 Diagnosesicherung	13
<b>1.6 PROBLEMSTELLUNG</b>	<b>14</b>
1.6.1 Prognose des Lungenkarzinoms	14
1.6.2 Kondensat der Ausatemluft	15
1.6.3 Tumorwachstum und Hypoxie	17
1.6.4 Potentielle Tumormarker	19
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>24</b>
<b>2.1 PATIENT/INNENKOLLEKTIV</b>	<b>24</b>
<b>2.2 VERWENDETE GERÄTE UND BENÖTIGTE DATEN</b>	<b>26</b>
2.2.1 Aufklärungsbogen	26
2.2.2 EBC-Akquirierung	26
2.2.3 Messung des pH und des pCO <sub>2</sub>	29
2.2.4 Erhebung klinischer Daten	29

2.2.5 Statistische Auswertung	29
<b>2.3 EXAKTER ARBEITSABLAUF DER STUDIE</b>	<b>30</b>
<b>2.4 ANALYSE DER EBC-PROBEN</b>	<b>33</b>
2.4.1 Nachweis der Carboanhydrase IX	35
2.4.2 Nachweis des basic fibroblast growth factor	39
2.4.3 Nachweis der Laktatdehydrogenase	43
<b>3. ERGEBNISSE</b>	<b>46</b>
3.1 CAIX-AUSWERTUNG	46
3.2 FGF-b-AUSWERTUNG	49
3.3 LDH-AUSWERTUNG	51
3.4 AUSWERTUNG DER BGA	57
3.4.1 Analyse des pH-Wertes	58
3.5 AUSWERTUNG KLINISCHER DATEN	60
<b>4. DISKUSSION</b>	<b>67</b>
<b>5. CONCLUSIO</b>	<b>76</b>
<b>6. INDEX</b>	<b>77</b>
6.1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS UND GLOSSAR	77
6.2 ABBILDUNGSVERZEICHNIS	79
6.3 LITERATURVERZEICHNIS	81
<b>7. APPENDIX</b>	<b>86</b>
7.1 AUFKLÄRUNGSBOGEN	86
7.2 CURRICULUM VITAE	87

# 1. EINLEITUNG

## 1.1 EPIDEMIOLOGIE DES LUNGENKARZINOM

War das Bronchialkarzinom bis Beginn des 20. Jahrhunderts noch zu den selten auftretenden Erkrankungen zu rechnen, so stieg die Zahl der Neuerkrankungen in den folgenden Jahrzehnten rapide an. Heute zählt es zu den häufigsten Neoplasien weltweit, wobei im Jahre 2008 rund 1,62 Millionen Neuerkrankungen registriert wurden (1).

Darüber hinaus verursacht keine andere tumoröse Erkrankung weltweit so viele malignomassoziierte Todesfälle wie das Bronchialkarzinom.

Die geographische Verteilung des Auftretens dieser malignen Neubildung korreliert stark mit dem Zigarettenkonsum, der nach wie vor für gut 85% der Bronchialkarzinome ursächlich verantwortlich ist.

Die höchsten Inzidenzraten finden sich in der westlichen Welt und erreichen ihren Gipfel mit einer Häufigkeit von >70 Neuerkrankungen/100000/Jahr bei der männlichen schwarzen Bevölkerung der Vereinigten Staaten, dicht gefolgt von der weißen männlichen Bevölkerung Nord- und Mitteleuropas, sowie der ehemaligen UdSSR. In Ländern wie Zentralafrika oder Indien verhalten sich die Inzidenzraten nach wie vor niedrig.

Auch wenn der Anteil der an Lungenkrebs erkrankten Männer jenen der Frauen aktuell noch übersteigt, so führt der in den letzten Jahrzehnten zunehmende Tabakkonsum der Frauen zu einer stetigen Zunahme an Erkrankungsfällen in der weiblichen Bevölkerung, mit einem Häufigkeitsgipfel in den USA (2).

2008 wurden in Österreich 4141 Neuerkrankungen registriert, was 12% aller Malignome ausmacht. Bei Männern rangiert die Inzidenz des Lungenkarzinoms hinter dem Prostatakarzinom auf Platz zwei aller malignen Neubildungen, bei Frauen auf Platz drei hinter dem Mamma- und Kolonkarzinom.

Bei Krebslokalisationen, die mit dem Rauchen assoziiert sind, ist das Erkrankungsrisiko der Männer seit jeher ungleich höher als das der Frauen. Beim Lungenkrebs ergab sich allerdings ein stetig wachsender Frauenanteil. Während 1998 auf 100 an Lungenkrebs erkrankte Männer nur 41 an Lungenkrebs erkrankte Frauen kamen, entfielen 2008 bereits 54 Frauen auf 100 erkrankte Männer. Bei den Männern war ein sinkendes und bei den Frauen ein steigendes Erkrankungsrisiko festzustellen.

Zuletzt betrug das Risiko, bis zum 75. Lebensjahr an Lungenkrebs zu erkranken 4,7% für die österreichischen Männer und 2,1% für die österreichischen Frauen.

In Bezug auf die malignomassoziierten Mortalitätsraten nimmt der Lungenkrebs bei den Frauen mit rund 13% bereits den zweiten Platz hinter dem Brustkrebs, der mit 16% immer noch die häufigste weibliche Krebstodesursache darstellt ein, gefolgt vom Darmkrebs mit 11%.

Gut ein Fünftel aller männlichen Krebssterbefälle (rund 2400 Männer) war österreichweit im Jahr 2008 auf Lungenkrebs zurückzuführen.

Lungenkrebs ist damit bei den Männern die häufigste zum Tode führende Krebserkrankung (3).

## 1.2 ÄTIOLOGIE DES LUNGENKARZINOMS

Den ätiologisch wichtigsten Faktor für die Entstehung des Bronchialkarzinoms stellt mit zirka 85% das inhalative Zigarettenrauchen dar. Im Zigarettenrauch sind mindestens 60 Karzinogene nachweisbar, wobei insbesondere polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) und Nitrosamine für die Entstehung des Bronchialkarzinoms eine entscheidende Rolle spielen. Darüber hinaus wurden zahlreiche andere Tumorpromotoren und Co-Karzinogene im Zigarettenrauch entdeckt, die in verschiedenen Tierstudien zur Entwicklung bösartiger Neubildungen der Lunge führten (4).

Ein klarer Zusammenhang besteht zwischen dem Lungenkrebsrisiko und der Anzahl der täglich gerauchten Zigaretten, sowie der Dauer des Zigarettenkonsums in Jahren. Entscheidend für die Höhe des Krebsrisikos sind hierbei die Packungsjahre (=Zahl der täglich gerauchten Packungen x Raucherjahre = „pack years = py), wobei 40 py das Risiko an Lungenkrebs zu erkranken um das 10-fache erhöhen (5).

Auch der kausale Zusammenhang zwischen der Exposition gegenüber Passivrauch und der Genese eines Bronchialkarzinoms ist ausreichend belegt. In einer aktuellen prospektiven Studie stellte sich heraus, dass bei Passivrauchbelastung am Arbeitsplatz das Risiko ein Lungenkarzinom zu entwickeln, gegenüber den Nichtexponierten, um 20-30% erhöht ist (6).

Neben der dramatischen Einflussnahme des Zigarettenkonsums auf die Genese des Bronchialkarzinoms, spielen auch weitere Faktoren, wie umweltbezogene Karzinogene oder berufsbedingte Exposition gegenüber krebserregenden Substanzen eine wichtige, wenn auch mit einem Anteil von etwa 7% an der Gesamtheit der auslösenden Faktoren, eine ätiologisch eher untergeordnete Rolle. Als Beispiel hierfür seien erneut die PAKs zu nennen, die durch unvollständige Verbrennung organischer Materie frei werden (Kohle, Heizöl, Kraftstoffe, Tabak etc.).

Ein besonderes Risikopotential birgt die Tätigkeit in der Kohlegasproduktion, wobei die Belastung durch verschiedene inhalative PAKs besonders hoch ist. Den wichtigsten Vertreter dieser Gruppe stellt hierbei das Benzo(a)pyren dar, welches

von der IARC zu einem K1 Stoff, das heißt gesichert humankanzerogen, klassifiziert wurde. Tätigkeiten in der Kohlevergasung, Koksproduktion und Steinkohleteerdestillation und –verarbeitung sowie die Arbeit als Schornsteinfeger gelten aufgrund der Exposition gegenüber Benzo(a)pyren als krebbsgefährdend.

Ein nicht unerheblicher Prozentsatz der umwelt- und berufsbedingten Risikofaktoren für die Entstehung eines Lungenkarzinoms entfällt auf die Belastung durch verschiedene Asbestfasern, welche in den verschiedensten Bereichen der Bauindustrie, der Textilindustrie oder der chemischen Industrie zur Anwendung kamen. Durch die oft jahrzehntelange Latenzzeit bis zum Ausbruch der Erkrankung, wurden die ersten asbestassoziierten Lungenkarzinome erst um das Jahr 1975 registriert, in den darauf folgenden Jahren kam es zu einem rasanten Anstieg der Erkrankungsfälle.

Durch die Gefahrenstoffverordnungen aus den Jahren 1990 und 1993, sowie durch die im gleichen Jahr durchgesetzte Chemikalienverbotsverordnung, wurde ein durchgängiges Verbot für die Verwendung und Herstellung asbesthaltiger Produkte verhängt (7).

Als besonders dramatisch hinsichtlich der Gefahr an Lungenkrebs zu erkranken, präsentiert sich die Kombination aus Zigarettenrauchinhalation mit beruflicher oder umweltbezogener Belastung sowie mit genetischer Disposition.

Das Risiko an Lungenkrebs zu erkranken, ist bei Personen, bei denen ein Elternteil erkrankte, um das Doppelte bis 3-fache erhöht (7). Durch verschiedenste, teilweise noch völlig ungeklärte Prozesse, kommt es bei einer familiären Vorbelastung zu einer beschleunigten Akkumulation von Mutationen und damit zu einem erhöhten Potential für eine maligne Entartung (8).

## 1.3 PATHOGENESE DES LUNGENKARZINOMS

Der Entstehung des Lungenkarzinoms gehen zahlreiche mehr oder minder geklärte molekularpathologische Prozesse voraus. Ihnen allen ist gemein, dass mutagene Noxen, allen voran inhalative Bestandteile des Tabakrauchs, zu Veränderungen der zellulären DNA führen, wobei die Genese eines Karzinoms über verschiedene Schritte erfolgt, die eine Akkumulation genetisch abnormer Zellen voraussetzen.

Die Entwicklung einer gesunden Lungenzelle zu einer invasiven Krebszelle bedarf eines komplexen Zusammenspiels bestimmter genetischer Alterationen, die innerhalb der Zelle ein malignes Wachstumspotential initiieren. Dadurch werden die normalen Vorgänge innerhalb des Zellzyklus gestört und somit die Genese einer malignen Entität in Gang gesetzt.

Durch verschiedene Hybridisierungsverfahren ließen sich innerhalb der histologisch verschiedenen Lungenkarzinomzellen charakteristische chromosomale Imbalancen, sowie Deletionen, Verluste der Heterozygotie bestimmter Allele, und ähnliche strukturelle Veränderungen des Erbguts identifizieren (18).

Viele der im Tabakrauch enthaltenen karzinogenen Substanzen können den genetischen Code einer Lungenzelle so verändern, dass der Grundstein für eine maligne Proliferation gelegt wird.

Während über die kanzerogene Wirkung des Nikotins selbst in der Literatur noch weitgehend Uneinigkeit besteht (9), ist unbestritten, dass die Nikotinabhängigkeit ursächlich dafür verantwortlich ist, dass Raucher sich die im Tabakrauch enthaltenen, gesichert karzinogenen Substanzen weiter zuführen. Durch diese Tatsache kann die Brücke zwischen Nikotinabhängigkeit und der Genese des Bronchialkarzinoms geschlagen werden (siehe Abb. 1).

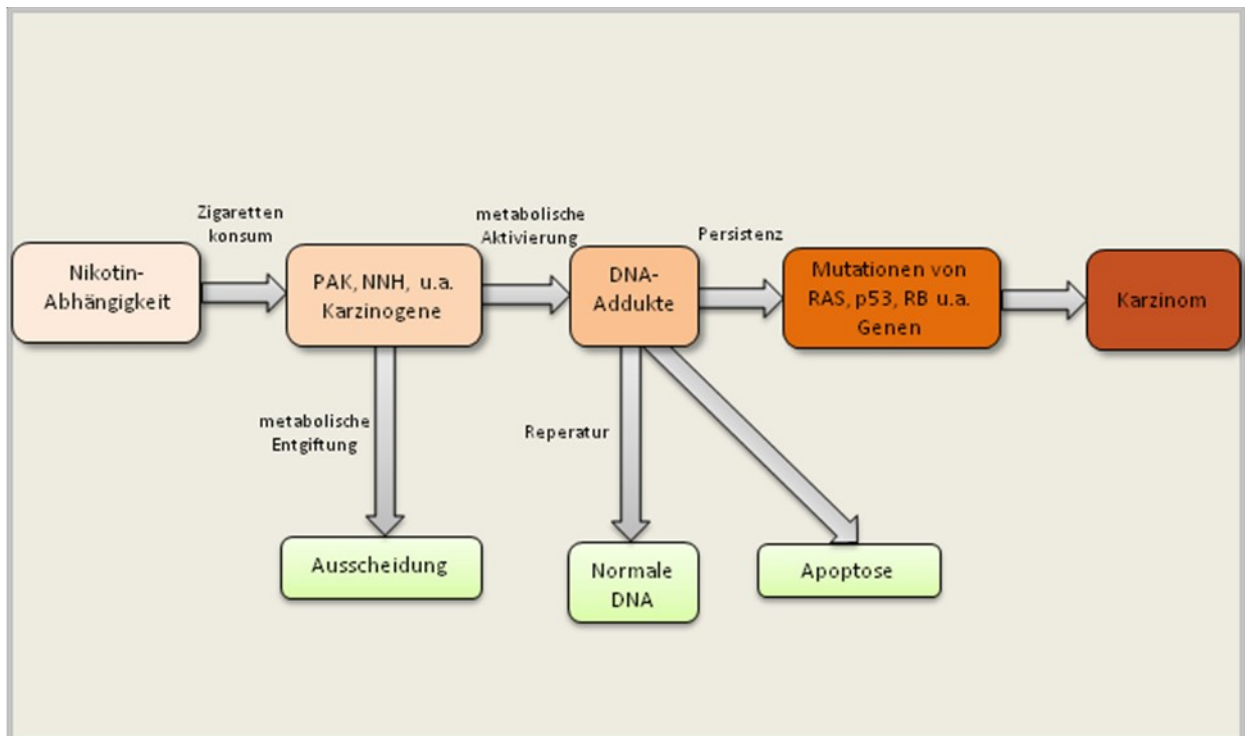


Abb. 1 Zusammenhang zwischen Nikotinabhängigkeit und der Entwicklung von Lungenkarzinomen über die Mutation relevanter Gene (modifiziert nach Hecht et al (4))

Im Zigarettenrauch finden sich, neben zahlreichen Bestandteilen, deren Einfluss auf die durch DNA-Schädigung initiierte Karzinogenese noch weitgehend unerforscht ist, auch über 60 verschiedene Substanzen, die durch die IARC als gesichert karzinogen klassifiziert wurden. Es handelt sich hierbei um eine heterogene Gruppe verschiedenster Chemikalien, wie beispielsweise polyzyklische Kohlenwasserstoffe, aromatische Amine oder das Tabak-spezifische Nitrosamin NNK (10).

Die inhalierten Karzinogene werden durch verschiedenste biochemische Vorgänge, initial durch die Oxigenierung durch CYP 450-Enzyme, in wasserlösliche, ausscheidungsfähige Metaboliten umgewandelt.

Durch diese Entgiftungsvorgänge entstehen allerdings auch reaktive Zwischenprodukte, welche sich kovalent an die DNA binden (11). Als Bindungsstellen für die Metaboliten dienen hierbei in erster Linie die Basen Guanin und Adenin. Die durch diese Bindung entstehenden Moleküle werden als DNA-Addukte bezeichnet (12).

Diese DNA-Addukte können in weiterer Folge die Regulationsmechanismen innerhalb des normalen Zellzyklus durch Änderung der Nukleotidbasensequenz stören. In Abhängigkeit davon, an welchem Genlokus die Mutation stattfindet, können die DNA-Addukte zur Aktivierung von Protoonkogenen führen, oder aber auch die Expression von Tumorsuppressorproteinen inhibieren (13).

Die metabolisch aktivierte Form des Benzo(a)pyrens kann beispielsweise sowohl durch die Bildung von DNA-Addukten die Nukleotidsequenz verändern und somit die empfindlichen Regulationsmechanismen innerhalb des Zellzyklus stören, als auch über Einzelstrangbrüche zu direkter Strukturschädigung der DNA führen.

Allerdings muss erwähnt werden, dass weniger als 20% aller Raucher an Lungenkrebs erkranken (14). Dem zu Folge können nur jene Mutationen im Erbgut zur Karzinogenese beitragen, die den Reparaturmechanismen innerhalb der Zelle beziehungsweise ihrer Zerstörung durch Apoptose entkommen können.

Durch karzinogenvermittelte Punktmutationen der Nukleotidsequenz am KRAS-Gen kommt es beispielsweise zur Aktivierung des k-ras Onkogens (4). Es handelt sich hierbei um ein G-Protein, welches eine Signalkette initiiert, die in weiterer Folge zur Exkretion von Wachstumsfaktoren führt. Als GTP-bindendes Protein übernimmt k-ras somit die Funktion eines molekularen Schalters, der je nach zellulärem Bedarf Wachstumsfaktoren exprimiert. Für die Inaktivierung dieser GTP-gebundenen aktiven Form ist die enzymabhängige Umwandlung in die GDP-Form des Proteins erforderlich.

Durch die Karzinogen-induzierte Punktmutation am KRAS-Gen verliert dieses Protein allerdings die Empfindlichkeit gegenüber dem inaktivierenden Enzym, sodass es dauerhaft aktiviert bleibt und zur Überexpression von Wachstumsfaktoren führt.

Als Beispiel für die schädigende Einflussnahme der DNA-Addukte auf Tumorsuppressorgene sei das Beispiel des TP53-Gens genannt.

Mutationen des besagten Gens sind in rund 70% der kleinzelligen Lungenkarzinome und in 50% der nicht-kleinzelligen Lungenkarzinome nachweisbar und stellen damit die häufigste Mutation bei allen histologischen Formen des Bronchialkarzinoms dar (15).

In einer gesunden Zelle fungiert das, durch das besagte Gen transkribierte, p53-Protein als Aktivator für eine Kaskade von Prozessen, die bei DNA-Schädigung die Apoptose der betroffenen Zelle vermitteln. Darüber hinaus verhindert dieses Protein auch die Replikation geschädigter DNA, indem es den Übergang von der G1- in die S-Phase verhindert, sodass die Kumulation von Zellen mit geschädigtem Erbgut vermieden wird.

Mutationsbedingte Veränderungen im P53 Gen auf Chromosom 17p13.1 führen zur Dysfunktion des zu codierenden Proteins, sodass sich geschädigte Zellen ungehindert teilen und auch der Apoptose entgehen können.

Durch diese Vorgänge kommt es zur Anhäufung entarteter Zellen im Körper, die an der Genese eines malignen Prozesses ursächlich beteiligt sind.

Ähnliche, durch inhalative Karzinogene getriggerte, pathologische Auswirkungen auf die den Zellzyklus regulierenden Gene, wie unter anderen auf das Retinoblastom-Gen, wurden als kausale Ursache für das Bronchialkarzinom beschrieben (16). Zum Beispiel kommt es durch die 13q-Deletion, die häufig beim kleinzelligen Bronchialkarzinom nachweisbar ist, konsekutiv zur Inaktivierung des RB-Gens, wodurch der Zellzyklus aktiviert wird.

Durch die Inhalation von Zigarettenrauch wird der Körper nicht nur einem Konglomerat aus karzinogenen Substanzen ausgesetzt, sondern es wird darüber hinaus auch die Bildung freier Radikale induziert.

Durch verschiedene Reaktionen schädigen diese reaktiven Sauerstoffspezies neben zahlreichen anderen Molekülen auch die DNA, woraus Strangbrüche oder Basenmodifikationen resultieren können, die ihrerseits wieder die sensiblen Abläufe innerhalb des Zellzyklus beeinflussen (17).

## 1.4 KLASSIFIZIERUNG DES LUNGENKARZINOMS

### 1.4.1 Histologie

Die alleinige, in der Klinik lange Zeit gebräuchliche Unterteilung der Bronchialkarzinome in kleinzellige (SCLC) und nicht-kleinzellige (NSCLC) Karzinome erscheint, aufgrund der Tatsache, dass die einzelnen Tumorentitäten sich nicht nur innerhalb ihrer histomorphologischen Aspekte, sondern auch in ihrem genetischen Aberrationsmuster, der Genexpression sowie dem Ploidenniveau unterscheiden, obsolet (18).

Die histologische Unterteilung der malignen Lungentumoren umfasst nach der 2010 revidierten WHO-Klassifikation kleinzellige Bronchialkarzinome, sowie Adeno-, Plattenepithel- und großzellige Bronchialkarzinome, die jeweils noch nach der phänotypischen Ausprägung der am häufigsten vorkommenden Zellen näher klassifiziert werden.

Am häufigsten findet man Plattenepithelkarzinome, die Zahl der prognostisch schlechteren kleinzelligen Lungenkarzinome erwies sich in den letzten Jahren als rückläufig und hält bei etwa 15% aller malignen Lungentumoren (5).

Durch die Korrelation neuer Erkenntnisse über molekularbiologische und genetische Vorgänge mit den bekannten histomorphologischen und klinischen-radiologischen Aspekten, entwickelten die *International Agency for Study on Lung Cancer* (IASLC) und die *American Thoracic Society* (ATS) unter Mitarbeit der *European Respiratory Society* (ERS) eine neue interdisziplinäre Klassifikation des Adenokarzinoms (siehe Abb. 2).

Diese unterscheidet nun, neben der entsprechenden dominanten histologischen Wachstumsmuster, auch zwischen präinvasiven Läsionen mit ausgezeichneter Prognose, minimal-invasiven Karzinomen mit einer maximalen Invasionstiefe von 5 mm und charakteristischer Morphologie in der CT (Computertomographie), sowie dem invasiven Adenokarzinom (19).

Daneben wird noch zwischen sarkomatoiden und adenosquamösen Karzinomen, sowie Karzinoideumoren, jeweils wieder in den verschiedenen Varianten der zellulären Ausprägung, unterschieden.

Weiters sei zu erwähnen, dass in etwa 50% der pathologischen Präparate mehr als ein histologischer Zellsubtypus nachgewiesen werden konnte, weshalb eine konkrete Diagnosestellung allein aufgrund eines bioptisch gewonnenen Präparats als relativ unsicher zu bewerten ist (20).

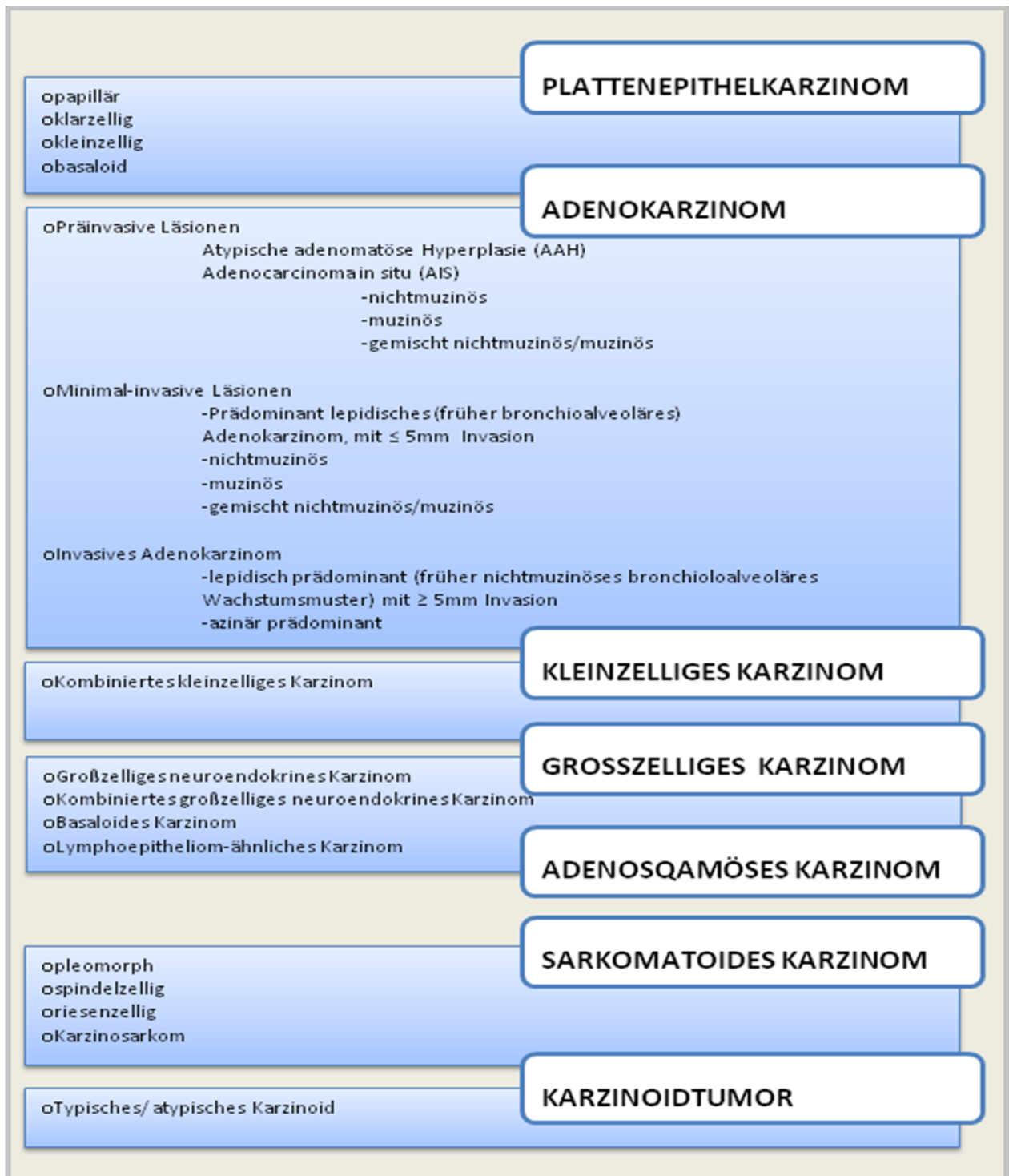


Abb. 2 Histologische Klassifikation maligner Lungentumoren (modifiziert nach IARC/WHO Classification of Tumours (20))

## 1.4.2 Immunhistochemische Marker

Die genaue Subtypisierung der Bronchialkarzinome erfolgt auch unter Berücksichtigung der molekularen Marker, durch die sich die einzelnen Entitäten von einander unterscheiden, wobei die Immunhistologie eine tragende Rolle spielt.

Die einzelnen Tumoren exprimieren also unterschiedliche nachweisbare Antigene, was sowohl die exakte Diagnostik und damit die Zuordnung zu den von der WHO klassifizierten Entitäten entscheidend verbessert, als auch in weiterer Folge die Entscheidungsfindung über die entsprechenden Therapiemodalitäten optimiert.

So exprimieren kleinzellige Karzinome und neuroendokrine Tumoren beispielsweise neben zahlreichen anderen Markern auch Chromogranin und Synaptophysin.

Zytokeratine, wie CK<sub>5/6</sub> oder der Transkriptionsfaktor p53 werden vor allem von Plattenepithelkarzinomen exprimiert, andere Zytokeratine, wie CK<sub>7</sub> sowie der Thyroidale Transkriptionsfaktor TTF-<sub>1</sub> sind wiederum typisch für das Adenokarzinom. Entsprechend dieser Marker für die verschiedenen Subtypen der NSCLCs, spielt beim Nachweis eines kleinzelligen Karzinoms die Expression des Transkriptionsfaktors ASH<sub>1</sub> eine wichtige Rolle (21).

Je nach Fragestellung kann dezidiert nach den genannten Markern gesucht werden.

Die Aussagekraft dieser Antigene in Bezug auf die Klassifizierung der Lungentumoren wird allerdings dadurch limitiert, dass es sich hierbei um epigenetische Marker handelt, die einer gewissen Variabilität unterworfen sind (18).

Neben der beschriebenen Marker, wurde innerhalb einer klinischen Studie (32) auch der Nachweis der Carboanhydrase IX innerhalb histologischer Präparate von PatientInnen mit NSCLC erbracht. Es handelt sich hierbei um einen Marker, der vorwiegend bei zellulärer Hypoxie innerhalb solider Tumoren exprimiert wird und somit einen entscheidenden prognostischen Parameter darstellt. Im klinischen Alltag konnte sich dieser Marker zur Abschätzung der Prognose allerdings noch nicht etablieren.

## **1.5. DIAGNOSTIK**

### **1.5.1 Klinische Symptomatik**

Die typischen klinischen Symptome des Bronchialkarzinoms werden zumeist erst im fortgeschrittenen Tumorstadium manifest, wobei zentral gelegene Tumoren häufiger als periphere zu Beschwerden führen. Dabei wird ein Drittel der Beschwerden durch den Primärtumor selbst ausgelöst, in einem weiteren Drittel werden die PatientInnen mit systemischen Krankheitssymptomen, wie beispielsweise Gewichtsverlust, vorstellig und ein Drittel der PatientInnen präsentiert sich bereits mit einer Symptomatik, die auf einen definierten Metastasierungsort rückschließen lässt. Diese Beschwerden, wie obere Einflusstauung, Knochen- sowie Abdominalschmerzen durch metastatische Infiltrationen liegen bei Diagnosestellung in erster Linie bei PatientInnen mit SCLC vor. Auch paraneoplastische Symptome, beispielsweise das Cushing-Syndrom bedingt durch ektope ACTH-Ausschüttung, werden vor allem bei kleinzelligen Karzinomen beobachtet.

Als Initialsymptome treten in erster Linie Husten, sowie rezidivierende Pneumonien, Gewichtsverlust oder Thoraxschmerzen auf. Die PatientInnen fühlen sich schwach und klagen über eingeschränkte Leistungsfähigkeit, oft vergesellschaftet mit Fieber oder Nachtschweiß. Die typischen richtungsweisenden Symptome, wie die besonders beim Plattenepithelkarzinom häufig vorkommenden Hämoptysen, präsentieren sich erst sehr spät (22).

### **1.5.2 Bildgebende Diagnostik**

Initial werden PatientInnen mit entsprechender Anamnese und Beschwerden, wie unspezifischen Thoraxschmerzen oder therapierefraktärem Husten, dem Thoraxröntgen zugeführt. Bei einem radiologisch nachgewiesenen Lungenrundherd gelten besonders eine fehlende Verkalkung, Raucheranamnese und PatientInnenalter >40 Jahre, sowie vom Rundherd ins Parenchym ausstrahlende Spiculae als dringend karzinomverdächtig.

Zur weiteren radiologischen Abklärung eignet sich besonders die kontrastmittelverstärkte Computertomographie (KM-CT), da dieses Verfahren genaue

Hinweise über die konkrete Lage der Läsion, sowie deren Assoziation zu benachbarten Strukturen liefern kann. Nach Diagnosesicherung wird die CT, genauso wie die Kontrastmittel-Magnetresonanztomographie (KM-MRT) auch zum Tumor-Staging herangezogen. Im Bezug auf Detektion eines Rundherds und Staging bei Diagnosesicherung gelten CT und MRT als durchaus vergleichbar.

Allerdings muss an diese Stelle festgehalten werden, dass auch die morphologischen Zeichen eines solitären Rundherdes in der CT oder MRT im Großteil der Fälle nicht ausreichend genau sind, um einen Rundherd als gesichert maligne zu deklarieren (22).

### **1.5.3 Diagnosesicherung**

Die genaue Diagnosestellung bedarf eines bioptisch-histologischen Nachweises von Tumorzellen innerhalb des Rundherdes, wobei der Einsatz der Bronchoskopie nach wie vor als goldener Standard zur exakten Diagnosesicherung gilt. Besonders bei zentral gelegenen Tumoren kann mit großer Sicherheit eine exakte Diagnose gestellt werden (23), bei meist peripher gelegenen Tumoren wie dem Adenokarzinom, korreliert die Trefferquote stark mit der Größe des Rundherdes (24). Für diese peripher gelegenen Läsionen eignet sich zur Verbesserung der Trefferquote die CT-gesteuerte transthorakale Feinnadelaspiration.

Bei speziellen Fragestellungen, sowie unter Berücksichtigung der Tatsache, dass sich mehrere histologische Typen innerhalb eines Rundherdes finden können, empfiehlt sich die Anwendung der oben genannten immunhistochemischen Verfahren (22).

## 1.6 PROBLEMSTELLUNG

### 1.6.1 Prognose des Lungenkarzinoms

Die 5-Jahres Überlebensrate ab Diagnosestellung liegt bei allen BronchialkarzinompatientInnen nur bei etwa 5%. Aufgrund der Tatsache, dass die Erkrankung in der Frühphase lange Zeit asymptomatisch verläuft, befinden sich 2/3 der PatientInnen bei der Diagnosestellung bereits in einem inoperablen Stadium ihrer Erkrankung (5).

Die dramatische Überlebensrate der betroffenen PatientInnen findet ihren Ursprung auch darin, dass die Operation nach wie vor den einzigen kurativen Therapieansatz darstellt.

Die schlechte Prognose des Bronchialkarzinoms liegt vor allem darin begründet, dass klinische Symptome erst in einem fortgeschrittenen Tumorstadium manifest werden und sich bis heute keine adäquaten Screeningmethoden asymptomatischer RisikopatientInnen etablieren konnte.

Durch die explizite Suche nach entsprechenden **Biomarkern**, beispielsweise im Serum der PatientInnen, könnte die Sterblichkeit der LungenkrebspatientInnen positiv beeinflusst werden. Allerdings sind diese Methoden noch nicht so ausgereift, um sie tatsächlich im klinischen Alltag zu Vorsorgeuntersuchungen nutzen zu können.

Besonders die kleinzelligen Bronchialkarzinome zeichnen sich darüber hinaus durch eine rasante Tumorverdopplungszeit aus, sodass die diagnostischen Maßnahmen oft nicht rechtzeitig zur Diagnosesicherung führen und somit ein großer Teil der PatientInnen erst zu spät einer adäquaten Therapie zugeführt werden kann.

Die Problematik der rascheren Therapieeinleitung wird dadurch verstärkt, dass die einzige zuverlässige Möglichkeit Lungenkrebs zu diagnostizieren, immer noch auf **invasive Maßnahmen** beschränkt ist.

Dem zu Folge würde eine non-invasive Screeningmethode von RisikopatientInnen zu einer rascheren Diagnostik in einem früheren Erkrankungsstadium und dadurch zu einer Verbesserung der Prognose der LungenkrebspatientInnen führen.

## 1.6.2 Kondensat der Ausatemluft

Durch die Option das Atemkondensat (*exhaled breath condensate* = **EBC**) von PatientInnen mit Erkrankungen des Respirationstrakts zu untersuchen, eröffnet sich ein innovatives, nicht-invasives und für die Patientin/ den Patienten völlig schmerz- und risikofreies Verfahren, um Rückschlüsse auf verschiedenste pathologische Prozesse innerhalb der Atemwege zu ziehen.

EBC enthält eine Vielzahl verschiedenster Bestandteile der Lunge, deren entsprechende Konzentration von verschiedensten Einflussfaktoren abhängt.

Die flüssige Hauptkomponente des Kondensats wird zu über 99% aus Wasserdampf gebildet, der durch den Kühlungsprozess in einer flüssigen Phase resultiert. Innerhalb dieses Kondensats lassen sich, in Abhängigkeit von der Temperatur des Kondensators, verschiedene hydrophile als auch hydrophobe **Biomarker** nachweisen. Durch verschiedenste Verfahren konnten beispielsweise  $H_2O_2$ , NO, Isoprostane, Leukotriene und Zytokine, sowie verschiedene Proteine und auch DNA-Fragmente innerhalb des Kondensats gefunden werden (28).

Die Akquirierung des EBC erfolgt durch ruhige, nicht forcierte Atmung durch das Mundstück des entsprechenden Kondensators. Eine Erwachsene/ ein Erwachsener kann hierbei innerhalb von 10 min etwa 1-3 ml EBC produzieren. Die Verwendung einer Nasenklammer zum Ausschluss der potentiellen Verunreinigung des Kondensats durch entzündliche Vorgänge in den oberen Atemwegen, kann sich als nützlich erweisen. Darüber hinaus lässt sich durch die angelegte Nasenklammer eine mögliche Expiration durch die Nase und damit ein Verlust des EBC-Materials vermeiden (28).

Die Wirkung vielfältiger äußerer Einflussfaktoren auf die Zusammensetzung von EBC bedarf noch weitreichender Prüfungen. Den am besten erforschten Biomarker hinsichtlich der Einflussnahme äußerer Variablen wie Alter, Geschlecht sowie Körpergröße oder Gewicht, stellt  $H_2O_2$  dar, wobei höhere Konzentrationen im EBC von älteren PatientInnen im Vergleich zu EBC von jüngeren PatientInnen nachgewiesen wurden (25).

Auch der Einfluss von Zigarettenrauchinhalation führt zu einem Anstieg der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration im EBC, wobei auch eine vermehrte Expression von Isoprostan-8 und Nitrotyrosin im Kondensat von RaucherInnen beschrieben wurde (26).

Extrapulmonale oder systemische Erkrankungen können die Ergebnisse der EBC-Diagnostik ebenfalls beeinflussen. Entsprechende Evidenzen diesbezüglich liegen bis dato allerdings nur für  $\text{H}_2\text{O}_2$  (27) vor, die Einflussnahme auf die verschiedenen anderen EBC-Biomarker bedarf noch weitreichender Forschung.

Neben zahlreichen Biomarkern, kann auch die einfach durchzuführende Messung des pH-Wertes innerhalb des Kondensats Aufschluss über vorliegende pathologische Prozesse liefern, welche die Säure-Basen-Homöostase innerhalb der Atemwege beeinflussen. So liegt der Mittelwert des durch orale EBC-Sammlung gewonnenen Kondensats bei gesunden ProbandInnen bei 7,7. Verschiedene Vorgänge innerhalb des Respirationstrakts, die zur vermehrten Freisetzung saurer Substanzen führen, schlagen sich folglich in einer messbaren Veränderung des pH-Wertes nieder (28).

Die EBC-Analyse eröffnet für die PatientInnen eine völlig risiko- und schmerzfreie diagnostische Option, die sich auch problemlos wiederholen lässt, um beispielsweise den Verlauf eines entsprechenden Biomarkers unter Therapie zu protokollieren.

Nicht zuletzt aufgrund der schlechten Prognose des Lungenkarzinoms erfordert die Suche nach Biomarkern im Kondensat der Ausatemluft besondere wissenschaftliche Beachtung. Durch die Etablierung neuer Marker, könnte sich ein völlig neues, nicht-invasives diagnostisches Instrument anbieten, welches durch seine unkomplizierte und rasche Durchführbarkeit die Diagnosesicherung beschleunigen könnte.

### 1.6.3 Tumorwachstum und Hypoxie

Mit dem fortschreitenden Wachstum und der Expansion des Tumors ist es nur eine Frage der Zeit, bis den maligne entarteten Zellen immer weniger Sauerstoff zur Verfügung steht. Dies erfolgt sowohl durch unzureichende vaskuläre Versorgung des Tumors, als auch durch verlängerte Diffusionsstrecken zwischen den nutritiven Gefäßen und der sich ausbreitenden Tumormasse. Auch die häufig durch okkulte Blutungen oder therapeutische Maßnahmen auftretende generalisierte Anämie resultiert in einer Sauerstoffminderversorgung des tumorösen Gewebes.

In den Tumorzellen selbst impliziert die hypoxische Stoffwechsellage entweder einen Wachstumsstopp oder, wenn die Imbalance zwischen O<sub>2</sub>-Angebot und -Bedarf nicht auf anderem Wege behoben werden kann, den Zelluntergang durch Apoptose oder Nekrose. Andererseits kann der hypoxische Stress auch als Promotor für genetische Alterationen innerhalb der Tumorzellen fungieren, sodass Veränderungen der exprimierten Tumorproteine resultieren. Diese Hypoxie-getriggerten Tumorproteine ermöglichen dem Tumor eine bessere Adaptierung an die herrschende Stoffwechsellage und erlauben sowohl das Überleben, als auch die weitere lokale Expansion des Tumors und erleichtern auch die metastatische Absiedelung der Tumorzellen (29).

Einer der wichtigsten Promotoren für die Anpassung der Tumorzellen an die mangelnde O<sub>2</sub>-Versorgung ist der Transkriptionsfaktor HIF-1, der als Folge von hypoxischem Stress innerhalb der Zelle aktiviert wird (30). Dieser wirkt an über 30 verschiedenen Genen, die Proteine zur Tumorprogression generieren, wie beispielsweise VEGF für die Angiogenese oder verschiedene Glukose-Transporter zur Sicherung der Energieversorgung des Tumors (siehe Abb. 3).

Darüber hinaus kann die Hypoxie-bedingte Veränderung des Tumorgenoms und -proteoms auch zur Verschlechterung des Ansprechens der malignen Zellen auf verschiedenen Therapien führen.

Die **durch Hypoxie induzierten Signalwege können** folglich über die Expression verschiedener Proteine **zur Verschlechterung der Prognose** des Tumors beitragen (29).

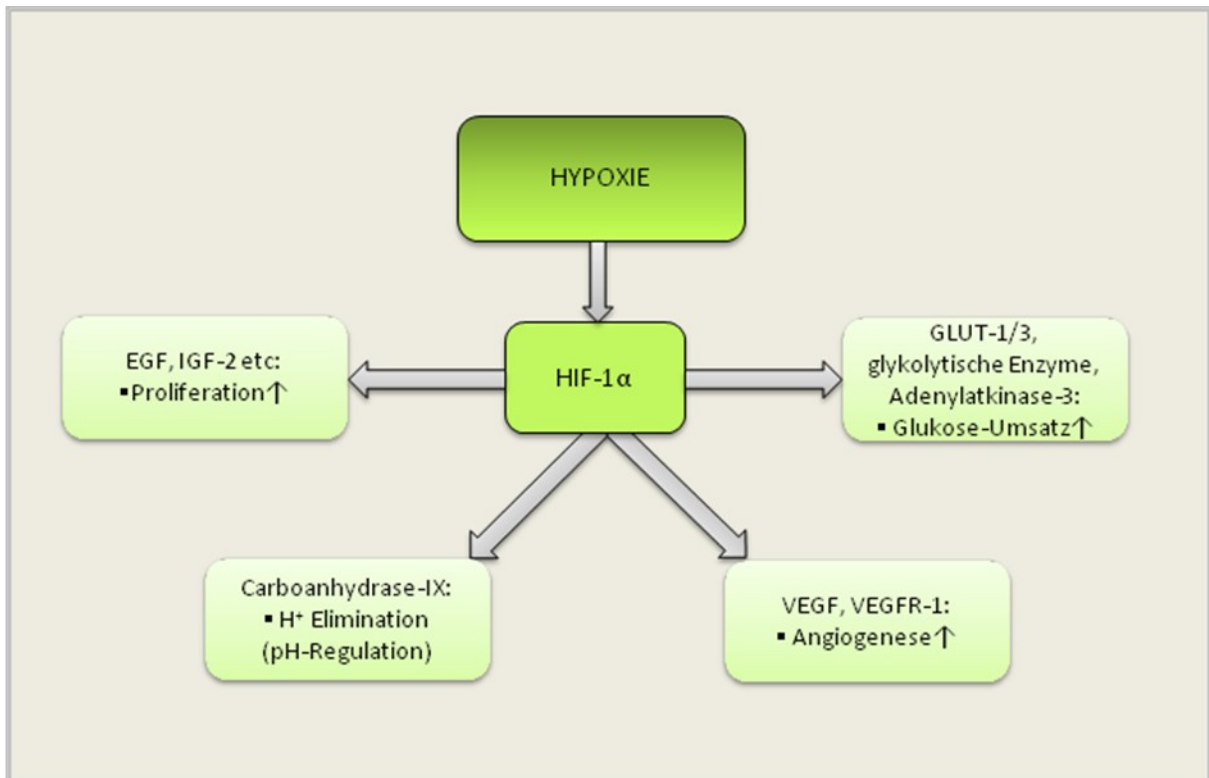


Abb. 3 Einfluss der Hypoxie auf die Expression progressionsfördernder Faktoren (modifiziert nach Vaupel et al (26))

Durch die Expression spezifischer Hypoxie-bedingter Faktoren innerhalb der Tumorzelle kann also eine gewisse Aussage über die Prognose getroffen werden. Darüber hinaus kann der Erfolg einer eingeleiteten Therapie evaluiert werden.

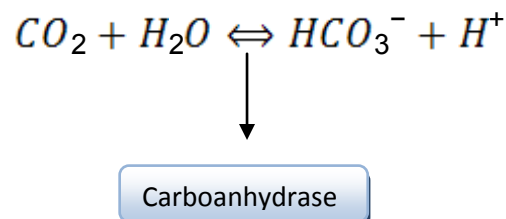
## 1.6.4 Potentielle Tumormarker

### Carboanhydrase IX

Wie Abb. 3 zeigt, reguliert der HIF-1-Signalweg, neben zahlreichen anderen Faktoren, auch die Freisetzung des membrangebundenen Metalloenzym Carboanhydrase IX (CAIX) (29).

CAIX stellt eine von insgesamt 15 im menschlichen Körper nachgewiesenen Isoformen der Carboanhydrasefamilie dar. Allerdings ist es das einzige nachgewiesene Isoenzym, das innerhalb solider Tumoren vermehrt exprimiert wird (31). Die Expression von CAIX erfolgt bei hypoxischer Stoffwechsellaage innerhalb der Tumorzellen über den HIF-Signalweg. Es kann unter Hypoxie aber auch in nicht-tumorösem Gewebe exprimiert werden.

Innerhalb der Zelle katalysiert dieses Enzym, das neben einer intrazellulären auch eine extrazelluläre Domäne besitzt, die reversible Umwandlung von Kohlendioxid ( $\text{CO}_2$ ) in Bikarbonat ( $\text{HCO}_3^-$ ) und Protonen ( $\text{H}^+$ ) und greift dadurch auch in die pH-Regulationsmechanismen ein.



Durch diesen Vorgang wird das aktiv in die Zelle eingeschleuste Bikarbonat durch die CAIX in  $\text{CO}_2$  umgewandelt, welches problemlos durch die Zellmembran diffundiert und durch die extrazelluläre Domäne des Enzyms wieder in  $\text{HCO}_3^-$  und  $\text{H}^+$  gespalten wird, wodurch es zu der für solide Tumoren typischen Azidose kommt (31).

Wie die Studie von Giatromanolaki et al (32) zeigt, wirkt sich die Expression von CAIX innerhalb nicht-kleinzelliger Lungenkarzinomen negativ auf die Überlebensrate der betroffenen PatientInnen aus. Durch die Untersuchung bioptischen Materials von PatientInnen mit NSCLCs konnte hierbei eine Überexpression von CAIX sowohl in

nekrotischen, als auch in hypoxischen Bereichen des Tumors identifiziert werden. Darüber hinaus wurde ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression von CAIX und der Expression anderer Proteine festgestellt, die die Angiogenese fördern oder die Apoptose maligner Zellen inhibieren.

Das Vorkommen von CAIX innerhalb der Tumorzellen präsentiert sich konsekutiv als relevanter Parameter für die Aktivität des HIF-Signalwegs und dient damit auch der Beurteilung der aktuellen Sauerstofflage innerhalb des Tumors. Auf Grund dieser Tatsache, kann der Nachweis einer Überexpression von CAIX als prognostischer Faktor genutzt werden. Des Weiteren kann dieses Enzym auch als Biomarker zur Erfassung einer bestehenden Tumorphoxie herangezogen werden.

Darüber hinaus eröffnet sich durch die therapeutische Hemmung der CAIX auch eine neue Therapieoption, die in die Mechanismen der Tumorprogression eingreifen und sie somit inhibieren kann (32).

Innerhalb der oben genannten Studie wurde auch eine mit der CAIX-Überexpression vergesellschaftete vermehrte Expression des Rezeptors für den **basic fibroblast growth factor (FGF-b)** beschrieben.

### **FGF-b**

Der FGF-b, in der Literatur auch oft als FGF-2 bezeichnet, stellt einen Subtypus der FGF-Familie dar, die als Heparin-bindende Signalproteine an verschiedene Rezeptoren der Endothelzellmembran binden. Zumeist handelt es sich bei diesen um Tyrosinkinase-Rezeptoren, die nach Bindung des Liganden eine Signalkaskade innerhalb der Zelle induzieren und somit zur Freisetzung proliferationsfördernder und angiogenetischer Substanzen führen.

In der Embryonalzeit erweisen sich die FGFs als unentbehrlich für die Differenzierung einzelner Organe, beim adulten Organismus fördern sie die Proliferation und spielen bei Entzündungsprozessen und bei der Angiogenese eine entscheidende Rolle.

Entzündungsvorgänge innerhalb des Körpers können über die Ausschüttung von FGF-b aus verschiedensten Entzündungszellen zur inflammatorisch-medierten Angiogenese führen. Darüber hinaus werden auch die Endothelzellen selbst durch Entzündungsmediatoren oder durch ihre eigene Schädigung zur Bildung und Expression von FGF-b veranlasst (34). Die gleichen Prozesse werden auch durch zelluläre Hypoxie getriggert (35).

In Bezug auf das Tumorwachstum spielt die Angiogenese für die Aufrechterhaltung der Energieversorgung des Tumors eine entscheidende Rolle.

In klinischen Studien wurde der Versuch unternommen, einen klaren Zusammenhang zwischen der Gefäßdichte innerhalb der Tumoren und der Menge der nachgewiesenen FGF-b-mRNA, des FGF-b-Proteins selbst, sowie verschiedenen Vertretern der VEGF-Familie zu ermitteln. Allerdings konnte bislang keine beständige Korrelation zwischen FGF-b und der intratumoralen Gefäßdichte nachgewiesen werden. Ein persistenterer Zusammenhang ergab sich dagegen für VEGF.

Zahlreiche Studien weisen auf eine Co-Expression von FGF-b und den verschiedenen Formen der VEGF-Familie hin. Gleichzeitig legen verschiedene Untersuchungen die Möglichkeit nahe, dass FGF-b die Vaskularisierung und damit auch die Neogenese tumorversorgender Gefäße nicht nur direkt, sondern auch indirekt über die Aktivierung der VEGFs und deren Rezeptoren vermittelt (33).

Durch den Nachweis von FGF-b in Tumoren könnte sich in Zukunft die Möglichkeit eröffnen, dessen Bildung durch verschiedene therapeutische Interventionen zu hemmen und somit die Neogenese von tumorversorgenden Gefäßen zu inhibieren.

Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, FGF-b als prognostischen Marker zu nutzen, da die Angiogenese, wie oben bereits erwähnt, die Prognose maligner Tumoren negativ beeinflusst.

### **Lactatdehydrogenase**

Innerhalb des menschlichen Körpers existieren fünf verschiedene Isoformen der LDH, die sich durch den Aufbau ihrer Untereinheiten unterscheiden und eine gewisse Organspezifität aufweisen.

Die Aufgabe dieser zytoplasmatischen Oxidoreduktasen ist der reversible Umbau von Pyruvat zu Laktat, was bei Sauerstoffmangel für die Energieversorgung der Zelle von großer Bedeutung ist. Daher ist es energetisch sinnvoll, dass zelluläre Hypoxie direkt über den Hypoxie-induzierten Faktor (HIF-1 $\alpha$ ) zur Transkription und Expression von LDH führt, welche die anaerobe Glykolyse in Gang setzt.

Besondere Beachtung verdient der Subtypus LDH-5, da dieser unter allen Isoenzymen die größte Effizienz bezogen auf die Pyruvat-Laktat-Konversion aufweist. Daher fördert eine vermehrte Expression dieses Enzyms innerhalb der

Tumorzellen eine leistungsstarke anaerobe Glykolyse und folglich eine gewisse Unabhängigkeit von der Sauerstoffversorgung.

Aus diesem Grund ist dieses Enzym auch als Hypoxiemarker von Relevanz. Darüber hinaus dient der Verlauf des LDH-Spiegels im Blut auch zur Bewertung des Therapieerfolges bei malignen Erkrankungen, da intrazelluläres LDH bei Zelluntergang vermehrt ins Blut abgegeben wird (36).

Innerhalb der Studie von Koukourakis et al (36) wird die Überexpression von LDH-5 innerhalb von NSCLCs mit einer Verschlechterung der Prognose in Zusammenhang gebracht, weshalb auch dieses Enzym als prognostischer Biomarker genutzt werden kann. Darüber hinaus scheint dieser Marker auch für die Evaluierung der Angiogenese einsetzbar zu sein, da die oben genannte Arbeit eine signifikante Korrelation zwischen der LDH-5-Überexpression und der Expression von VEGF und FGF-b beschreibt.

### **Atemkondensat**

Die prognostische Relevanz von CAIX, FGF-b und LDH für Lungenkarzinome wurde bereits durch verschiedene Studien belegt (32, 33, 36), wobei allerdings zumeist auf bioptisches Material zurückgegriffen wurde. Die innovative Idee, die beschriebenen Biomarker nicht nur innerhalb bioptischer Gewebeproben, sondern auch im Kondensat der Ausatemluft von LungenkrebspatientInnen nachweisen zu können, ist noch eine relativ unerforschte Methode der Tumordiagnostik. Die EBC-Sammlung lässt sich problemlos und je nach Bedarf beliebig oft wiederholen und eignet sich daher bestens zur Evaluierung der Konzentration der entsprechenden Marker unter Therapie.

Das Verhalten der Biomarker während der therapeutischen Intervention könnte auch genauere Rückschlüsse auf die Prognose zulassen und kann darüber hinaus einen wichtigen Beitrag zur rechtzeitigen Adaptierung eines neuen beziehungsweise adäquateren Therapieschemas leisten.

Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, durch weitere Forschungen auf diesem Gebiet, Kenntnis über bis dato noch völlig unerforschte EBC-Marker zu gewinnen, um in Zukunft eine nicht-invasive, kostengünstige und einfach durchzuführende Screeningmethode von RisikopatientInnen etablieren zu können.

In Anlehnung an die Studie von Dalaveris et al (37) analysierten wir das EBC von PatientInnen mit Bronchialkarzinomen auf der Suche nach den genannten potentiellen Biomarkern. Entsprechende Evidenzen für den Nachweis dieser Marker im EBC von BronchialkarzinompatientInnen liegen aktuell nur für FGF-b vor (42). Innerhalb dieser Arbeit wurde der analytischen Auswertung allerdings eine aufwendigere Probenaufarbeitung vorangestellt, als in der vorliegenden Studie. Darüber hinaus prüften wir das akquirierte EBC-Material auf pH-Wert und den CO<sub>2</sub> Partialdruck (pCO<sub>2</sub>).

Unseres Wissens nach wurde bislang noch keine Studie publiziert, die die Detektion dieser potentiellen EBC-Tumormarker mit der von uns angewandten Methodik zum Inhalt hat.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 PATIENT/INNENKOLLEKTIV

Nach Bewilligung des Antrags an die Ethikkommission wurden in der Zeit von Mai 2010 bis Mai 2011 EBC-Proben von 20 PatientInnen mit der histologisch gesicherten Diagnose eines Lungenkarzinoms gesammelt. Die entsprechenden PatientInnen waren im Laufe des besagten Zeitraums in stationärer Behandlung an der klinischen Abteilung für Lungenkrankheiten des LKH Universitätsklinikums Graz.

Die verschiedenen PatientInnen befanden sich in unterschiedlichen Stadien ihrer Erkrankung und auch die histologischen Subtypen der Lungenkarzinome erwiesen sich als uneinheitlich.

Um innerhalb der ausgewählten PatientInnenpopulation eine gewisse Homogenität des Kollektivs zu schaffen und damit eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse erzielen zu können, wurden nicht alle PatientInnen mit Lungenkarzinomen in die Studie aufgenommen. Zu diesem Zweck wurden für die Teilnahme an der Studie entsprechende Ein- und Ausschlusskriterien erstellt:

#### ***Einschlusskriterien:***

- Patienten jeden Alters und Geschlechts mit histologisch gesicherter Diagnose eines primären Lungenkarzinoms
- Freiwillige Einwilligung zur Teilnahme an der Studie und Unterzeichnung einer Einverständniserklärung nach ausführlichem ärztlichen Aufklärungsgespräch

#### ***Ausschlusskriterien:***

- PatientInnen, die an einem Lungenkarzinom leiden und sich bereits in einer eingeleiteten Chemo- oder Strahlentherapie zur Behandlung des Karzinoms befinden

Es muss davon ausgegangen werden, dass sich die Konzentrationen der gesuchten Tumormarker durch die laufenden therapeutischen Maßnahmen verändern.

Die unter Therapie gemessenen Konzentrationen der Marker würden daher zu einer Verfälschung der Studienergebnisse führen.

- PatientInnen, deren Allgemeinzustand oder deren respiratorische Situation eine 10 minütige Atmung durch das Schlauchsystem des Kondensators unmöglich macht

Für die Gewinnung einer ausreichenden Menge verwertbaren Kondensats ist eine gewisse Compliance der PatientInnen ein entscheidendes Kriterium. Aus diesem Grund war es nicht möglich, PatientInnen, die beispielsweise durch verschiedene respiratorische Begleiterkrankungen in ihrer Atmung beeinträchtigt waren, in die Studie einzuschließen.

- PatientInnen mit metastatischen Absiedelungen in der Lunge, wobei der Primärtumor einer extrapulmonalen Lokalisation zuzuordnen ist

Die PatientInnen wurden in einem ausführlichen Gespräch über den genauen Ablauf sowie den Zweck einer Studie im Bereich der Grundlagenforschung informiert. Darüber hinaus wurde ein Aufklärungsbogen erstellt, der die wichtigsten Informationen zum Verständnis der Studie zusammenfasst, sowie die PatientInnen über die Freiwilligkeit der Teilnahme an der Studie und der Vertraulichkeit der erhobenen Daten aufklärt.

Die EBC-Sammlung und der Zugriff auf die entsprechenden PatientInnendaten konnten nur erfolgen, wenn die PatientInnen durch ihre Unterschrift bestätigten, dass sie über den Zweck der Studie verständlich und vollständig aufgeklärt wurden.

Die Kontrollgruppe wurde bezüglich Alter und Geschlecht dem PatientInnenkollektiv angepasst, da davon ausgegangen werden muss, dass diese Parameter Einfluss auf die Konzentrationen der im Kondensat nachzuweisenden Substanzen nehmen.

Entsprechend der Anzahl des PatientInnenkollektivs wurden folglich EBC-Proben von 20 Personen gesammelt, die als respiratorisch unauffällige Kontrollpopulation fungierten.

## **2.2 VERWENDETE GERÄTE UND BENÖTIGTE DATEN**

### **2.2.1 Aufklärungsbogen**

Zur Information der PatientInnen und der Kontrollpersonen über die geplante Studie wurde ein Aufklärungsbogen (siehe Appendix) angefertigt, der von den StudienteilnehmerInnen unterzeichnet werden musste.

In diesem drei Seiten umfassenden Schreiben wurde über die Relevanz einer Studie im Bereich der Grundlagenforschung hingewiesen. Des Weiteren wurden die StudienteilnehmerInnen über ihr Recht informiert, jederzeit und ohne Angabe von Gründen aus der Studie ausscheiden zu können. In diesem Fall würden die bereits erhobenen EBC-Proben verworfen werden.

Darüber hinaus wurde sowohl den teilnehmenden PatientInnen als auch der Kontrollpopulation der vertrauliche Umgang mit den erhobenen Daten zugesichert. Im Falle einer Weitergabe dieser Daten an Dritte würde dies nur in anonymisierter Form geschehen.

Die StudienteilnehmerInnen bestätigten mit ihrer Signatur, dass sie über den Zweck der Studie ausreichend aufgeklärt wurden und sich in einem umfassend informierten Zustand zur Teilnahme an der Studie bereit erklärten.

### **2.2.2 EBC-Akquirierung**

Zur Sammlung des Atemkondensats des PatientInnen- und Kontrollkollektivs wurde die TURBO-DECCS Einheit verwendet (=Transportable Unit for Research on Biomarkers Obtained from Disposable Exhaled Condensate Collection Systems; ItalChill, Parma, ITALY), die speziell für die Akquirierung von EBC entwickelt wurde (siehe Abb. 4).

Hierbei handelt es sich um ein Kombinationsprinzip aus einem portablen Kondensator, der mit einem Einweg-Schlauchsystem aus Polyethylen in Verbindung steht. Der Kondensator verfügt über eine Kühleinheit, welche während der EBC-Sammlung eine Arbeitstemperatur von etwa -1 bis -3°C aufrechterhält. Diese Temperatur gewährleistet, dass die Ausatemluft der ProbandInnen innerhalb der

Diffusionseinheit des Schlauchsystems kondensiert und sich als Flüssigkeit im Sammelröhrchen niederschlägt.



Zur Inbetriebnahme der Kühleinheit musste das Gerät etwa 15 Minuten vor der Anwendung an den ProbandInnen an das Stromnetz angeschlossen werden um die entsprechende Arbeitstemperatur erreichen zu können. Nur so konnte eine ausreichende Kühlung zur EBC-Sammlung erreicht werden.

PET-Schlauchsystem

Temperaturanzeige

Kühleinheit

Abb. 4 TURBO-DECCS-Einheit

Darüber hinaus war es zur Aufrechterhaltung der entsprechenden Temperatur nötig, auch während der EBC-Sammlung eine Verbindung mit dem Stromnetz aufrecht zu erhalten.

Durch das Einweg-Schlauchsystem wird die risikofreie und kontaminationslose Sammlung des Kondensats garantiert (siehe Abb. 5).

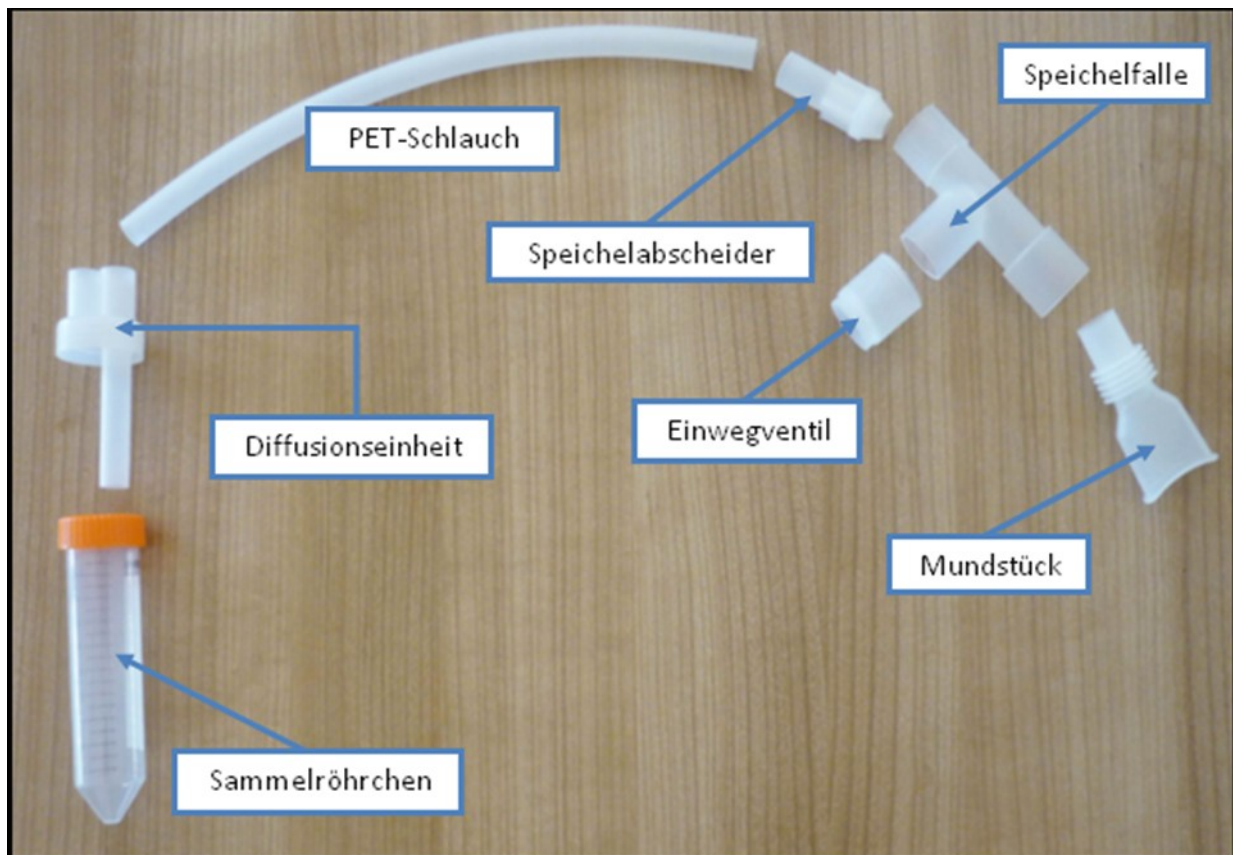


Abb. 5 Bauteile des Einweg-Schlauchsystems zur EBC-Sammlung

Die verschiedenen Bauteile des Schlauchsystems verhindern eine Kontamination des Atemkondensats mit Speichel der ProbandInnen und schützen das Kondensat auch vor der Verunreinigung durch andere Substanzen aus der Umgebung. Darüber hinaus kann die Gefahr einer eventuellen Keimverschleppung zwischen den einzelnen ProbandInnen durch die Verwendung eines Einweg-Produkts praktisch ausgeschlossen werden.

### **2.2.3 Messung des pH und des pCO<sub>2</sub>**

Unmittelbar nach der EBC-Akquirierung am Patienten/ an der Patientin erfolgte die Messung des pH-Wertes sowie des pCO<sub>2</sub> innerhalb des gewonnenen Atemkondensats. Zu diesem Zweck wurde dasselbe Gerät verwendet, welches im klinischen Alltag zur Blutgasanalyse herangezogen wird. (Radiometer ABL 750, Drott, Wien, AUSTRIA)

Die Messung der entsprechenden Parameter erwies sich durch einfaches Platzieren eines Kapillarröhrchens, das etwa 50 µl des Atemkondensats fasste, als schnell und unkompliziert durchführbar.

Der Ausdruck der so ermittelten Werte wurde bis zur späteren statistischen Auswertung gemeinsam mit den erhobenen PatientInnen-Daten archiviert.

### **2.2.4 Erhebung klinischer Daten**

Neben der Sammlung des EBC der entsprechenden StudienteilnehmerInnen wurden zur Sicherung der Diagnose histologische Befunde der PatientInnen benötigt, auf welche über das Krankenhausinformationssystem MEDOCS zugegriffen wurde.

Darüber hinaus war die Erhebung weiterer patientInnenbezogener klinischer Daten über Tumorstadium, Tumortypus sowie eventuell vorliegender Begleiterkrankungen von besonderer Bedeutung, um diese in Korrelation mit der Konzentration der zu untersuchenden Biomarker zu setzen.

Im Aufklärungsgespräch über die Studienteilnahme wurden die PatientInnen über diese Tatsachen informiert und ihnen wurde die Vertraulichkeit der erhobenen Daten bzw. deren Anonymisierung zugesichert.

### **2.2.5 Statistische Auswertung**

Die Analyse der Daten erfolgte mittels SPSS (Version 18, SPSS Inc., Chicago, USA). Für die graphische Darstellung der Daten wurde GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., California, USA) verwendet.

## 2.3 EXAKTER ARBEITSABLAUF DER STUDIE

Nach Auswahl entsprechender PatientInnen wurden diese in einem ausführlichen Aufklärungsgespräch über die durchzuführende Studie informiert.

Dieses Gespräch mit den PatientInnen wie auch die Probensammlung selbst fanden im Krankenzimmer der jeweiligen StudienteilnehmerInnen statt, wobei es den PatientInnen freigestellt war, die Atmung durch das Konnektorsystem des Kondensators in sitzender oder liegender Position auszuführen.

Da in Betracht gezogen werden muss, dass die Expression der Biomarker im Tagesverlauf variiert, war es von entscheidender Bedeutung die EBC-Proben immer zur annähernd gleichen Zeit zu akquirieren, da dies die Vergleichbarkeit der Proben untereinander optimiert.

Nachdem die PatientInnen ausführlich informiert wurden und sie die freiwillige Teilnahme an der Studie mit ihrer Unterschrift bestätigten, wurden sie aufgefordert, das Mundstück des Schlauchsystems mit den Lippen zu umschließen und eine ruhige orale In- und Expiration durchzuführen. Es erwies sich als hilfreich, die PatientInnen während der ersten Minuten der EBC-Sammlung zu überwachen. Dadurch eröffnete sich die Möglichkeit, die für die EBC-Akquirierung erforderliche Compliance der PatientInnen zu evaluieren und sie darüber hinaus auf eventuelle Inkorrektheiten bei der Durchführung aufmerksam zu machen.

Theoretisch bestünde auch die Möglichkeit, durch Verwendung einer Nasenklammer die gesicherte Mundatmung der PatientInnen zu erzwingen, was zu einer Optimierung der EBC-Akquirierung führen würde. Da wir aber bemüht waren, den Untersuchungsaufbau für die StudienteilnehmerInnen so angenehm und unproblematisch wie möglich zu gestalten, wurde auf dieses Instrument zur EBC-Gewinnung verzichtet.

Im Gegenzug wurden die ProbandInnen genauestens über die Bedeutung ihrer ausschließlichen Mundatmung für die EBC-Gewinnung informiert, sodass auch bei Verzicht auf die Nasenklammer eine ausreichende Menge EBC akquiriert werden konnte.

Des Weiteren wurden die teilnehmenden Personen darüber in Kenntnis gesetzt, dass die Atmung auch diskontinuierlich erfolgen könne, das heißt, es war den PatientInnen durchaus möglich, die Atmung durch das Mundstück zu unterbrechen um beispielsweise zu husten.

Um eine eventuelle Kontamination des EBC auszuschließen war es von entscheidender Relevanz die StudienteilnehmerInnen darauf hinzuweisen, angesammelten Speichel zu schlucken.

Nach entsprechender Evaluierung der gegebenen Toleranz der PatientInnen gegenüber der oralen In- und Expiration durch das Mundstück, wurden diese aufgefordert, die Atmung auf die gleiche Weise für etwa 10 bis 15 Minuten fortzuführen.

Die StudienteilnehmerInnen erhielten darüber hinaus eine Kopie des Aufklärungsbogens und wurden nochmals darauf hingewiesen, bei eventuell auftretenden Fragen oder Bedenken hinsichtlich ihrer Teilnahme an der Studie, die angeführten Ansprechpersonen zu kontaktieren.

Eine Atmung von etwa 10-15 Minuten wurde von allen StudienteilnehmerInnen problemlos toleriert und es konnten jeweils ca. 1-3 ml Ausatemkondensat im Sammelröhrchen der TURBO-DECCS-Einheit akquiriert werden.

Unmittelbar nach der EBC-Sammlung wurde ein Teil des gewonnenen Kondensats mittels eines Kapillarröhrchens aus dem Sammelröhrchen entnommen und mit dem Blutgasanalysegerät der PH und der  $p\text{CO}_2$  ermittelt.

Anschließend erfolgte die zur Lagerung und späteren Vermessung der EBC-Proben nötige Aliquotierung des verbleibenden Materials am Zentrum für Medizinische Forschung des LKH Graz. Hierbei wurde die Gesamtmenge des EBC mittels einer Pipette auf eine, je nach gewonnener Menge des Kondensats, divergierende Anzahl von 200  $\mu\text{l}$  fassenden Eppendorf-Röhrchen aufgeteilt.

Dies brachte auch den Vorteil mit sich, dass die unterschiedlichen zu untersuchenden Biomarker zu verschiedenen Zeiten analysiert werden konnten, ohne dass der Kühlungsprozess der jeweiligen Probe unterbrochen wurde.

Aufgrund der Tatsache, dass keine Evidenzen über eine potentielle Konzentrationsänderung der von uns zu untersuchenden Biomarker bei wiederholtem Einfrieren und Auftauen des Materials vorliegen, konnte dieser mögliche Fehler durch die Aliquotierung des EBC von Anfang an ausgeschlossen werden.

Die Eppendorf-Röhrchen wurden anschließend mit der für die jeweilige Patientin/ den jeweiligen Patienten gewählten Codierung versehen und anschließend wurden alle zu einer Patientin/ einem Patienten gehörenden EBC-Proben in einem größeren, wiederum mit der entsprechenden Codierung versehenem, Röhrchen zusammengebracht.

Diese Röhrchen wurden bis zum Zeitpunkt der Analyse der Konzentration der gesuchten Tumormarker bei  $-80^{\circ}\text{C}$  tief gefroren.

Die ATS/ERS TASK FORCE empfiehlt eine unmittelbar nach der EBC-Sammlung durchzuführende Kühlung und in weiterer Folge Lagerung des Probenmaterials bei  $-70^{\circ}\text{C}$ , um der Zerstörung oder dem Instabilitäts-bedingten Abbau, der für gewisse Biomarker bereits erwiesen ist, vorzubeugen (28).

Da für LDH, CAIX und FGF-b keine, oder nur mangelhafte, entsprechenden Evidenzen vorliegen und die gesammelten Proben aufgrund der etwa einjährigen Dauer der Studie unterschiedlich lange dem Lagerungs- und Kühlungsprozess ausgesetzt waren, konnte nicht vollends ausgeschlossen werden, dass die zu analysierenden Marker durch die Lagerung verändert oder zerstört werden könnten.

## 2.4 ANALYSE DER EBC-PROBEN

Zum Nachweis der CAIX- und FGF-b-Konzentrationen innerhalb der gesammelten Proben wurde der **Enzyme Linked Immunosorbent Assay (=ELISA)** verwendet, welcher bei vielen klinischen Fragestellungen bereits als diagnostisches Standardinstrument gilt.

Der ELISA zählt zu den Immunoassayverfahren, wobei die nachzuweisenden Substanzen mittels einer enzymatisch markierten Antigen-Antikörper-Reaktion detektiert und farblich sichtbar gemacht werden.

Der Einsatz dieses Verfahrens innerhalb der EBC-Analyse erweist sich allerdings als relativ neuartig, da Atemkondensatproben bis dato meist nur mit teureren und komplizierteren Techniken, wie beispielsweise der Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) untersucht wurden.

Innerhalb der vorliegenden Studie wurde daher durch die EBC-Analyse mittels ELISA, neben der Detektion neuer Tumormarker, auch versucht, ein kostengünstigeres und im Laborbereich routinemäßig vorhandenes Instrument für deren Nachweis zu finden. Für den quantitativen Nachweis von CAIX und FGF-b innerhalb der gesammelten EBC-Proben kamen die ELISA-Arbeitsmaterialien von QUANTIKINE® (R&D Systems Inc., Minneapolis, USA) zur Anwendung.

Der Nachweis der LDH-Aktivität innerhalb der EBC-Proben erfolgte mit einem colorimetrischen Verfahren unter Anwendung des *Lactate Dehydrogenase Assay Kit* (BioVision, California, USA).

Zur Vergleichbarkeit wurden das PatientInnen- und das Kontrollkollektiv in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht gematcht (siehe Tab. 1).

PATIENT/INNENKOLLEKTIV				KONTROLLKOLLEKTIV			
	Probe	Geschlecht	Alter		Probe	Geschlecht	Alter
1	EBC 01	w	74	1	EBC 36	w	74
2	EBC 02	m	72	2	EBC 30	m	74
3	EBC 03	m	71	3	EBC 28	m	69
4	EBC 04	w	70	4	EBC 39	w	70
5	EBC 06	m	65	5	EBC 07	m	67
6	EBC 08	w	53	6	EBC 32	w	49
7	EBC 10	w	46	7	EBC 13	w	44
8	EBC 11	w	60	8	EBC 35	w	61
9	EBC 15	w	85	9	EBC 34	w	87
10	EBC 16	w	81	10	EBC 38	m	78
11	EBC 18	m	65	11	EBC 26	m	67
12	EBC 19	w	49	12	EBC 33	w	48
13	EBC 20	w	57	13	EBC 09	w	55
14	EBC 21	w	68	14	EBC 37	w	65
15	EBC 22	m	58	15	EBC 17	m	62
16	EBC 40	w	62	16	EBC 25	w	63
17	EBC 41	m	64	17	EBC 27	m	64
18	EBC 42	m	56	18	EBC 29	m	61
19	EBC 44	m	53	19	EBC 31	m	60
20	EBC 45	w	45	20	EBC 14	m	42
			<b>m/w = 8/12</b>				<b>62,7</b>
							<b>63</b>

Tabelle 1 EBC-Proben des PatientInnen- und Kontrollkollektivs gematcht nach Alter und Geschlecht

### 2.4.1 Nachweis der Carboanhydrase IX

Zur Quantifizierung der gesuchten CAIX-Konzentration innerhalb der akquirierten Proben wurde die Sandwich-ELISA-Methode verwendet. Es handelt sich hierbei um eine spezielle ELISA-Technik, die zum Nachweis eines spezifischen Antigens (Ag) zwei verschiedene Antikörper (AK) einsetzt, die an unterschiedliche Stellen des gesuchten Antigens binden.

Die Durchführung des Assays erfolgte mit dem *Human Carbonic Anhydrase IX Immunoassay* von QUANTAKINE® (DCA900; R&D Systems Inc., Minneapolis, USA). Dieser Assay ermöglicht die Detektion von CAIX bis zu einem mittleren minimalen Dosisbereich von 2,28 pg/ml.

Die zur Anwendung gebrachte 96-*well*-Mikrotiterplatte war bereits mit einem für CAIX typischen, monoklonalen Antikörper (*coating*-Antikörper) vorbeschichtet.

Vor der Durchführung des Assays war es nötig, die Reagenzien für die Analyse sowie das Probenmaterial, auf Raumtemperatur zu erwärmen. Darüber hinaus wurden die entsprechenden Reagenzien laut Arbeitsanleitung vorbereitet:

- Waschpuffer-Lösung: 20 ml des Puffer-Konzentrats wurden in 480 ml dH<sub>2</sub>O gelöst, um in Summe 500 ml des Waschpuffers zu erhalten.
- CAIX-Standard: der lyophilisierte CAIX-Standard enthält 10 ng rekombinante humane CAIX und wurde in 1 ml der vorgefertigten Kalibrierlösung gelöst. Die so erzeugte *Stammlösung* enthielt 10000 pg/ml CAIX und musste für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert werden, bevor sie zur Anwendung gebracht werden konnte.
- Substrat-Lösung: Die vorgefertigten Farbreagenzien A und B wurden im Verhältnis 1:1 vermischt. In jedes *well* sollten 200 µl der Substrat-Lösung pipettiert werden, sodass eine ausreichende Menge von 20 ml

generiert werden musste. Die Lösung musste innerhalb von 15 min zur Anwendung gebracht und lichtgeschützt gelagert werden.

Um die Standardreihe zu erhalten, musste eine Verdünnungsreihe der zuvor generierten CAIX-Stammlösung erstellt werden. Zu diesem Zweck wurden sieben Röhrchen mit absteigenden Konzentrationen der Stammlösung generiert:

Zunächst wurden 900 µl der vorgefertigten Kalibrierlösung in das erste Röhrchen pipettiert. In die verbleibenden sechs Röhrchen wurden jeweils 500 µl der gleichen Lösung eingebracht. In das erste Röhrchen wurden nun 100 µl der Stammlösung pipettiert, welches somit eine CAIX-Konzentration von 1000 pg/ml enthielt. Der Inhalt dieses Röhrchens wurde gut vermischt und im Anschluss wurden 500 µl entnommen und in das zweite Röhrchen pipettiert, welches nun eine CAIX-Konzentration von 500 pg/ml enthielt. Dieser Vorgang wurde fortgesetzt bis alle sieben Röhrchen jeweils die Hälfte der Konzentration des vorherigen Röhrchens enthielten. (1000 pg/ml; 500 pg/ml; 250 pg/ml; 125 pg/ml; 62.5 pg/ml; 31.2 pg/ml; 15.6 pg/ml).

Die Kalibrierlösung selbst diente als Nullwert (0 pg/ml).

Nach den entsprechenden Vorbereitungen wurden zunächst 50 µl einer vorgefertigten Proteinlösung (*Assay Diluent*) in jedes der 96 *wells* der Mikrotiterplatte pipettiert. Daraufhin wurde die Standardreihe in den ersten beiden Blöcken der 96-*well*-Platte generiert, indem jeweils 100 µl der vorbereiteten Standardlösung in absteigenden Konzentrationen in die entsprechenden *wells* pipettiert wurden.

Die beiden verbleibenden *wells* wurden mit 100 µl der Kalibrierlösung befüllt (BLANK).

Im Anschluss wurden 100 µl des Probenmaterials in die verbleibenden *wells* pipettiert, wobei zur besseren Vergleichbarkeit, jedes EBC-Proben-*well* doppelt angelegt wurde (siehe Abb. 6).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1000	1000	EBC 07	EBC 17	EBC 28	EBC 32	EBC 36	EBC 01	EBC 06	EBC 15	EBC 20	EBC 41
B	500	500	RBC 07	EBC 17	EBC 28	EBC 32	EBC 36	EBC 01	EBC 06	EBC 15	EBC 20	EBC 41
C	250	250	RBC 09	EBC 25	EBC 29	EBC 33	EBC 37	EBC 02	EBC 08	EBC 16	EBC 21	EBC 42
D	125	125	EBC 09	EBC 25	EBC 29	EBC 33	EBC 37	EBC 02	EBC 08	EBC 16	EBC 21	EBC 42
E	62,5	62,5	EBC 13	EBC 26	EBC 30	EBC 34	EBC 38	EBC 03	EBC 10	EBC 18	EBC 22	EBC 44
F	31,2	31,2	EBC 13	EBC 26	EBC 30	EBC 34	EBC 38	EBC 03	EBC 10	EBC 18	EBC 22	EBC 44
G	15,6	15,6	EBC 14	EBC 27	EBC 31	EBC 35	EBC 39	EBC 04	EBC 11	EBC 19	EBC 40	EBC 45
H	BLANK	BLANK	EBC 14	EBC 27	EBC 31	EBC 35	EBC 39	EBC 04	EBC 11	EBC 19	EBC 40	EBC 45

Abb. 6 Verteilung des CAIX-Standards und der EBC-Proben innerhalb der 96-well-Mikrotiterplatte

Die 96-well-Mikrotiterplatte wurde daraufhin mit einem Klebestreifen versehen und für zwei Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttelgerät bei 550 rpm inkubiert. Die Klebestreifen dienen dazu, die Lösungen vor äußerlicher Verunreinigung zu schützen und auch eine Vermischung des unterschiedlichen Inhalts der verschiedenen wells zu vermeiden.

Während der Inkubationszeit erfolgte die Bindung des auf der Platte befindlichen CAIX-Antikörpers mit dem gesuchten CAIX-Antigen innerhalb der Proben.

Danach erfolgte die gründliche Waschung der Mikrotiterplatte mit der vorbereiteten Waschpuffer-Lösung in einem speziellen „Platwasher“ (96 Plate Washer™, Tecan Group Ltd., SWITZERLAND). Dieser Reinigungsvorgang wurde viermal wiederholt um sicherzustellen, dass alle Reste der Proben entfernt wurden, und sich nur noch das gebundene Antigen auf der Platte befand.

Im Anschluss wurden 200 µl eines weiteren, diesmal polyklonalen CAIX-spezifischen Antikörpers (*CAIX Conjugate*) in jedes well der Platte pipettiert. Dieser Antikörper bindet an eine andere Domäne der CAIX als der auf der Platte befindliche *coating*-Antikörper, und ist darüber hinaus mit dem Enzym **Meerrettich-Peroxidase** konjugiert.

Versehen mit einem neuen Klebestreifen wurde die Mikrotiterplatte für weitere zwei Stunden bei Raumtemperatur und 550 rpm auf dem Schüttelgerät inkubiert und daraufhin wiederum viermal mit der Waschpuffer-Lösung gereinigt.

Durch die Bindung dieses neuen Antikörpers an die CAIX erfolgte die Bildung des AK-Ag-AK-Komplexes.

Zum quantitativen Nachweis dieser Komplexe innerhalb der einzelnen *wells* wurden im Anschluss jeweils 200 µl der vorbereiteten chromogenen Substrat-Lösung in jedes der 96 *wells* pipettiert. Danach wurde die Mikrotiterplatte für 30 min auf einer lichtgeschützten, ebenen Fläche inkubiert.

Während der Inkubationszeit erfolgte, durch das Enzym Meerrettich-Peroxidase, die Umsetzung der Substrat-Lösung zu einem farblich sichtbaren Reaktionsprodukt. Die *wells*, die CAIX enthielten, erhielten durch diese Reaktion eine bläuliche Färbung.

Im Anschluss wurde in jedes der 96 *wells* 50 µl einer schwefelsäurehaltigen Lösung (*Stop Solution*) pipettiert um die Reaktion zu beenden, was innerhalb der AK-Ag-AK-Komplexe einen Farbumschlag von blau nach gelb initiierte (siehe Abb. 7).

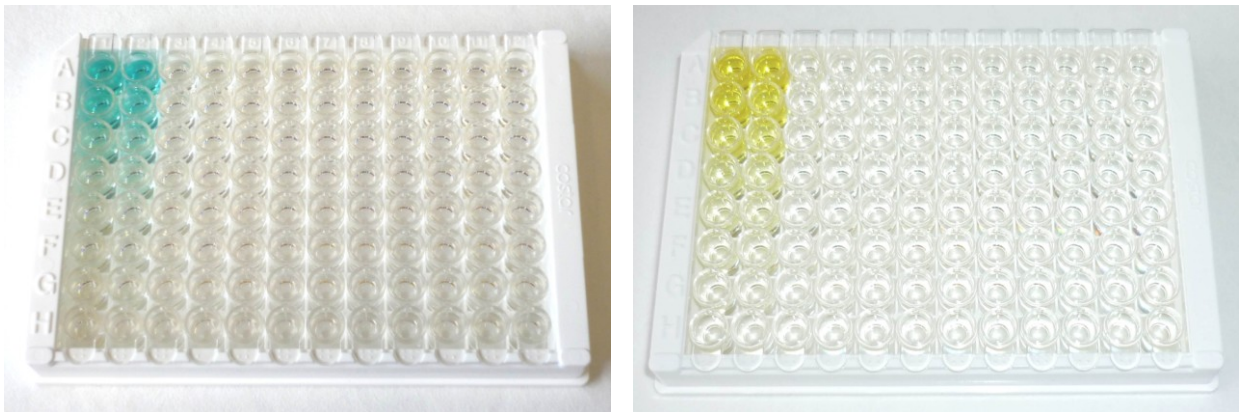


Abb. 7 CAIX-ELISA: Farbumschlag vor und nach Zugabe der Stop Solution

Unmittelbar danach wurde die optische Dichte (OD) der einzelnen *wells* der Mikrotiterplatte mit dem Photometer (SpectraMax<sup>®</sup> Plus<sup>384</sup>, Molecular Devices Corporation, California, USA) bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Wellenlängenkorrektur von 570 nm vermessen.

## 2.4.2 Nachweis des basic fibroblast growth factor

Der quantitative Nachweis der FGF-b-Konzentration innerhalb der EBC-Proben erfolgte ebenfalls mit der oben beschriebenen Sandwich-ELISA-Technik.

Für die Durchführung des Assays wurde der Human FGF basic Immunoassay von QUANTAKINE® (HSFB00D; R&D Systems Inc., Minneapolis, USA) verwendet.

Dieser Assay ermöglicht die Detektion von FGF-b bis zu einem mittleren minimalen Dosisbereich von 0,03 pg/ml.

Die zur Anwendung gebrachte 96-*well*-Mikrotiterplatte war bereits mit einem monoklonalen AK gegen FGF-b vorbeschichtet.

Vor der Durchführung des Assays mussten die Reagenzien für die Analyse, sowie das Probenmaterial, auf Raumtemperatur erwärmt werden. Darüber hinaus wurden die entsprechenden Reagenzien laut Arbeitsanleitung vorbereitet:

- Waschpuffer-Lösung: 100 ml des Puffer-Konzentrats wurden in 900 ml dH<sub>2</sub>O gelöst, um in Summe 1000 ml der Waschpuffer-Lösung zu erhalten.
- FGF-b-Standard: Das Fläschchen mit lyophilisiertem FGF-b-Standard enthielt 200 pg des humanen FGF-b und wurde mit 1 ml dH<sub>2</sub>O in Lösung gebracht um eine *Stammlösung* zu generieren, die 200 pg/ml FGF-b enthielt. Diese Stammlösung diente der Anfertigung einer Standard-Verdünnungsreihe und musste vor der Anwendung 15 min bei Raumtemperatur inkubiert werden.
- Substrat-Lösung: Das lyophilisierte, NADPH-haltige Substrat wurde mit 6 ml des entsprechenden Verdünnungsmittels (*Substrate Diluent*) in Lösung gebracht. Die Lösung musste innerhalb von 10 min angewendet werden.

- Verstärker-Lösung: *(Amplifier Solution)*  
Die innerhalb des Fläschchens befindlichen lyophilisierten Enzyme wurden mit dem entsprechenden Verdünnungsmittel *(Amplifier Diluent)* in Lösung gebracht und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Verwendung der so generierten Lösung musste ebenfalls binnen 10 min erfolgen.

Wie bereits beim CAIX-ELISA beschrieben, wurde zunächst eine Standardreihe erstellt, wobei sieben Röhrchen mit absteigenden Konzentrationen der zuvor gemischten Stammlösung generiert wurden:

Die Endkonzentrationen der Standardreihe enthielten 20 pg/ml, 10 pg/ml, 5 pg/ml, 2.5 pg/ml, 1.25 pg/ml, 0.625 pg/ml und 0.313 pg/ml FGF-b.

Die Kalibrierlösung selbst diente als Nullwert (0 pg/ml).

Nach den entsprechenden Vorbereitungen wurden zunächst 100 µl einer vorgefertigten Proteinlösung *(Assay Diluent)* in jedes der 96 *wells* der Mikrotiterplatte pipettiert. Daraufhin wurde die Standardreihe in den ersten beiden Blöcken der 96-*well*-Platte generiert, indem jeweils 100 µl der vorbereiteten Standardlösung in absteigenden Konzentrationen in die entsprechenden *wells* pipettiert wurden.

Die beiden verbleibenden *wells* wurden mit 100 µl der Kalibrierlösung befüllt (BLANK).

Im Anschluss wurden 100 µl des Probenmaterials in die verbleibenden *wells* pipettiert, wobei zur besseren Vergleichbarkeit, jedes EBC-Proben-*well* doppelt angelegt wurde (siehe Abb. 8).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	20	20	EBC 07	EBC 17	EBC 28	EBC 32	EBC 36	EBC 01	EBC 06	EBC 15	EBC 20	EBC 41
B	10	10	RBC 07	EBC 17	EBC 28	EBC 32	EBC 36	EBC 01	EBC 06	EBC 15	EBC 20	EBC 41
C	5	5	RBC 09	EBC 25	EBC 29	EBC 33	EBC 37	EBC 02	EBC 08	EBC 16	EBC 21	EBC 42
D	2,5	2,5	EBC 09	EBC 25	EBC 29	EBC 33	EBC 37	EBC 02	EBC 08	EBC 16	EBC 21	EBC 42
E	1,25	1,25	EBC 13	EBC 26	EBC 30	EBC 34	EBC 38	EBC 03	EBC 10	EBC 18	EBC 22	EBC 44
F	0,625	0,625	EBC 13	EBC 26	EBC 30	EBC 34	EBC 38	EBC 03	EBC 10	EBC 18	EBC 22	EBC 44
G	0,313	0,313	EBC 14	EBC 27	EBC 31	EBC 35	EBC 39	EBC 04	EBC 11	EBC 19	EBC 40	EBC 45
H	BLANK	BLANK	EBC 14	EBC 27	EBC 31	EBC 35	EBC 39	EBC 04	EBC 11	EBC 19	EBC 40	EBC 45

Abb. 8 Verteilung des FGF-b-Standards und der EBC-Proben innerhalb der 96-well-Mikrotiterplatte

Die 96-well-Mikrotiterplatte wurde daraufhin mit einem Klebestreifen versehen und für zwei Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttelgerät bei 550 rpm inkubiert. Die Klebestreifen dienten dazu, die Lösungen vor äußerlicher Verunreinigung zu schützen und auch eine Vermischung des unterschiedlichen Inhalts der verschiedenen wells zu vermeiden.

Während der Inkubationszeit erfolgte die Bindung des auf der Platte befindlichen FGF-b-Antikörpers mit dem gesuchten FGF-b-Antigen innerhalb der Proben.

Im Anschluss erfolgte die gründliche Reinigung der Mikrotiterplatte mit der vorbereiteten Waschpuffer-Lösung am „Platwasher“ (96 Plate Washer™, Tecan Group Ltd., SWITZERLAND). Dieser Vorgang wurde sechsmal wiederholt um alle Probenreste zu entfernen und zu garantieren, dass sich nur noch das gebundene Antigen auf der Platte befand.

Danach wurden 200 µl eines weiteren FGF-b-spezifischen Antikörpers (*FGF-b Conjugate*) in jedes well der Platte pipettiert. Dieser Antikörper bindet an eine andere Domäne des FGF-b als der auf der Platte befindliche *coating*-Antikörper, und ist zur Quantifizierung der gebildeten AK-Ag-AK-Komplexe mit dem Enzym **Alkalische Phosphatase** konjugiert.

Da dieses Enzym auch im menschlichen Speichel nachgewiesen wurde, war es von großer Relevanz während der Arbeit eine Maske und Handschuhe zu tragen, um das Probenmaterial nicht zu kontaminieren.

Versehen mit einem neuen Klebestreifen wurde die Mikrotiterplatte für weitere zwei Stunden bei Raumtemperatur und 550 rpm auf dem Schüttelgerät inkubiert und daraufhin wiederum sechsmal mit der Waschpuffer-Lösung gereinigt.

Im Anschluss daran wurden jeweils 50 µl der vorbereiteten Substrat-Lösung in alle *wells* der Mikrotiterplatte pipettiert und diese wiederum für eine weitere Stunde, wie oben beschrieben, auf dem Schüttelgerät inkubiert, um die enzymatische Farbreaktion ablaufen zu lassen.

Nach der Inkubationszeit wurden 50 µl der zuvor vorbereiteten Verstärker-Lösung in alle *wells* der Mikrotiterplatte pipettiert und die Platte für weitere 30 min auf dem Schüttelgerät inkubiert. Durch die Zugabe der Verstärker-Lösung erfolgte eine Intensivierung der Farbreaktion (siehe Abb. 9).

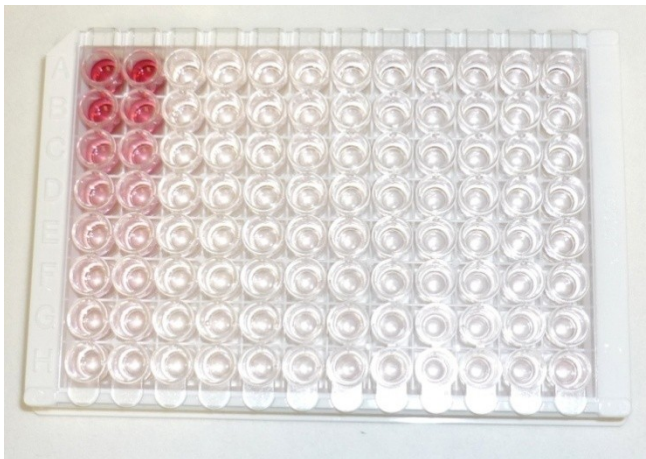


Abb. 9 *FGF-b-ELISA: Farbintensivierung nach Zugabe der Amplifier Solution*

Im Anschluss daran erfolgte durch Pipettieren von 50 µl einer schwefelsäurehaltigen Lösung (*Stop Solution*) in alle 96 *wells* das Ende der Reaktion, was bei diesem Assay *keinen Farbumschlag* initiierte.

Unmittelbar danach wurde die optische Dichte (OD) der einzelnen *wells* der Mikrotiterplatte mit dem Photometer (SpectraMax<sup>®</sup> Plus<sup>384</sup>, Molecular Devices Corporation, California, USA) bei einer Wellenlänge von 490 nm und einer Wellenlängenkorrektur von 690 nm vermessen.

### 2.4.3 Nachweis der Laktatdehydrogenase

Zur Quantifizierung der LDH-Aktivität innerhalb des EBC wurde der *Lactate Dehydrogenase Assay Kit* (K726-500, BioVision, California, USA) zur Anwendung gebracht.

Hierbei handelt es sich um ein colorimetrisches Analyseverfahren, welches auf der LDH-vermittelten Reduktion von NAD zu NADH beruht. Durch die Zugabe einer spezifischen Substanz, die mit dem gebildeten NADH interagiert, kommt es zu einer LDH-Aktivitäts-abhängigen Farbreaktion.

Dadurch garantiert dieses kostengünstige und einfach anwendbare Nachweisverfahren die Detektion von 1-100 mU/ml LDH.

Vor der Durchführung wurden die benötigten Reagenzien entsprechend der Arbeitsanleitung vorbereitet:

- Substratgemisch: wurde auf Raumtemperatur erwärmt und mit 1 ml dH<sub>2</sub>O in Lösung gebracht
- NADH-Standard-Lösung: Ampulleninhalt wurde mit 0,4 ml ddH<sub>2</sub>O vermengt, um die 1,25 mM NADH-Standard-Lösung zu generieren
- LDH-Positiv-Kontrolle: wurde mit dem zuvor auf Raumtemperatur erwärmten Puffer im Verhältnis 1:10 vermischt
- Reaktionsgemisch: Für jedes *well* der Mikrotiterplatte mussten 50 µl generiert werden, wobei 48 µl der Pufferlösung mit 2 µl des Substratgemischs vermengt wurden. Um eine ausreichende Menge des Reaktionsgemischs für alle 96 *wells* zur Verfügung zu haben, wurden in Summe 5 ml generiert.

Bis zur Durchführung des Assays wurde die LDH-Positiv-Kontrolle gemeinsam mit den EBC-Proben auf Eis gelagert.

Im Anschluss musste die NADH-Standardkurve generiert werden. Hierzu wurden in die ersten beiden Blöcke der 96-*well*-Platte 10, 8, 6, 4, 2 und 0 µl der Standardlösung

pipettiert um 12.5, 10.0, 7.5, 5.0, 2.5 und 0 nmol des NADH-Standards innerhalb der entsprechenden *wells* zu generieren. Die zwei verbleibenden *wells* der beiden Standardblöcke wurden einerseits mit 50  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O (BLANK), andererseits mit 5  $\mu$ l der Positivkontrolle befüllt.

Das verbleibende Volumen wurde mit Hilfe der Pufferlösung auf jeweils 50  $\mu$ l gebracht.

In weiterer Folge wurden in die verbleibenden *wells* jeweils 50  $\mu$ l des Probenmaterials pipettiert, wobei zur besseren Vergleichbarkeit jedes EBC-Proben-*well* doppelt angelegt wurde (siehe Abb. 10).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	12,5	12,5	EBC 07	EBC 17	EBC 28	EBC 32	EBC 36	EBC 01	EBC 06	EBC 15	EBC 20	EBC 41
B	10	10	RBC 07	EBC 17	EBC 28	EBC 32	EBC 36	EBC 01	EBC 06	EBC 15	EBC 20	EBC 41
C	7,5	7,5	RBC 09	EBC 25	EBC 29	EBC 33	EBC 37	EBC 02	EBC 08	EBC 16	EBC 21	EBC 42
D	5	5	EBC 09	EBC 25	EBC 29	EBC 33	EBC 37	EBC 02	EBC 08	EBC 16	EBC 21	EBC 42
E	2,5	2,5	EBC 13	EBC 26	EBC 30	EBC 34	EBC 38	EBC 03	EBC 10	EBC 18	EBC 22	EBC 44
F	0	0	EBC 13	EBC 26	EBC 30	EBC 34	EBC 38	EBC 03	EBC 10	EBC 18	EBC 22	EBC 44
G	BLANK	BLANK	EBC 14	EBC 27	EBC 31	EBC 35	EBC 39	EBC 04	EBC 11	EBC 19	EBC 40	EBC 45
H	positiv	positiv	EBC 14	EBC 27	EBC 31	EBC 35	EBC 39	EBC 04	EBC 11	EBC 19	EBC 40	EBC 45
	Standard		EBC-Kontrollen				EBC-Patienten					

Abb. 10 Verteilung des NADH-Standards und der EBC-Proben innerhalb der 96-*well*-Mikrotiterplatte

50  $\mu$ l des zuvor, wie oben beschrieben, in ausreichender Menge vorbereiteten Reaktionsgemischs wurde nun in **alle** *wells* der Mikrotiterplatte pipettiert und gut vermischt.

Im Anschluss daran erfolgte die unmittelbare Messung der optischen Dichte (OD) der einzelnen *wells* bei einer Wellenlänge von 450 nm mittels Photometer (SpectraMax<sup>®</sup> Plus<sup>384</sup>, Molecular Devices Corporation, California, USA).

Die erhobenen Werte zum Zeitpunkt  $t_0$  (= 0 min) wurden vermerkt und die Mikrotiterplatte für 60 min bei 37°C inkubiert.

Es folgte eine erneute Messung der OD 450 nach 60 min, also zum Zeitpunkt  $t_1$ .

Die ermittelten Werte präsentierten die innerhalb der einzelnen wells vorliegende mittlere NADH-Konzentration, durch die die LDH-Aktivität mit folgender Formel berechnet werden konnte:

$$\text{LDH-Aktivität} = \frac{B}{(T1 - T0) \times V} = \frac{\text{nmol}}{\text{min}} / \text{ml} = \text{mU} / \text{ml}$$

*T0* Zeitpunkt der ersten Messung in min

*T1* Zeitpunkt der zweiten Messung in min

*B* NADH-Menge die zwischen den beiden Messungen generiert wurde, also  $\Delta\text{NADH}_{450\text{nm}} = [\text{NADH}]_{T1} - [\text{NADH}]_{T0}$  in nmol

*V* Volumen der einzelnen Proben, das für den Reaktionsablauf verwendet wurde in ml

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1 CAIX-AUSWERTUNG

Nach der Durchführung des Assays erfolgt die Vermessung der optischen Dichte mittels Photometer bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Wellenlängenkorrektur von 570 nm.

Für die **Standardreihe** ergaben sich hierbei folgende Werte der OD 450:

CAIX-Standard (pg/ml)	Mittelwert OD 450nm
1000	1,35
500	0,801
250	0,349
125	0,122
62,5	0,095
31,2	0,05
15,6	0,018

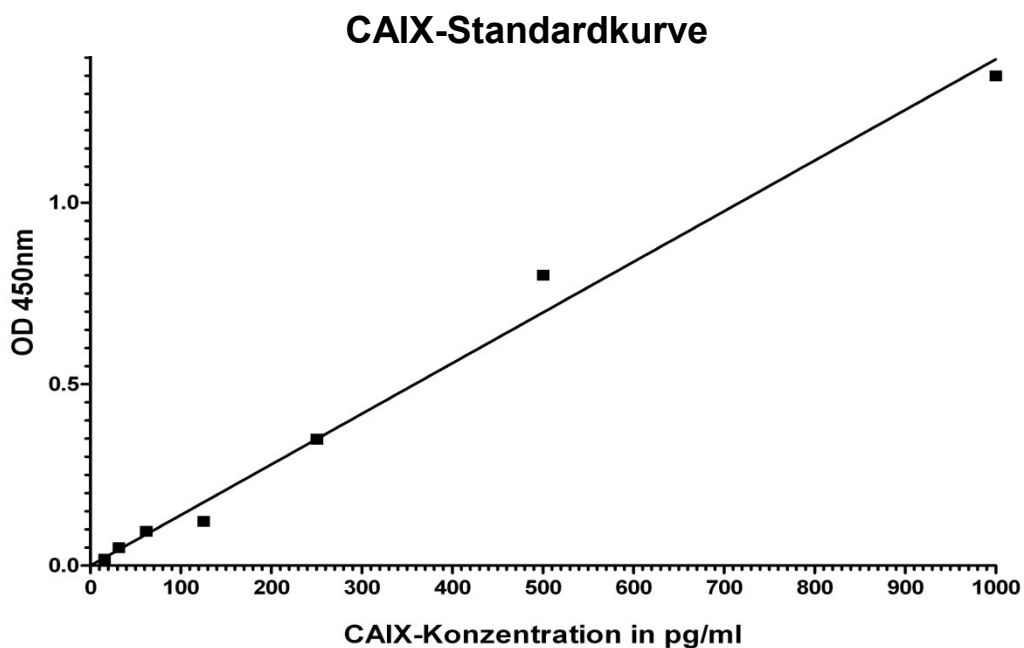


Abb. 11 CAIX-Standardreihe und Standardkurve

Je eher die ermittelten Messwerte der Standardreihe auf einer Geraden lagen, desto exakter war die Durchführung des Assays.

Aus der gemessenen OD errechnete das Photometer die in den einzelnen *wells* befindliche CAIX-Konzentration für das PatientInnen- bzw. das Kontrollkollektiv, wobei sich folgende Werte ergaben:

EBC-PatientInnenen		EBC-Kontrollen	
EBC-Proben	Mittelwerte CAIX Konzentration (pg/ml)	EBC-Proben	Mittelwerte CAIX Konzentration (pg/ml)
EBC 01	0	EBC 07	0
EBC 02	0	EBC 09	0
EBC 03	0	EBC 13	0
EBC 04	0	EBC 14	0
EBC 06	0	EBC 17	0
EBC 08	0	EBC 25	0
EBC 10	0	EBC 26	0
EBC 11	0	EBC 27	0
EBC 15	0	EBC 28	0
EBC 16	0	EBC 29	0
EBC 18	0	EBC 30	0
EBC 19	0	EBC 31	0
EBC 20	0	EBC 32	0
EBC 21	0	EBC 33	0
EBC 22	0	EBC 34	0
EBC 40	0	EBC 35	0
EBC 41	0	EBC 36	0
EBC 42	0	EBC 37	0
EBC 44	0	EBC 38	0
EBC 45	0	EBC 39	0

Tabelle 2 CAIX-Konzentrationen (pg/ml) im EBC des PatientInnen- und des Kontrollkollektivs

Nach Subtraktion des Nullwertes (BLANK) durch das Photometer befanden sich alle Werte im negativen Bereich und wurden auf Null gesetzt.

Die negativen Ergebnisse waren darauf zurückzuführen, dass sich der BLANK mit einem leicht höheren Wert präsentierte als alle Proben-Werte, was möglicherweise auf einen Fehler bei der Generierung der Standardkurve beruhte.

Es zeigt sich, dass in **keiner der Proben, weder innerhalb des PatientInnen-, noch innerhalb des Kontrollkollektivs**, mittels des durchgeführten Assays eine ausreichende Konzentration der CAIX nachgewiesen werden konnte.

***Alle EBC-Proben waren frei von CAIX.***

### 3.2 FGF-b-AUSWERTUNG

Unmittelbar nach der Durchführung des Assays erfolgte die Vermessung der 96-well-Mikrotiterplatte mittels Photometer bei einer Wellenlänge von 490 nm, und einer Wellenlängenkorrektur von 690 nm.

Für die **Standardreihe** ergaben sich hierbei folgende Werte der OD 450:

FGF-b-Standard (pg/ml)	Mittelwert OD 450nm
20	1,171
10	0,797
5	0,348
2,5	0,177
1,25	0,083
0,625	0,047
0,313	0,021

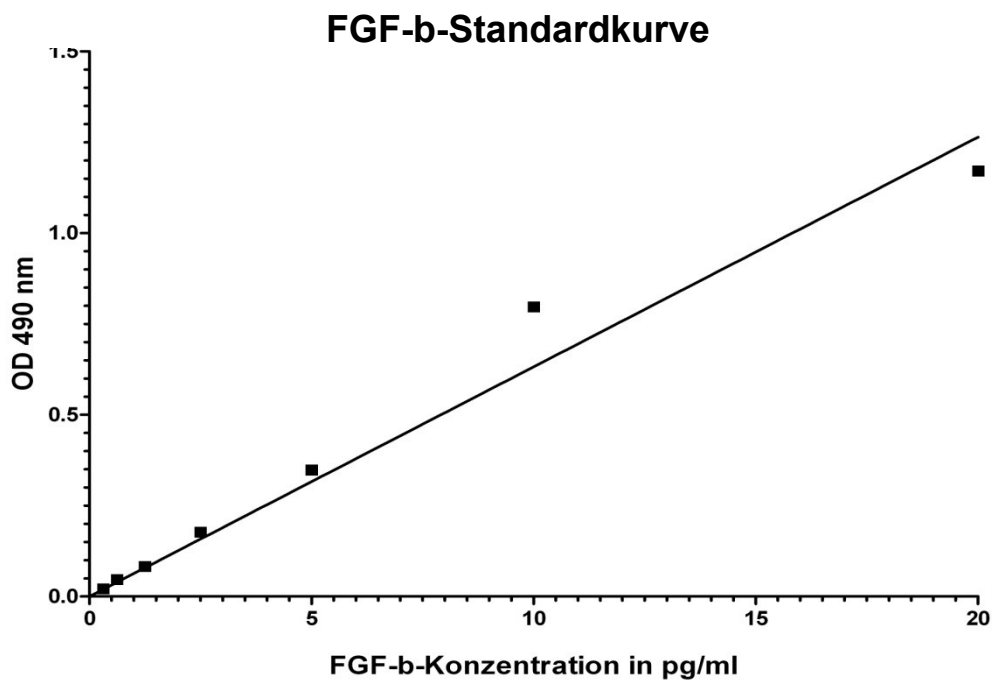


Abb. 12 FGF-b-Standardreihe und Standardkurve

Je eher die ermittelten Messwerte der Standardreihe auf einer Geraden lagen, desto exakter war die Durchführung des Assays.

Aus der gemessenen OD errechnete das Photometer die in den einzelnen *wells* befindliche FGF-b-Konzentration für das PatientInnen- bzw. das Kontrollkollektiv, wobei sich folgende Werte ergaben:

EBC-PatientInnenen		EBC-Kontrollen	
EBC-Proben	Mittelwerte FGF-b Konzentration (pg/ml)	EBC-Proben	Mittelwerte FGF-b Konzentration (pg/ml)
EBC 01	0	EBC 07	0
EBC 02	0	EBC 09	0
EBC 03	0	EBC 13	0
EBC 04	0	EBC 14	0
EBC 06	0	EBC 17	0
EBC 08	0	EBC 25	0
EBC 10	0	EBC 26	0
EBC 11	0	EBC 27	0
EBC 15	0	EBC 28	0
EBC 16	0	EBC 29	0
EBC 18	0	EBC 30	0
EBC 19	0	EBC 31	0
EBC 20	0	EBC 32	0
EBC 21	0	EBC 33	0
EBC 22	0	EBC 34	0
EBC 40	0	EBC 35	0
EBC 41	0	EBC 36	0
EBC 42	0	EBC 37	0
EBC 44	0	EBC 38	0
EBC 45	0	EBC 39	0

Tabelle 3 FGF-b-Konzentrationen (pg/ml) im EBC des PatientInnen- und des Kontrollkollektivs

Nach Subtraktion des Nullwertes (BLANK) durch das Photometer befanden sich alle Proben-Werte im negativen Bereich und wurden auf Null gesetzt.

Die negativen Ergebnisse waren darauf zurückzuführen, dass sich der BLANK mit einem leicht höheren Wert präsentierte als alle Proben-Werte, was möglicherweise auf einen Fehler bei der Generierung der Standardkurve beruhte.

Wie bereits bei der CAIX-Auswertung, konnte auch der FGF-b-ELISA den gesuchten Marker innerhalb des PatientInnen- oder des Kontrollkollektivs nicht nachweisen.

**Alle EBC-Proben waren frei von FGF-b.**

### 3.3 LDH-AUSWERTUNG

Unmittelbar nach der Durchführung des Assays erfolgte die Vermessung der optischen Dichte (OD) mittels Photometer bei einer Wellenlänge von 450 nm. Von den ermittelten Werten zu diesem **Zeitpunkt  $t_0$  (= nach 0 min)** wurde das arithmetische Mittel gebildet und die OD des Nullwertes (BLANK) subtrahiert.

Wie bereits bei der CAIX- und der FGF-b-Auswertung präsentierte sich auch innerhalb dieses Assays der BLANK mit einem höheren OD-Wert als die OD-Werte der meisten Proben, was zu negativen Ergebnissen nach der Subtraktion führte. Es besteht auch hier die Möglichkeit, dass bei der Generierung der Standardkurve ein Fehler aufgetreten ist.

Für das PatientInnen- und das Kontrollkollektiv ergaben sich dabei zum **Zeitpunkt  $t_0$**  folgende Werte:

EBC-PatientInnen		EBC-Kontrollen	
EBC-Proben	Mittelwerte OD 450nm	EBC-Proben	Mittelwerte OD 450 nm
EBC 01	0	EBC 07	0
EBC 02	0	EBC 09	0,02405
EBC 03	0	EBC 13	0
EBC 04	0	EBC 14	0,01605
EBC 06	0,0535	EBC 17	0,00325
EBC 08	0,0136	EBC 25	0
EBC 10	0,03405	EBC 26	0,0197
EBC 11	0	EBC 27	0,0589
EBC 15	0	EBC 28	0
EBC 16	0	EBC 29	0
EBC 18	0	EBC 30	0
EBC 19	0	EBC 31	0,00805
EBC 20	0	EBC 32	0,0108
EBC 21	0	EBC 33	0
EBC 22	0	EBC 34	0,01665
EBC 40	0	EBC 35	0,01345
EBC 41	0	EBC 36	0,04
EBC 42	0	EBC 37	0,02685
EBC 44	0	EBC 38	0,02425
EBC 45	0	EBC 39	0

Tabelle 4 OD 450 der EBC-Proben des PatientInnen- und des Kontrollkollektivs nach 0 min

Nachdem die 96-well-Mikrotiterplatte für 60 min bei 37°C inkubiert wurde, erfolgte eine erneute Vermessung und Berechnung der ermittelten Werte unter den oben genannten Bedingungen.

Für den Zeitpunkt  $t_1$  (= nach 60 min) ergaben sich folgende Werte:

EBC-PatientInnen		EBC-Kontrollen	
EBC-Proben	Mittelwerte OD 450nm	EBC-Proben	Mittelwerte OD 450nm
EBC 01	0	EBC 07	0
EBC 02	0	EBC 09	0
EBC 03	0	EBC 13	0,004
EBC 04	0	EBC 14	0,0425
EBC 06	0,0315	EBC 17	0,0215
EBC 08	0	EBC 25	0,032
EBC 10	0,0235	EBC 26	0,011
EBC 11	0	EBC 27	0,0715
EBC 15	0	EBC 28	0
EBC 16	0,001	EBC 29	0
EBC 18	0	EBC 30	0,0015
EBC 19	0	EBC 31	0,009
EBC 20	0	EBC 32	0
EBC 21	0	EBC 33	0,0195
EBC 22	0	EBC 34	0,587
EBC 40	0	EBC 35	0,05
EBC 41	0	EBC 36	0,1415
EBC 42	0	EBC 37	0,0265
EBC 44	0	EBC 38	0,001
EBC 45	0	EBC 39	0,008

Tabelle 5 OD 450 der EBC-Proben des PatientInnen- und des Kontrollkollektivs nach 60 min

Die Werte für die Generierung der **Standardkurve** wurden ebenfalls zum **Zeitpunkt  $t_1$**  erhoben:

**A**

NADH-Standard (nmol)	Mittelwert OD 450nm
12,5	0,517
10	0,404
7,5	0,295
5	0,161
2,5	0,109
0	0

**B**

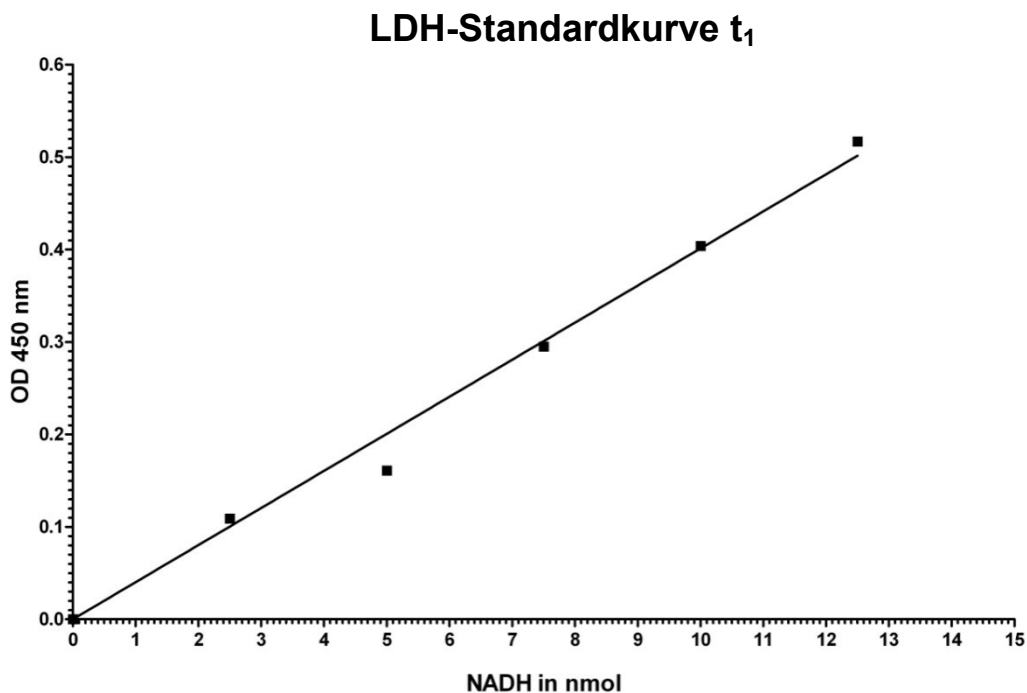


Abb. 13 (A) LDH-Standardreihe (B) LDH-Standardkurve

Je eher die ermittelten Messwerte der Standardreihe auf einer Geraden lagen, desto exakter war die Durchführung des Assays.

Um die **LDH-Aktivität** der erhobenen Werte zu errechnen, wurde die oben beschriebene Formel zur Anwendung gebracht. Da sich bei der Messung der OD zum größten Teil negative Werte ergaben, wurden diese vor der Berechnung automatisch auf Null gesetzt.

Für die **LDH-Aktivität** innerhalb der Proben des PatientInnen- und Kontrollkollektivs ergaben sich demnach folgende Werte:

EBC-PatientInnen		EBC-Kontrollen	
EBC-Proben	LDH-Aktivität (mU/ml)	EBC-Proben	LDH-Aktivität (mU/ml)
EBC 01	0	EBC 07	0
EBC 02	0	EBC 09	0
EBC 03	0	EBC 13	0,03
EBC 04	0	EBC 14	0,2
EBC 06	0	EBC 17	0,13
EBC 08	0	EBC 25	0,24
EBC 10	0,008333333	EBC 26	0
EBC 11	0	EBC 27	0,09
EBC 15	0	EBC 28	0
EBC 16	0	EBC 29	0
EBC 18	0	EBC 30	0,01
EBC 19	0	EBC 31	0,003333333
EBC 20	0	EBC 32	0
EBC 21	0	EBC 33	0,16
EBC 22	0	EBC 34	4,816666667
EBC 40	0	EBC 35	0,266666667
EBC 41	0	EBC 36	0,833333333
EBC 42	0	EBC 37	0
EBC 44	0	EBC 38	0
EBC 45	0	EBC 39	0,06

Tabelle 6 LDH-Aktivität im EBC von PatientInnen- und Kontrollkollektiv

Nur eine Probe des PatientInnenkollektivs war positiv auf LDH-Aktivität, wo hingegen innerhalb des Kontrollkollektivs 12 von 20 Proben positiv waren.

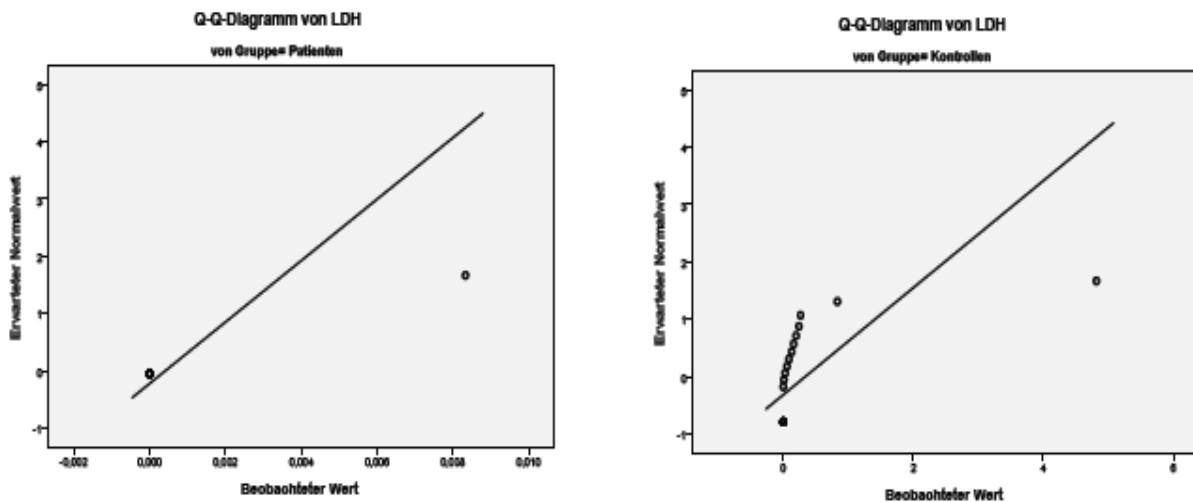
**A**

**Tests auf Normalverteilung**

Pat/Ko		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Statistik	df	Signifikanz	Statistik	df	Signifikanz
LDH	Patienten	,538	20	,000	,236	20	,000
	Kontrollen	,428	20	,000	,346	20	,000

a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

**B**



**C**

**Hypothesentestübersicht**

	Nullhypothese	Test	Sig.	Entscheidung
<b>1</b>	Die Verteilung von LDH ist in den Kategorien von Pat/Ko identisch.	Mann-Whitney-U-Test bei unabhängigen Stichproben	,000	Nullhypothese ablehnen

Abb. 14 SPSS-Analyse zur LDH-Aktivität. (A) Innerhalb der verglichenen Gruppen war in Bezug auf die LDH-Aktivität unter Anwendung des Kolmogorov-Smirnov-Tests keine Normalverteilung zu verzeichnen ( $p < 0,001$ ). (B) Graphische Darstellung der Normalverteilung mittels Q-Q-Diagramm. (C) Zur Prüfung ob ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen besteht wurde der Mann-Whitney-U-Test angewandt. Anm. zum Q-Q-Diagramm: Je eher sich die ermittelten Werte auf einer Geraden befinden, desto eher folgen sie einer Normalverteilung.

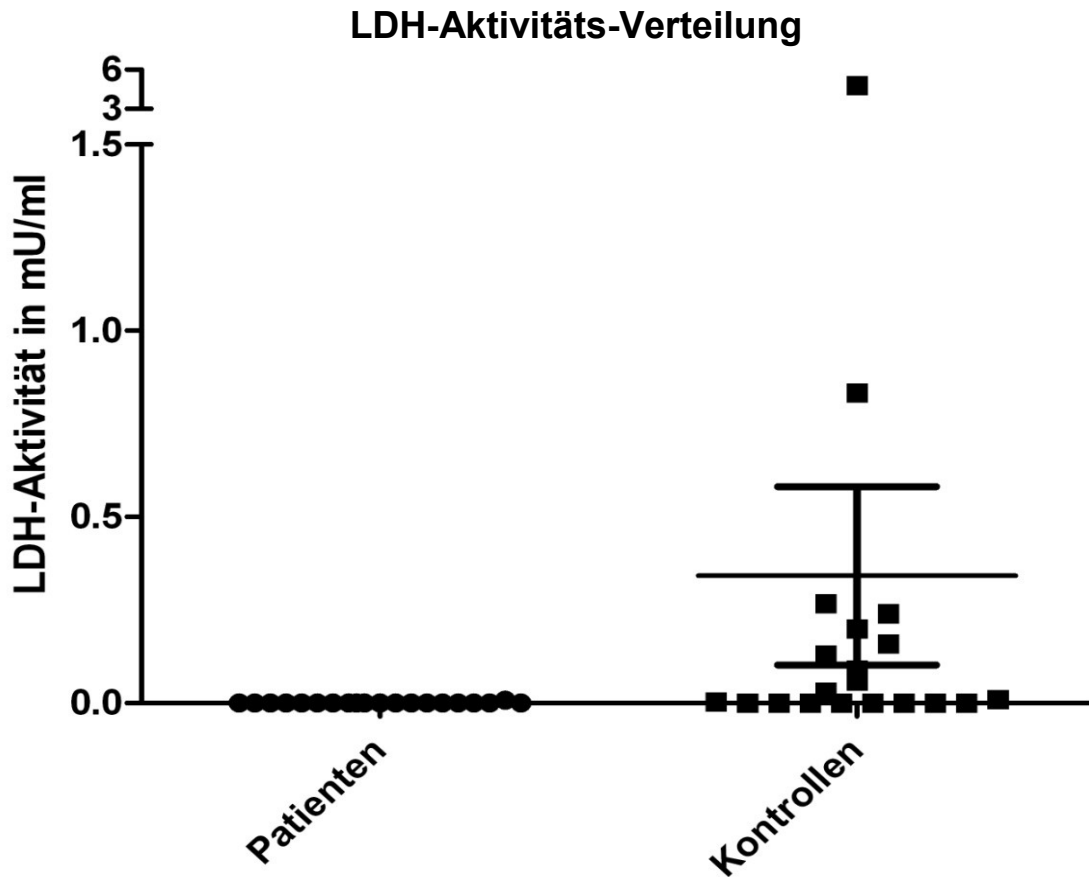


Abb. 15 *LDH-Aktivitäts-Verteilung in PatientInnen- und Kontrollkollektiv*

Die **Nullhypothese** (=Verteilung der LDH-Aktivitäts-Werte ist innerhalb des PatientInnen- und des Kontrollkollektivs gleich) wird mit einer Signifikanz von  $p < 0,001$  **abgelehnt**.

**Es ergab sich ein signifikanter Unterschied der LDH-Aktivitäts-Werte des PatientInnen- und des Kontrollkollektivs.**

### 3.4 AUSWERTUNG DER BGA

Unmittelbar nach der Akquirierung der EBC-Proben an der Patientin/ am Patienten und an der Kontrollpopulation erfolgte die Vermessung des pH-Wertes und des pCO<sub>2</sub> mittels eines Radiometer Blutgasanalysators.

Für PatientInnen und Kontrollkollektiv konnten hierbei folgende Werte ermittelt werden:

EBC-PatientInnen			EBC-Kontrollen		
EBC-Proben	pH	pCO <sub>2</sub> mmHg	EBC-Proben	pH	pCO <sub>2</sub> mmHg
EBC 01	6,46	13	EBC 07	6,91	unter Ref.
EBC 02	unter Ref.	31,3	EBC 09	7,02	4,8
EBC 03	7,25	7,9	EBC 13	6,73	8,5
EBC 04	7,51	unter Ref.	EBC 14	7,06	8,2
EBC 06	7,55	unter Ref.	EBC 17	6,49	5,6
EBC 08	6,37	10,7	EBC 25	7,23	6,4
EBC 10	6,57	3,5	EBC 26	7,32	5,7
EBC 11	6,64	3,2	EBC 27	7,12	unter Ref.
EBC 15	7,3	9,1	EBC 28	6,61	unter Ref.
EBC 16	6,66	6,1	EBC 29	7,36	6,2
EBC 18	7,63	10,2	EBC 30	7,23	5,7
EBC 19	6,75	5,2	EBC 31	7,23	5,8
EBC 20	7,02	6	EBC 32	7,21	6,2
EBC 21	7,04	unter Ref.	EBC 33	7	unter Ref.
EBC 22	6,99	8,1	EBC 34	7	unter Ref.
EBC 40	7,34	unter Ref.	EBC 35	7,25	5,5
EBC 41	7,23	3,7	EBC 36	7,3	unter Ref.
EBC 42	6,93	3,6	EBC 37	6,67	unter Ref.
EBC 44	7,25	7,8	EBC 38	7,16	unter Ref.
EBC 45	7,09	4	EBC 39	6,8	unter Ref.

Tabelle 7 pH und pCO<sub>2</sub>-Werte im EBC des PatientInnen und des Kontrollkollektivs

Im PatientInnenkollektiv befand sich bei der **pH-Auswertung ein Wert** unterhalb des messbaren Bereichs, bei der **pCO<sub>2</sub>-Messung** lagen insgesamt **13** (4 beim PatientInnen-, 9 beim Kontrollkollektiv) **Werte** außerhalb des Referenzbereichs, sodass auf eine genauere Analyse des pCO<sub>2</sub> aus Mangel an verwertbaren Daten verzichtet werden musste.

### 3.4.1 Analyse des pH-Wertes

A

**Gruppenstatistiken**

	Pat/Ko	N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
pH	Patienten	19	7,03053	,374277	,085865
	Kontrollen	20	7,03500	,256382	,057329

B

**Test bei unabhängigen Stichproben**

		Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit	
		F	Signifikanz	T	df
pH	Varianzen sind gleich	2,841	,100	-,044	37
	Varianzen sind nicht gleich			-,043	31,664

C

**Test bei unabhängigen Stichproben**

		T-Test für die Mittelwertgleichheit		
		Sig. (2-seitig)	Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz
pH	Varianzen sind gleich	,965	-,004474	,102266
	Varianzen sind nicht gleich	,966	-,004474	,103244

Abb.16 SPSS-Analyse zum EBC-pH. (A) Gruppenstatistiken. (B) Tests auf Normalverteilung: Da eine Normalverteilung besteht, kann für den Vergleich der Gruppen der T-Test herangezogen werden. (C) Der Gruppenvergleich mittels T-Test ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen.

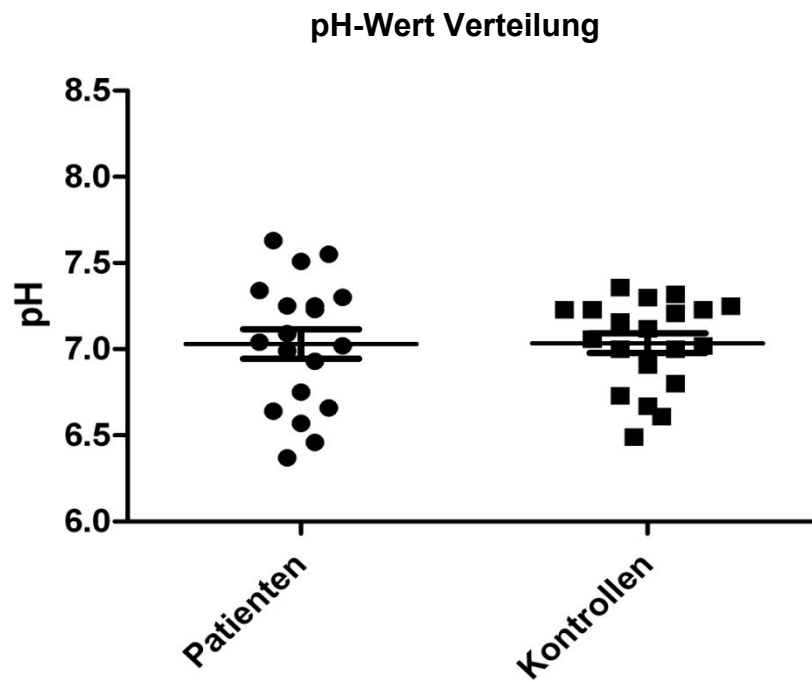


Abb. 17 *pH-Wert-Verteilung in PatientInnen- und Kontrollkollektiv*

Die **Nullhypothese** (=Verteilung der pH-Werte ist innerhalb des PatientInnen- und des Kontrollkollektivs gleich) wird mit einer Signifikanz von 0,944 **beibehalten**.

**Es ergab sich kein Unterschied der pH-Werte des PatientInnen- und des Kontrollkollektivs.**

### 3.5 AUSWERTUNG KLINISCHER DATEN

Neben der Akquirierung des EBC-Materials wurden von den teilnehmenden PatientInnen, wie oben bereits erwähnt, auch klinische Daten über Tumortypus und Tumorstadium erhoben.

Die entsprechenden Daten wurden mit den gemessenen pH-Werten in Korrelation gebracht.

Die angeführte Tabelle fasst die erhobenen PatientInnendaten und die entsprechenden pH-Werte zusammen:

PATIENT/INNENKOLLEKTIV				
EBC-Proben	Tumortypus	Stadium		pH-Wert
EBC 01	NSCLC	T2N0M0	IB	6,46
EBC 02	NSCLC	T4N2M1	IV	unter Ref.
EBC 03	SCLC	limited disease		7,25
EBC 04	NSCLC	T2N2M1	IV	7,51
EBC 06	NSCLC	T4N3M1	IV	7,55
EBC 08	NSCLC	T3N0M0	IIB	6,37
EBC 10	NSCLC	T4N1M0	IIIA	6,57
EBC 11	SCLC	extensive disease		6,64
EBC 15	NSCLC	T2Mx	IB	7,3
EBC 16	NSCLC	T3NxMx	IIB	6,66
EBC 18	NSCLC	T2N2M1	IV	7,63
EBC 19	CUP			6,75
EBC 20	NSCLC	T2N3M0	IIIB	7,02
EBC 21	NSCLC	T3N0Mx	IIB	7,04
EBC 22	SCLC	limited disease		6,99
EBC 40	NSCLC	Rezidiv Tx		7,34
EBC 41	SCLC	extensive disease		7,23
EBC 42	SCLC	extensive disease		6,93
EBC 44	SCLC	extensive disease		7,25
EBC 45	NSCLC	Rezidiv Tx		7,09

Tabelle 8 Tumortypus, Tumorstadium und EBC-pH des PatientInnenkollektivs

Von den histologischen Tumorformen fanden sich innerhalb des Kollektivs 13 PatientInnen mit NSCLCs, zwei davon wiesen ein Rezidiv ihrer Erkrankung, mit bis zum Zeitpunkt dieser Analyse noch unklarem Stadium des Primärtumors, auf.

6 PatientInnen präsentierten sich mit SCLCs und bei einer Patientin/ einem Patienten konnte die Lokalisation des Primärtumors bis dato nicht mit Sicherheit klassifiziert werden (CUP).

Die **histologischen Tumorentitäten** wurden mit den entsprechenden **pH-Werten** in Korrelation gesetzt:

### A

**Gruppenstatistiken**

	VAR00003	N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
pH	NSCLC	12	7,04500	,441063	,127324
	SCLC	6	7,04833	,244329	,099747

### B

**Tests auf Normalverteilung<sup>b</sup>**

VAR00003	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistik	df	Signifikanz	Statistik	df	Signifikanz
pH	,153	20	,200	,917	20	,086
NSCLC	,144	12	,200 <sup>*</sup>	,927	12	,346
SCLC	,271	6	,190	,848	6	,153

a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

### C

**Test bei unabhängigen Stichproben**

		T-Test für die Mittelwertgleichheit		
		Sig. (2-seitig)	Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz
pH	Varianzen sind gleich	,987	-,003333	,195192
	Varianzen sind nicht gleich	,984	-,003333	,161743

Abb.18 SPSS-Analyse zu den EBC-pH-Werten von NSCLC- und SCLC-PatientInnen. (A) Gruppenstatistiken. (B) Tests auf Normalverteilung: Da eine Normalverteilung besteht, kann für den Vergleich der Gruppen der T-Test herangezogen werden. (C) Der Gruppenvergleich mittels T-Test ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen.

### pH-Wert Verteilung NSCLC vs. SCLC

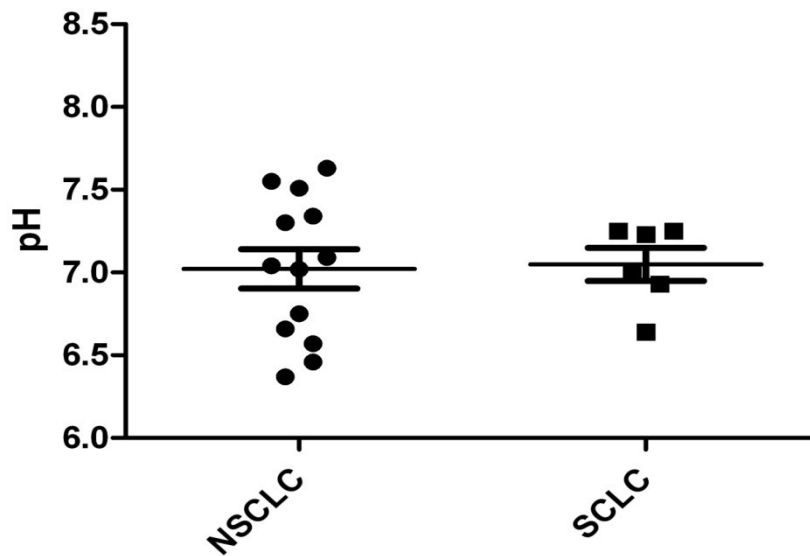


Abb.19 Verteilung der EBC-pH-Werte von NSCLC- und SCLC-PatientInnen

Die **Nullhypothese** (=Verteilung der pH-Werte ist innerhalb der NSCLC- und der SCLC-Gruppe gleich) wird mit einer Signifikanz von  $p = 0,987$  **nicht abgelehnt**.

**Innerhalb der histologischen Tumorentitäten ließ sich kein Unterschied in der Verteilung der pH-Werte ermitteln.**

Darüber hinaus wurden die **NSCLC-Tumorstadien (IB, IIB, IIIA, IIB vs. IV)** mit den entsprechenden **pH-Werten** in Korrelation gesetzt.

Für die **NSCLC-Gruppe** errechneten sich folgende Ergebnisse:

**A**

**Gruppenstatistiken**

VAR00004		N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
pH	Other	7	6,77429	,347460	,131328
	Stad. IV	3	7,56333	,061101	,035277

**B**

**Tests auf Normalverteilung**

VAR00004	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistik	df	Signifikanz	Statistik	df	Signifikanz
pH	,167	29	,038	,915	29	,023
Other	,200	7	,200 <sup>*</sup>	,925	7	,513
Stad. IV	,253	3	.	,964	3	,637

**C**

**Hypothesentestübersicht**

	Nullhypothese	Test	Sig.	Entscheidung
1	Die Verteilung von pH ist in den Kategorien von VAR00004 identisch.	Kruskal-Wallis-Test bei unabhängigen Stichproben	,004	Nullhypothese ablehnen

Abb. 20 SPSS-Analyse zu den EBC-pH-Werten in den verschiedenen NSCLC-Stadien. (A) Gruppenstatistiken. (B) Tests auf Normalverteilung: Da keine Normalverteilung besteht, wurde für den Vergleich der Gruppen der Kruskal-Wallis-Test herangezogen. (C) Der Gruppenvergleich mittels Kruskal-Wallis-Test ergab einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen.

### pH-Wert Verteilung NSCLC-Tumorstadien

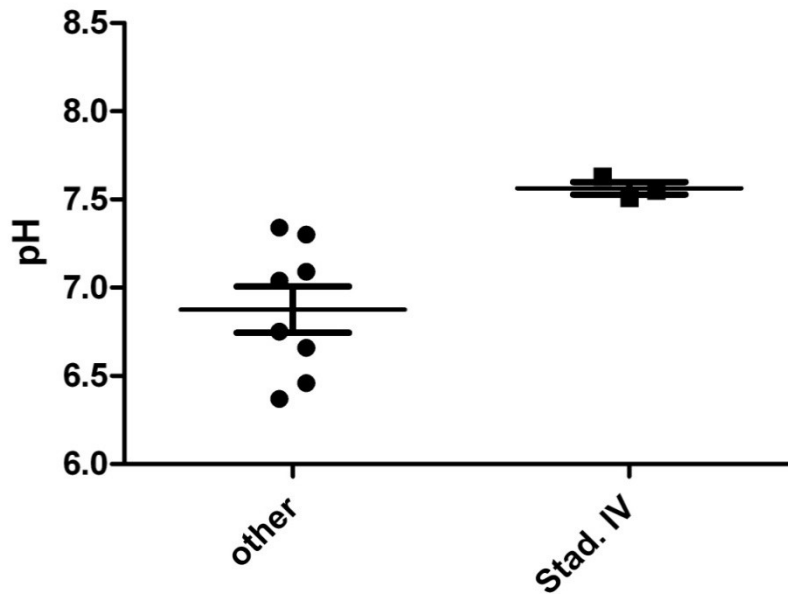


Abb. 21 Verteilung der EBC-pH-Werte innerhalb der verschiedenen NSCLC-Stadien

Die **Nullhypothese** (=Verteilung der pH-Werte ist innerhalb der einzelnen Tumorstadien gleich) wird mit einer Signifikanz von  $p = 0,004$  **verworfen**.

**Die NSCLC-PatientInnen mit Tumorstadium IV wiesen signifikant höhere pH-Werte auf, als die PatientInnen mit niedrigeren Erkrankungsstadien.**

Des Weiteren wurden die **SCLC-Tumorstadien (limited disease vs. extensive disease)** mit den entsprechenden **pH-Werten** in Korrelation gebracht.

**A**

**Gruppenstatistiken**

	VAR00002	N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
pH	L	2	7,12000	,183848	,130000
	E	4	7,01250	,288256	,144128

**B**

**Test bei unabhängigen Stichproben**

		T-Test für die Mittelwertgleichheit		
		Sig. (2-seitig)	Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz
pH	Varianzen sind gleich	,665	,107500	,230384
	Varianzen sind nicht gleich	,615	,107500	,194095

Abb. 22 SPSS-Analyse zu den EBC-pH-Werten in den verschiedenen SCLC-Stadien. (A) Gruppenstatistiken. (B) Der Gruppenvergleich mittels T-Test ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen. „L“ = „limited disease“; „E“ = „extensive disease“

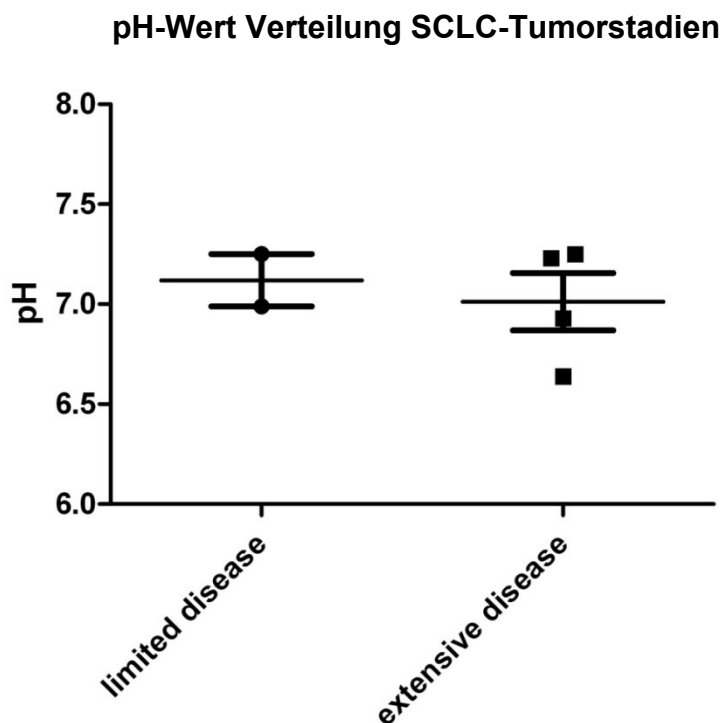


Abb. 23 Verteilung der EBC-pH-Werte innerhalb der verschiedenen SCLC-Stadien

Es ergab sich **kein signifikanter Unterschied** ( $p = 0,665$ ) innerhalb der pH-Wert-Verteilung der „limited disease“- und der „extensive disease“-Gruppe der SCLC-PatientInnen.

**Es wurde kein signifikanter Unterschied bei den pH-Werten des EBC von SCLC-Patienten in unterschiedlichen Tumorstadien festgestellt.**

## 4. DISKUSSION

Aktuell stellen bronchoskopisch-bioptische Techniken mit der Gewinnung und dem histologischen Nachweis von Tumorzellen das einzige zur Verfügung stehende Instrument zur Sicherung der Diagnose eines Bronchialkarzinoms dar. Die konsekutiv durchgeführten Maßnahmen zur Einschätzung der Prognose, der Operabilität oder der Evaluierung strahlen- oder chemotherapeutischer Therapieoptionen beruhen in erster Linie auf dem Ergebnis der bioptisch-histologischen Präparate.

Zur Evaluierung der Wirksamkeit der eingeleiteten Therapie kommen vor allem zeit- und kostenintensive radiologische Verfahren zur Abschätzung der Regression der Tumormasse zur Anwendung, die für die oft multimorbiden und supportiv-therapeutisch betreuten PatientInnen eine zusätzliche Belastung darstellen.

Darüber hinaus konnten sich nach wie vor weder geeignete radiologische Verfahren noch relevante Biomarker, beispielsweise im Serum, zum Screening von Risikopersonen etablieren, sodass die Diagnose eines Bronchialkarzinoms zumeist erst in fortgeschrittenen Tumorstadien mit schlechter Prognose gestellt werden kann. In Japan, den USA und Europa wurden in den 90er Jahren prospektive Studien durchgeführt, die die Früherkennung von Lungentumoren bei Risikopersonen, wie starken RaucherInnen oder Asbest-exponierten ArbeitnehmerInnen, mittels Niedrig-Dosis-CT (Low-dose-CT) zum Inhalt hatten (38). Keine der bis dato publizierten Studien konnte allerdings einen positiven Einfluss dieser radiologischen Screeningmethode auf die Mortalität der LungenkrebspatientInnen nachweisen.

Diese Tatsachen führen zu dem Schluss, dass ein dringender Bedarf für ein neues Instrument besteht, welches einerseits die frühdiagnostische Lücke beim Screening von Risikopersonen schließt und andererseits auch eine Kosten-Nutzen-Risiko-optimierte Möglichkeit der Therapiekontrolle für PatientInnen und Gesundheitssystem darstellt.

In ihrer 2008 publizierten klinischen Studie gelang es Dalaveris et al (37) mittels ELISA, einen Nachweis für die Existenz verschiedener relevanter Biomarker im EBC zu erbringen: Dabei wurden die TNF- $\alpha$ -, VEGF- und Isoprostan-8-Werte in EBC und Serum von 30 PatientInnen mit primären Lungenkarzinomen mit jenen von 15 bezüglich Alter und Geschlecht gematchten Kontrollen mittels ELISA verglichen. Ein statistisch signifikanter Unterschied ergab sich hierbei für die TNF- $\alpha$ -Konzentration, die sowohl im Serum ( $p = 0,035$ ) als auch im EBC ( $p < 0,0001$ ) der PatientInnen erhöht war. Für die gemessenen Werte der VEGF-Konzentrationen in EBC und Serum ergab sich ebenfalls eine signifikante Korrelation ( $p = 0,019$ ). Ferner konnte die Arbeitsgruppe eine erhöhte VEGF-Konzentration im EBC von PatientInnen mit Tumorstadium T3-T4 im Vergleich zu PatientInnen mit Tumorstadium T1-T2 ( $p = 0,047$ ) dokumentieren.

Darüber hinaus lagen die Serumkonzentrationen der PatientInnen in höheren Bereichen als jene des Kontrollkollektivs ( $p = 0,046$ ). Die Isoprostan-8-Konzentrationen von PatientInnen und Kontrollen unterschieden sich lediglich im Serum ( $p = 0,027$ ), innerhalb der EBC-Proben ließ sich keine Diskrepanz feststellen.

In Anlehnung an die oben umrissene Studie konzipierten wir ein exploratives Studiendesign mit dem Ziel, in dem von uns untersuchten Kollektiv, Unterschiede der Biomarker im EBC zwischen PatientInnen und einer Kontrollpopulation zu finden.

Innerhalb der von uns im Zeitraum von Mai 2010 bis Mai 2011 akquirierten EBC-Proben konnte mittels der angewandten Analyseverfahren allerdings kein Vorliegen einer messbaren CAIX- oder FGF-b-Konzentration nachgewiesen werden.

Verschiedene Studien belegen die Expression der von uns im EBC gesuchten Biomarker innerhalb verschiedenster Malignome, sowie im speziellen Fall auch für verschiedene Entitäten der Lungentumoren (32, 33, 36, 39, 41).

So untersuchten beispielsweise Giatromanolaki et al (32) den Einfluss der CAIX-Expression auf die Prognose von NSCLCs. Zu diesem Zweck wurde in Paraffin gebettetes bioptisches Material von 104 PatientInnen mit NSCLCs mittels immunhistochemischen Analyseverfahren auf die Anwesenheit von CAIX untersucht. Bei 39 von 104 PatientInnen (36,4 %) war, in erster Linie innerhalb der nekrotischen Tumoreareale, eine starke zytoplasmatische CAIX-Expression nachweisbar, was die

Überlebensrate der betroffenen PatientInnen negativ beeinflusste. Im tumorfreien Lungengewebe konnte keine Expression von CAIX nachgewiesen werden.

Darüber hinaus wird innerhalb der genannten Studie über eine signifikante Korrelation zwischen der CAIX-Expression innerhalb hypoxischer Tumorareale und der Überexpression des Rezeptors für FGF-b berichtet.

Eine weitere Arbeitsgruppe beschäftigte sich mit der Frage, ob CAIX, neben der Expression in den Tumoren selbst, auch innerhalb flüssiger Medien zum Nachweis gebracht werden kann (41). So beschrieben Závada et al in ihrer 2003 erschienen Studie, eine mittels Sandwich-ELISA nachgewiesene erhöhte Konzentration von CAIX in Serum und Urin von 50 PatientInnen mit klarzelligen Nierenkarzinomen. Innerhalb der Kontrollpopulation, größten Teils gesunde ProbandInnen, aber auch PatientInnen mit nicht karzinomatösen urologischen Krankheitsbildern, konnte kein Beweis für eine CAIX-Expression erbracht werden.

Die Tatsache, dass CAIX innerhalb verschiedener maligner Tumoren exprimiert wird, und darüber hinaus auch in gelöster Form, beispielsweise im Serum, detektierbar ist, steht daher außer Frage.

Vergleichbare Literatur über einen Nachweis oder einen entsprechenden Anstieg der CAIX-Konzentration im Serum oder EBC von BronchialkarzinompatientInnen liegt allerdings unseres Wissensstandes nach bis dato nicht vor.

Die entscheidende Relevanz des FGF-b für die Angiogeneese innerhalb maligner Tumoren und konsekutiv der negative Einfluss der FGF-b-Expression auf die Prognose wurde bereits durch verschiedene Studien belegt (33, 39).

Ueno et al (40) beschrieben in ihrer Arbeit den signifikanten Zusammenhang zwischen der erhöhten FGF-b-Konzentration im Serum von 106 LungenkrebspatientInnen (NSCLCs und SCLCs) und der Verschlechterung der klinischen Prognose. Der analytische Nachweis von FGF-b in den Sera wurde mittels ELISA vorgenommen, wobei sich die FGF-b-Konzentrationen des PatientInnenkollektivs signifikant von jenen des Kontrollkollektivs unterschieden ( $p < 0,05$ ).

Die Mittelwerte der jeweiligen Konzentrationen lagen beim Adenokarzinom bei 7,6, beim Plattenepithelkarzinom bei 7,4 und beim SCLC bei 7,1 pg/ml.

Die progressionsfördernde Rolle von FGF-b und anderer angiogenetischer Marker innerhalb solider Tumoren, lenkte das wissenschaftliche Interesse auf die Detektion dieser Moleküle innerhalb des Kondensats der Ausatemluft.

In ihrer 2010 erschienenen Arbeit, detektierten Gessner et al (42) FGF-b, VEGF und Angiogenin im EBC von PatientInnen mit NSCLCs. Innerhalb dieser Studie wurde das EBC von insgesamt 74 ProbandInnen akquiriert. Diese Population bestand aus 17 PatientInnen mit bestätigten NSCLCs vor Beginn der Therapie, 15 PatientInnen mit NSCLCs nach zwei Zyklen der entsprechenden Chemotherapie, sowie 15 PatientInnen mit stabiler und 15 mit akut exazerbierter COPD. Darüber hinaus wurde das EBC von 12 gesunden, freiwilligen NichtraucherInnen akquiriert. Nach vorangegangener Lyophilisation und Resuspension des EBC-Materials erfolgte die analytische Messung der gesuchten Marker mittels Durchflusszytometrie (cytometric bead array, CBA; Becton-Dickinson, California, USA).

Die Ergebnisse dokumentieren eine erhöhte mittlere Konzentration des FGF-b bei nicht-therapierten NSCLC-PatientInnen (82 pg/ml) im Vergleich zu allen anderen untersuchten Gruppen. So enthielt beispielsweise das EBC der gesunden Kontrollpopulation im Mittel nur 5,4 pg/ml FGF-b und auch bei den chemotherapeutisch behandelten PatientInnen mit partieller Tumorregression war eine vergleichsweise niedrige mittlere FGF-b-Konzentration von 13 pg/ml zu verzeichnen. Des Weiteren stellten sich die mittleren FGF-b-Konzentrationen der PatientInnen mit akut exazerbierter COPD im Vergleich zu jenen mit der stabilen Form als erhöht dar (13 pg/ml vs. 7 pg/ml).

Vergleichbare Konzentrationsverteilungen innerhalb der untersuchten Gruppen wurden auch für Angiogenin und VEGF dokumentiert.

Gegenstand unserer Studie war es, mittels Sandwich-ELISA, neben FGF-b und CAIX auch die Laktatdehydrogenase im EBC von PatientInnen mit NSCLCs und SCLCs nachzuweisen.

Durch die reversible Konversion von Pyruvat zu Laktat spielt dieses Enzym eine entscheidende Rolle beim anaeroben Stoffwechsel. Innerhalb hypoxischer Tumoreale kommt es zur vermehrten Expression von LDH über den HIF-1-Signalweg, was den malignen Zellen eine gewisse Unabhängigkeit von der aktuell vorliegenden Sauerstoffversorgung garantiert. Darüber hinaus korrelieren erhöhte Serum-LDH-Konzentrationen innerhalb verschiedener Malignome mit einer

Verschlechterung der Prognose und einer gewissen Resistenz gegen strahlen- und chemotherapeutische Interventionen (36).

Koukourakis et al (36) konnten innerhalb ihrer Studie mittels immunhistochemischen Analyseverfahren eine Überexpression des LDH-Subtypus 5 im bioptischen Material von NSCLC-PatientInnen nachweisen. Darüber hinaus wurde auch eine signifikante Korrelation zwischen der zytoplasmatischen LDH-Überexpression und der FGF-b-Expression beschrieben ( $p = 0,004$ ).

Es besteht somit kein ernsthafter Zweifel daran, dass die von uns untersuchten Biomarker starken Einfluss auf die Progression maligner Lungentumoren nehmen und des Weiteren innerhalb der soliden Tumormasse mittels entsprechender Verfahren nachweisbar sind.

Da die EBC-Diagnostik ein noch weitgehend unerforschtes Kapitel der medizinischen Forschung darstellt, liegen allerdings keine oder nur spärliche Evidenzen über das Vorkommen oder das physikalisch-chemische Verhalten dieser Biomarker innerhalb des Atemkondensats vor.

Aufgrund unserer Studienergebnisse muss davon ausgegangen werden, dass sich eine möglicherweise im EBC vorliegende Biomarker-Konzentration als viel geringer präsentiert, als innerhalb des Serums oder innerhalb der soliden Tumormasse. Die Tatsache, dass die flüssige Phase des EBC zu 99% aus Wasserdampf gebildet wird, legt die Option nahe, dass der Verdünnungseffekt zu groß ist, um eventuell vorhandene Biomarker mittels ELISA zu detektieren. Dies wirft die Frage auf, ob durch verschiedene Konzentrierungsverfahren, wie beispielsweise der Lyophilisation, die Konzentration der Biomarker in einen mittels ELISA messbaren Bereich gebracht werden könnte. Die ATS/ERS TASK FORCE (28) empfiehlt die Konzentrierung der EBC-Proben mittels Lyophilisation und konsekutiver Resuspension in weniger als einem Zehntel des ursprünglichen Volumens, um verschiedene Marker in einen detektierbaren Bereich zu bringen.

Dies deckt sich auch mit den positiven Ergebnissen der Arbeit von Gessner et al (42), wobei die EBC-Proben vor der Analyse durch Lyophilisation und konsekutiver Resuspension in ddH<sub>2</sub>O auf das 33-fache des Ausgangswertes konzentriert wurden.

Unter Berücksichtigung der innerhalb dieser Studie postulierten Ergebnisse, muss allerdings darauf hingewiesen werden, dass sich die von Gessner et al (42) nachgewiesenen FGF-b-Konzentrationen, unter Berücksichtigung des Konzentrierungsfaktors, allesamt im Detektionsbereich des von uns angewandten ELISAs befanden.

Dies legt den Schluss nahe, dass der alleinige Verzicht auf die Konzentrationsoptimierung des Materials durch Lyophilisation, das negative Ergebnis dieser Studie nicht erklären kann.

Da über die physikalisch-chemische Stabilität von CAIX, FGF-b und LDH innerhalb des EBC keine oder, bezogen auf FGF-b, nur mangelhafte Evidenzen vorliegen, kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich die Substanzen als flüchtig oder chemisch zu instabil darstellen, um mittels des angewandten Kollektionssystems akquiriert zu werden. Innerhalb der Arbeit von Dalaveris et al (37), die den Beweis der Existenz von TNF- $\alpha$ , VEGF und Isoprostan-8 innerhalb des Atemkondensats belegt, wurde allerdings dasselbe Gerät zur Anwendung gebracht, das auch in der vorliegenden Studie zur Akquirierung des EBC-Materials diente. Gleiches gilt für die Studie von Gessner et al (42), die die Existenz von FGF-b und anderen angiogenetischen Markern im EBC dokumentiert.

Im methodischen Empfehlungsschreiben zur Akquirierung und Analytik des EBC der ATS/ERS TASK FORCE (28) wird ferner empfohlen, das gesammelte Probenmaterial unverzüglich zu aliquotieren und bis zur analytischen Auswertung bei mindestens  $-70^{\circ}\text{C}$  zu lagern, um einer möglichen Zerstörung der Biomarker vorzubeugen.

Unter Berücksichtigung dieser Referenz, wurde das innerhalb unserer Studie akquirierte Material bei  $-80^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren.

Trotz dieser Maßnahmen kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich die Lagerung negativ auf die Konzentrationen von CAIX und FGF-b innerhalb des EBC auswirkte und eventuell zur Zerstörung der vorhandenen Moleküle führte.

Des Weiteren stellt sich die Frage, ob und mit welcher Relevanz sich der Faktor Zeit auf die Konservierung des Probenmaterials auswirkt.

Innerhalb der vorliegenden Studie konnten wir in *keiner* der im Zeitraum von etwa einem Jahr gesammelten EBC-Proben eine Präsenz von CAIX oder FGF-b

nachweisen, was zu dem Schluss führt, dass die unterschiedlich lange Lagerungszeit der einzelnen Proben wohl keinen Einfluss auf die Konzentration dieser Marker nimmt.

Allerdings darf nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, dass die Stabilität dieser Marker, möglicherweise auf einen viel kürzeren Zeitraum als angenommen, beschränkt ist.

So liegen für den aktuell am besten untersuchten EBC-Biomarker  $H_2O_2$  entsprechende Evidenzen vor, die eine Konzentrationsregression des Moleküls innerhalb weniger Tage belegen (28).

Um genauere Kenntnis über das entsprechende Verhalten von CAIX und FGF-b im EBC zu erlangen, müsste eine Konzentrationsanalyse unmittelbar nach der Proben-Akquirierung erfolgen. Dies würde auch einen wichtigen Beitrag zur Beantwortung der Frage liefern, ob CAIX tatsächlich im Atemkondensat nachweisbar ist. Entsprechende Evidenzen liegen bis dato ja nur für FGF-b vor (42).

Darüber hinaus könnte durch eine unverzüglich vorgenommene Konzentrationsanalyse geprüft werden, ob der Sandwich-ELISA sich als kostengünstiges und im klinischen Alltag routinemäßig vorhandenes Instrument zur EBC-Analytik eignet oder ob zur Detektion der genannten Biomarker eine teure, aber bezogen auf die Sensitivität überlegenere, Methodik gewählt werden muss.

Allein der Nachweis einer vorliegenden LDH-Aktivität im EBC konnte innerhalb der vorliegenden Arbeit mittels der genannten Methoden erbracht werden. Darüber hinaus ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen PatientInnen- und Kontrollkollektiv ( $p < 0,001$ ). Bezug nehmend auf die ermittelten LDH-Aktivitäts-Werte muss allerdings bemerkt werden, dass sich etwa 75% der Messwerte unterhalb des mit dem verwendeten Assay detektierbaren Bereichs (1-100 mU/ml) befanden, was die Relevanz der ermittelten Korrelation erheblich schmälert.

Darüber hinaus konnte der höchste LDH-Wert nicht wie erwartet im PatientInnenkollektiv, sondern bei einer respiratorisch unauffälligen Kontrollperson nachgewiesen werden.

Dennoch kann aufgrund des positiven LDH-Nachweises innerhalb des EBC davon ausgegangen werden, dass eine eventuelle Zerstörung des LDH-Moleküls durch die Methodik der Akquirierung oder der Lagerung zumindest nicht vollständig war. Dies wird auch durch die Tatsache gestützt, dass die LDH-positiven EBC-Proben inmitten

der Studienlaufzeit und nicht erst wenige Tage vor der Assay-Durchführung akquiriert wurden. Folglich ist es möglich, dass eine **einjährige Lagerung bei -80°C keinen Einfluss auf die Existenz von LDH innerhalb des EBC** nimmt. Dies wäre aber Inhalt einer weiteren Untersuchung.

Allerdings kann nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, dass die angewandten Lagerungsmethoden eine Konzentrationsregression mit sich bringen.

Um diesen Umstand genauer zu evaluieren, müsste eine Durchführung des LDH-Assays, eventuell auch mit einem sensitiveren Test als den verwendeten, unmittelbar nach der EBC-Akquirierung erfolgen.

Anhand der in der vorliegenden Studie ermittelten Diskrepanz der LDH-Aktivität zu Gunsten des respiratorisch unauffälligen Kontrollkollektivs, muss allerdings die Frage aufgeworfen werden, ob sich die LDH überhaupt als EBC-Marker für die Frühdiagnostik des Bronchialkarzinoms eignet.

Neben CAIX, FGF-b und LDH die bei hypoxischer Stoffwechsellage exprimiert werden, kann auch der pH-Wert des EBC als Marker für den oxidativen Stress innerhalb der Lungentumoren fungieren. Durch verschiedenste pathologische Prozesse kann die empfindliche Säure-Basen-Homöostase innerhalb der Atemwege gestört werden, was in einer Veränderung des pH resultiert. Eine messbare Azidifikation des EBC, dessen pH-Wert bei respiratorisch unauffälligen ProbandInnen im Mittel 7,7 beträgt, lässt sich durch zahlreiche Studien belegen.

So beschrieben Tate et al (44) einen signifikant erniedrigten pH-Wert im EBC von PatientInnen mit stabiler cystischer Fibrose (CF) im Vergleich zu einem, bezüglich Alter und Geschlecht gematchten, respiratorisch unauffälligen Kontrollkollektiv (5,88 vs. 6,15). Darüber hinaus erwies sich der EBC-pH von PatientInnen mit akut exazerbierter CF im Vergleich zur Kontrollgruppe mit stabiler CF als reduziert (5,88 vs. 5,32), stieg allerdings nach antibiotischer Therapie wieder in annähernd den gleichen Bereich wie bei den PatientInnen mit stabiler CF.

Des Weiteren lieferten Hunt et al (45) den Nachweis für eine Reduktion des EBC-pH bei PatientInnen mit akutem Asthma bronchiale, wobei sich wiederum eine Normalisierung der Werte nach der therapeutischen Intervention mittels Kortikosteroiden ergab.

Aufgrund der Ergebnisse dieser kurz umrissenen Studien darf angenommen werden, dass die pathologischen Prozesse, die zur Tumorprogression beitragen, sich ebenfalls in einer Azidifikation des EBC-pH niederschlagen könnten.

Eine vergleichbare Evidenz für die Erniedrigung des pH bei PatientInnen mit NSCLC liefert die 2009 publizierte Studie von Chan et al (43). Innerhalb der genannten Arbeit wurden, neben anderen Markern des hypoxischen Stress, auch die pH-Werte des Atemkondensats von 21 NSCLC-PatientInnen mit jenen von 13 Ex-RaucherInnen, 16 RaucherInnen und 21 NichtraucherInnen in Korrelation gebracht. Durch die Vermessung mittels pH-Meter konnte eine signifikante Reduktion des EBC-pH innerhalb der NSCLC-Gruppe im Vergleich zu den Ex-RaucherInnen postuliert werden ( $p = 0,009$ ). Allerdings ergab sich kein Unterschied zu den RaucherInnen bzw. den NichtraucherInnen, was die Frage aufwirft, ob denn eine pH-Wert-Erniedrigung innerhalb des EBC tatsächlich Aufschluss über vorangehende Prozesse bei der Tumorprogression liefern kann.

Der pH-Wert innerhalb des EBC schwankt mit dem Partialdruck des in Lösung gehaltenen, allerdings stark flüchtigen  $\text{CO}_2$ . Um die pH-Werte der EBC-Proben auf einem stabilen und damit untereinander vergleichbaren Niveau zu halten, empfiehlt die ATS/ERS TASK FORCE die Gas-Standardisierung des akquirierten EBC-Materials mittels eines  $\text{CO}_2$ -freien Gases, wie beispielsweise Argon (28). Dadurch wird es auch ermöglicht, das EBC-Material bei  $-70^\circ\text{C}$  zu konservieren und quasi auf einen sehr niedrigen  $\text{pCO}_2$  Wert zu standardisieren.

Die Arbeitsgruppe um Chan HP (43) bediente sich, vor der Lagerung des EBC-Materials bei  $-80^\circ$  dieser Technik um eine Stabilitätsoptimierung des pH-Wertes zu erzielen.

Da wir in der vorliegenden Studie bemüht waren, durch möglichst kostenminimierte Verfahren eine sensitive Möglichkeit zur Beurteilung der EBC-Parameter zu etablieren, wurde auf die Gas-Standardisierung verzichtet. Im Gegenzug dazu erfolgte die Messung des pH mittels Radiometer ABL 750 unverzüglich nach der EBC-Akquirierung, um die  $\text{CO}_2$ -bedingten Schwankungen gering zu halten und dadurch eine Analogie der einzelnen Werte zu garantieren.

Die Ergebnisse unserer Arbeit decken sich mit jenen der Arbeitsgruppe um Chan (43). Auch innerhalb unserer Studie ließ sich kein Unterschied des EBC-pH-Wertes

zwischen PatientInnen mit Lungenkarzinomen und jenen der respiratorisch unauffälligen Kontrollpopulation dokumentieren ( $p = 0,944$ ).

Dies und die Tatsache, dass in der vorliegenden Arbeit bei PatientInnen mit fortgeschrittenen NSCLCs eine Erhöhung im pH-Wert des EBC festgestellt wurde, steht allerdings im Gegensatz zu den Ergebnissen der weiter oben genannten Studien.

Auch wenn die vorliegende Studie eine geringere Zahl an ProbandInnen aufweist, und die Fragen nach der Relevanz und der ausreichenden Spezifität des EBC-pH zur Beurteilung eines malignen Prozesses genauso ungeklärt bleiben wie die Frage nach der Bedeutung einer Azidifikation der unteren Atemwege auf die Tumorgenese, kann sie zur Hypothesengenerierung dienen.

## **5. CONCLUSIO**

Die vorliegende Studie ist zwar kleiner und daher von der Aussagekraft schwächer als die oben diskutierten Studien. Trotzdem ist es verwunderlich, dass mit ähnlichen Methoden keine vergleichbaren Ergebnisse erzielt werden konnten. Der Nachteil der nicht vorgenommenen Probenkonzentrierung, hätte durch die äußerst empfindlichen Testverfahren, die in unserer Studie zur Anwendung kamen, ausgeglichen werden müssen. Man sollte also den Ergebnissen dieser frühen Studien zu diesem jungen und innovativen neuen Ansatz durchaus noch mit Skepsis gegenüberstehen.

Bevor die EBC-Diagnostik den Weg in den klinischen Alltag finden kann, bedarf es noch weitreichender Forschungsarbeiten und Standardisierungen, um überhaupt prüfen zu können, ob diese Methodik tatsächlich eine verlässliche Hilfe bei der Diagnostik von Lungenkrebs darstellen kann.

## 6. INDEX

### 6.1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS UND GLOSSAR

PAK	Polyzyklische Aromatische Kohlenwasserstoffe
py	pack years
NNK	Nicotine-derived Nitrosamine Ketone
IARC	International Agency for Research on Cancer
DNA	Desoxyribonukleinsäure
GTP	Guanosintriphosphat
GDP	Guanosindiphosphat
WHO	World Health Organization
IASLC	International Agency for Study on Lung Cancer
ATS	American Thoracic Society
ERS	European Respiratory Society
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
CT	Computertomographie
RB	Retinoblastom
EGF	Epidermal Growth Factor
IGF	Insulin-like Growth Factor
MRT	Magnetresonanztomographie
EBC	Exhaled Breath Condensate
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
TNF	Tumornekrosefaktor
NO	Stickstoffmonoxid
HIF	Hypoxie-induzierter (Transkriptions-)Faktor
VEGF(R)	Vascular Endothelial Growth Factor(Receptor)
GLUT	Glukose-Transporter
CAIX	Carboanhydrase IX
NSCLC	Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom

SCLC	Kleinzelliges Lungenkarzinom
FGF-b	basic Fibroblast Growth Factor
LDH	Laktatdehydrogenase
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
pCO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid-Partialdruck
PET	Polyethylen
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
H <sub>2</sub> O	Wasser
dH <sub>2</sub> O	destilliertes H <sub>2</sub> O
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes H <sub>2</sub> O
well	Loch, Bohrung; Vertiefung innerhalb der Mikrotiterplatte
AK	Antikörper
Ag	Antigen
OD	optische Dichte = Extinktion
NADPH	Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NAD	Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NADH	reduzierte Form des NAD
vs.	versus
bzw.	beziehungsweise
CF	cystische Fibrose
CUP	Cancer of Unknown Primary

## 6.2 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<b>ABB. 1</b>	ZUSAMMENHANG ZWISCHEN NIKOTINABHÄNGIGKEIT UND DER ENTWICKLUNG VON LUNGENKARZINOMEN ÜBER DIE MUTATION RELEVANTER GENE (MODIFIZIERT NACH HECHT ET AL (4))	6
<b>ABB. 2</b>	HISTOLOGISCHE KLASSIFIKATION MALIGNER LUNGENTUMOREN (MODIFIZIERT NACH IARC/WHO CLASSIFICATION OF TUMOURS (20))	10
<b>ABB. 3</b>	EINFLUSS DER HYPOXIE AUF DIE EXPRESSION PROGRESSIONSFÖRDERNDER FAKTOREN (MODIFIZIERT NACH VAUPEL ET AL (26))	18
<b>ABB. 4</b>	TURBO-DECCS-EINHEIT	27
<b>ABB. 5</b>	BAUTEILE DES EINWEG-SCHLAUCHSYSTEMS ZUR EBC-SAMMLUNG	28
<b>ABB. 6</b>	VERTEILUNG DES CAIX-STANDARDS UND DER EBC-PROBEN INNERHALB DER 96-WELL-MIKROTITERPLATTE	37
<b>ABB. 7</b>	CAIX-ELISA: FARBUMSCHLAG VOR UND NACH ZUGABE DER STOP SOLUTION	38
<b>ABB. 8</b>	VERTEILUNG DES FGF-B-STANDARDS UND DER EBC-PROBEN INNERHALB DER 96-WELL-MIKROTITERPLATTE	41
<b>ABB. 9</b>	FGF-B-ELISA: FARBINTENSIVIERUNG NACH ZUGABE DER AMPLIFIER SOLUTION	42
<b>ABB. 10</b>	VERTEILUNG DES NADH-STANDARDS UND DER EBC-PROBEN INNERHALB DER 96-WELL-MIKROTITERPLATTE	44
<b>ABB. 11</b>	CAIX-STANDARDREIHE UND STANDARDKURVE	46
<b>ABB. 12</b>	FGF-B-STANDARDREIHE UND STANDARDKURVE	49
<b>ABB. 13</b>	(A)LDH-STANDARDREIHE. (B)LDH-STANDARDKURVE.	53
<b>ABB. 14</b>	SPSS-ANALYSE ZUR LDH-AKTIVITÄT. (A)KOLMOGOROV-SMIRNOV-TEST, (B)Q-Q-DIAGRAMM, (C)MANN-WHITNEY-U-TEST	55
<b>ABB. 15</b>	LDH-AKTIVITÄTS-VERTEILUNG IN PATIENTINNEN- UND KONTROLLKOLLEKTIV	56

<b>ABB. 16</b> SPSS-ANALYSE ZUM EBC-PH. (A)GRUPPENSTATISTIKEN, (B)TESTS AUF NORMALVERTEILUNG, (C)T-TEST _____	58
<b>ABB. 17</b> PH-WERT-VERTEILUNG IN PATIENTINNEN- UND KONTROLLKOLLEKTIV _____	59
<b>ABB. 18</b> SPSS-ANALYSE ZU DEN EBC-PH-WERTEN VON NSCLC- UND SCLC-PATIENTINNEN. (A)GRUPPENSTATISTIKEN, (B)TESTS AUF NORMALVERTEILUNG, (C)T-TEST _____	61
<b>ABB. 19</b> VERTEILUNG DER EBC-PH-WERTE VON NSCLC- UND SCLC-PATIENTINNEN _____	62
<b>ABB. 20</b> SPSS-ANALYSE ZU DEN EBC-PH-WERTEN IN DEN VERSCHIEDENEN NSCLC-STADIEN. (A)GRUPPENSTATISTIKEN, (B)TESTS AUF NORMALVERTEILUNG, (C)KRUSKAL-WALLIS- TEST _____	63
<b>ABB. 21</b> VERTEILUNG DER EBC-PH-WERTE INNERHALB DER VERSCHIEDENEN NSCLC-STADIEN	64
<b>ABB. 22</b> SPSS-ANALYSE ZU DEN EBC-PH-WERTEN IN DEN VERSCHIEDENEN SCLC-STADIEN. (A)GRUPPENSTATISTIKEN, (B)T-TEST _____	65
<b>ABB. 23</b> VERTEILUNG DER EBC-PH-WERTE INNERHALB DER VERSCHIEDENEN SCLC-STADIEN _	65
<b>TABELLE 1</b> EBC-PROBEN DES PATIENTINNEN- UND KONTROLLKOLLEKTIVS GEMATCHT NACH ALTER UND GESCHLECHT _____	34
<b>TABELLE 2</b> CAIX-KONZENTRATIONEN (PG/ML) IM EBC DES PATIENTINNEN- UND DES KONTROLLKOLLEKTIVS _____	47
<b>TABELLE 3</b> FGF-B-KONZENTRATIONEN (PG/ML) IM EBC DES PATIENTINNEN- UND DES KONTROLLKOLLEKTIVS _____	50
<b>TABELLE 4</b> OD 450 DER EBC-PROBEN DES PATIENTINNEN- UND DES KONTROLLKOLLEKTIVS NACH 0 MIN _____	51
<b>TABELLE 5</b> OD 450 DER EBC-PROBEN DES PATIENTINNEN- UND DES KONTROLLKOLLEKTIVS NACH 60 MIN _____	52
<b>TABELLE 6</b> LDH-AKTIVITÄT IM EBC VON PATIENTINNEN- UND KONTROLLKOLLEKTIV _____	54
<b>TABELLE 7</b> PH UND PCO <sub>2</sub> -WERTE IM EBC DES PATIENTINNEN UND DES KONTROLLKOLLEKTIVS	57
<b>TABELLE 8</b> TUMORTYPUS, TUMORSTADIUM UND EBC-PH DES PATIENTINNENKOLLEKTIVS ____	60

## 6.3 LITERATURVERZEICHNIS

- 1 International Agency for Research on Cancer (IARC). Globocan. Cancer Fact Sheet. Lung Cancer Incidence and Mortality Worldwide in 2008. 2008; Available at: <http://globocan.iarc.fr/factsheets/cancers/lung.asp>. Accessed 12/19, 2010.
- 2 Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Teppo L, Thomas DB. IARC Scientific Publication No. 155. Cancer Incidence in Five Continents Vol. VIII. Volume VIII ed. Lyon, France: IARC Scientific Publication No. 155; 2002.
- 3 STATISTIK AUSTRIA. Österreichisches Krebsregister und Todesursachenstatistik. 2009; Available at: [http://www.statistik.at/web\\_de/statistiken/gesundheit/krebserkrankungen/luftroehre\\_bronchien\\_lunge/index.html](http://www.statistik.at/web_de/statistiken/gesundheit/krebserkrankungen/luftroehre_bronchien_lunge/index.html). Accessed 12/19, 2010.
- 4 Hecht SS. Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. J Natl Cancer Inst 1999 Jul 21;91(14):1194-1210.
- 5 Herold G. und Mitarbeiter. Bronchialkarzinom. Innere Medizin Köln: HEROLD; 2008. p. 364-9.
- 6 Vineis P, Hoek G, Krzyzanowski M, Vigna-Taglianti F, Veglia F, Airoidi L et al. Lung cancers attributable to environmental tobacco smoke and air pollution in non-smokers in different European countries: a prospective study. Environ Health 2007 Feb 15;6:7.
- 7 Goeckenjan G, Sitter H, Thomas M, Branscheid D, Flentje M, Griesinger F et al. Risikofaktoren. In: Deutsche Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin und Deutsche Krebsgesellschaft, editor. Interdisziplinäre S3-Leitlinie: Prävention, Diagnostik Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms: online erschienen; 2010. p. 15-26.
- 8 Bailey-Wilson JE, Amos CI, Pinney SM, Petersen GM, de Andrade M, Wiest JS et al. A major lung cancer susceptibility locus maps to chromosome 6q23-25. Am J Hum Genet 2004 Sep;75(3):460-474.
- 9 Surgeon General. The health consequences of smoking. Nicotine addiction. Washington DC: U.S. Gov Print;1988.
- 10 Hecht SS. Cigarette smoking and lung cancer: chemical mechanisms and approaches to prevention. Lancet Oncol 2002 Aug;3(8):461-469.

- 11 Guengerich FP. Cytochrome P450 enzymes. *Comprehensive toxicology: biotransformation*. Vol 3 ed. Oxford (U.K.): Elsevier Science; 1997. p. 37-68.
- 12 Geacintov NE, Cosman M, Hingerty BE, Amin S, Broyde S, Patel DJ. NMR solution structures of stereoisomeric covalent polycyclic aromatic carcinogen-DNA adduct: principles, patterns, and diversity. *Chem Res Toxicol* 1997 Feb;10(2):111-146.
- 13 Wiencke JK. DNA adduct burden and tobacco carcinogenesis. *Oncogene* 2002 Oct 21;21(48):7376-7391.
- 14 International Agency for Research on Cancer (IARC). Tobacco smoking. In: IARC, editor. *IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans*. Vol. 38 ed. Lyon (France); 1986. p. 37-375.
- 15 Pfeifer GP, Denissenko MF, Olivier M, Tretyakova N, Hecht SS, Hainaut P. Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers. *Oncogene* 2002 Oct 21;21(48):7435-7451.
- 16 Fong KM, Sekido Y, Minna JD. Molecular pathogenesis of lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999 Dec;118(6):1136-1152.
- 17 Yoshie Y, Ohshima H. Synergistic induction of DNA strand breakage by cigarette tar and nitric oxide. *Carcinogenesis* 1997 Jul;18(7):1359-1363.
- 18 Petersen I. Morphologische und molekulare Pathologie des Lungenkarzinoms. *Der Pathologe*. Vol 31, Suppl 2 ed. online publiziert: 19.09.2010: Springer Verlag 2010; 2010. p. 204-10.
- 19 Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y, et al. International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol* 2011 Feb;6(2):244-285.
- 20 Travis WD, Brambilla E, Muller-Hermelink HK, Harris CC. International Agency for Research on Cancer: Tumours of the Lung. In: *IARC WHO Classification of Tumours*, editor. *Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart* Lyon, France; 2004. p. 9-124.
- 21 Osada H, Tomida S, Yatabe Y, Tatematsu Y, Takeuchi T, Murakami H, et al. Roles of achaete-scute homologue 1 in DKK1 and E-cadherin repression and neuroendocrine differentiation in lung cancer. *Cancer Res* 2008 Mar 15;68(6):1647-1655.

- 22 Goeckenjan G, Sitter H, Thomas M, Branscheid D, Flentje M, Griesinger F et al. Diagnostik. In: Deutsche Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin und Deutsche Krebsgesellschaft, editor. Interdisziplinäre S3-Leitlinie: Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms online erschienen; 2010. p. 41-54.
- 23 British Thoracic Society Bronchoscopy Guidelines Committee, a Subcommittee of Standards of Care Committee of British Thoracic Society. British Thoracic Society guidelines on diagnostic flexible bronchoscopy. *Thorax* 2001 Mar;56 Suppl 1:i1-21.
- 24 Xie HB, Cornwell R, Grossman JE, Hoerl HD, Kurtycz DF. Bronchoscopy-guided transtracheal and transbronchial fine-needle aspiration biopsy: a 5-year institutional review of 111 cases. *Diagn Cytopathol* 2002 Nov;27(5):276-281.
- 25 Nowak D, Kalucka S, Bialasiewicz P, Król M. Exhalation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and thiobarbituric acid reactive substances (TBARs) by healthy subjects. *Free Radical Biology and Medicine* 2001 1/15;30(2):178-186.
- 26 Guatura SB, Martinez JA, Santos Bueno PC, Santos ML. Increased exhalation of hydrogen peroxide in healthy subjects following cigarette consumption. *Sao Paulo Med J* 2000 Jul 6;118(4):93-98.
- 27 Rysz J, Kasielski M, Apanasiewicz J, Krol M, Woznicki A, Luciak M, et al. Increased hydrogen peroxide in the exhaled breath of uraemic patients unaffected by haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* 2004 Jan;19(1):158-163.
- 28 Horvath I, Hunt J, Barnes PJ, Alving K, Antczak A, Baraldi E, et al. Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. *Eur Respir J* 2005 Sep;26(3):523-548.
- 29 Vaupel P, Harrison L. Tumor Hypoxia: Causative Factors, Compensatory Mechanisms and Cellular Response. *The Oncologist* 2004;9(suppl 5):4-9
- 30 Hockel M, Vaupel P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst* 2001 Feb 21;93(4):266-276.
- 31 Ivanov S, Liao SY, Ivanova A, Danilkovitch-Miagkova A, Tarasova N, Weirich G, et al. Expression of hypoxia-inducible cell-surface transmembrane carbonic anhydrases in human cancer. *Am J Pathol* 2001 Mar;158(3):905-919.
- 32 Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Sivridis E, Pastorek J, Wykoff CC, Gatter KC, et al. Expression of hypoxia-inducible carbonic anhydrase-9 relates to

- angiogenic pathways and independently to poor outcome in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2001 Nov 1;61(21):7992-7998.
- 33 Presta M, Dell'Era P, Mitola S, Moroni E, Ronca R, Rusnati M. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005 Apr;16(2):159-178.
- 34 Gajdusek CM, Carbon S. Injury-induced release of basic fibroblast growth factor from bovine aortic endothelium. *J Cell Physiol* 1989 Jun;139(3):570-579.
- 35 Kuwabara K, Ogawa S, Matsumoto M, Koga S, Clauss M, Pinsky DJ, et al. Hypoxia-mediated induction of acidic/basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor in mononuclear phagocytes stimulates growth of hypoxic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995 May 9;92(10):4606-4610.
- 36 Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, Bougioukas G, Didilis V, Gatter KC, et al. Lactate dehydrogenase-5 (LDH-5) overexpression in non-small-cell lung cancer tissues is linked to tumour hypoxia, angiogenic factor production and poor prognosis. *Br J Cancer* 2003 Sep 1;89(5):877-885.
- 37 Dalaveris E, Kerenidi T, Katsabeki-Katsafli A, Kiropoulos T, Tanou K, Gourgoulisanis KI et al. VEGF, TNF-alpha and 8-isoprostane levels in exhaled breath condensate and serum of patients with lung cancer. *Lung Cancer* 2009 May;64(2):219-225.
- 38 Goeckenjan G, Sitter H, Thomas M, Branscheid D, Flentje M, Griesinger F et al. Früherkennung des Lungenkarzinoms. In: Deutsche Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin und Deutsche Krebsgesellschaft, editor. Interdisziplinäre S3-Leitlinie: Prävention, Diagnostik Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms: online erschienen; 2010. p. 37-41.
- 39 Poon RT, Fan ST, Wong J. Clinical implications of circulating angiogenic factors in cancer patients. *J Clin Oncol* 2001 Feb 15;19(4):1207-1225.
- 40 Ueno K, Inoue Y, Kawaguchi T, Hosoe S, Kawahara M. Increased serum levels of basic fibroblast growth factor in lung cancer patients: relevance to response of therapy and prognosis. *Lung Cancer* 2001 Feb-Mar;31(2-3):213-219.
- 41 Zavada J, Zavadova Z, Zat'ovicova M, Hyrsi L, Kawaciuk I. Soluble form of carbonic anhydrase IX (CA IX) in the serum and urine of renal carcinoma patients. *Br J Cancer* 2003 Sep 15;89(6):1067-1071.

- 42 Gessner C, Rechner B, Hammerschmidt S, Kuhn H, Hoheisel G, Sack U et al. Angiogenic markers in breath condensate identify non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2010 May;68(2):177-184.
- 43 Chan HP, Tran V, Lewis C, Thomas PS. Elevated levels of oxidative stress markers in exhaled breath condensate. *J Thorac Oncol* 2009 Feb;4(2):172-178.
- 44 Tate S, MacGregor G, Davis M, Innes JA, Greening AP. Airways in cystic fibrosis are acidified: detection by exhaled breath condensate. *Thorax* 2002 Nov;57(11):926-929.
- 45 Hunt JF, Fang K, Malik R, Snyder A, Malhotra N, Platts-Mills TA et al. Endogenous airway acidification. Implications for asthma pathophysiology. *Am J Respir Crit Care Med* 2000 Mar;161(3 Pt 1):694-699.

# 7. APPENDIX

## 7.1 AUFKLÄRUNGSBOGEN

Suche nach potentiellen Tumormarkern im Kondensat der Ausatemluft, Version 2, 23.4.2010

**Patienteninformation**  
**STUDIENTITEL:**  
**Suche nach potentiellen Tumormarkern<sup>1</sup> im Kondensat<sup>2</sup> der Ausatemluft**

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient

Wir laden Sie ein an der oben genannten Studie im Bereich Grundlagenforschung teilzunehmen. Die Aufklärung darüber erfolgt in einem ausführlichen ärztlichen Gespräch.

Die Teilnahme an einer Studie im Bereich Grundlagenforschung ist freiwillig und kann jederzeit ohne Angabe von Gründen durch Sie beendet werden, ohne dass Ihnen hierdurch Nachteile in Ihrer medizinischen Betreuung entstehen.

Studien im Bereich Grundlagenforschung sind notwendig, um verlässliche neue medizinische Forschungsergebnisse zu gewinnen. Unverzichtbare Voraussetzung für die Durchführung einer Studie ist jedoch, dass Sie Ihr Einverständnis zur Teilnahme an diesen Studien schriftlich erklären. Bitte lesen Sie den folgenden Text als Ergänzung zum Informationsgespräch mit Ihrem Arzt sorgfältig durch und zögern Sie nicht Fragen zu stellen.

Bitte unterschreiben Sie die Einwilligungserklärung nur

- wenn Sie Art und Ablauf der Studie vollständig verstanden haben,
- wenn Sie bereit sind, der Teilnahme zuzustimmen und
- wenn Sie sich über Ihre Rechte als Teilnehmer an dieser Studie im Klaren sind.

Durch diese Untersuchungen entstehen für Sie keine Belastungen und Risiken.

**1. WAS IST DER ZWECK DER STUDIE?**

Die Studie zielt darauf, eine neue Methode zur Früherkennung von Lungentumoren zu finden. Dazu wird die ausgeatmete Luft auf ihre Inhaltsstoffe untersucht. Zu diesem Zweck wird sie in einem speziellen Gerät kondensiert.

**2. WIE LÄUFT DIE STUDIE AB?**

Sie atmen ca. 10 Minuten durch ein Mundstück. Dabei wird in einem Gerät Ihre Ausatemluft abgekühlt und das dabei entstehende Kondensat wird im Rahmen dieser Studie untersucht. Dafür wird das Kondensat zunächst tiefgefroren auf -80°C. Sobald die angestrebte Zahl an Studienteilnehmern erreicht ist, werden die Proben aufgetaut und alle Proben werden auf das Vorhandensein bzw. die Menge an

<sup>1</sup> Tumormarker sind biologische Substanzen im Blut oder anderen Körperflüssigkeiten, deren erhöhte Konzentration auf einen Tumor hindeuten können.  
<sup>2</sup> Kondensat entsteht beim Übergang eines Stoffes, in diesem Fall des Wassers in der Ausatemluft, vom gasförmigen in den flüssigen Zustand.

Seite 1 von 3

Suche nach potentiellen Tumormarkern im Kondensat der Ausatemluft, Version 2, 23.4.2010

bestimmten Stoffen untersucht. Dabei wird Ihr Atemkondensat mit einem von spezialisierten Firmen hergestellten Nachweisverfahren (sogenannte ELISA-Tests) analysiert.

**3. FREIWILLIGE TEILNAHME**

Die Teilnahme an dieser Studie ist freiwillig. Sie sind nicht verpflichtet, an dieser Studie teilzunehmen. Sie können Ihre Einverständniserklärung jederzeit ohne die Angabe von Gründen widerrufen.

**4. VERTRAULICHKEIT DER UNTERLAGEN**

Alle Informationen über Sie werden vertraulich behandelt. Wenn studienspezifische Daten an Dritte weitergegeben werden, so erfolgt dies nur in anonymisierter Form.

**6. MÖGLICHKEIT ZUR DISKUSSION WEITERER FRAGEN**

Für weitere Fragen im Zusammenhang mit dieser Studie stehen Ihnen Ihr behandelnder Arzt und seine Mitarbeiter gerne zur Verfügung.

Name der Kontaktperson: Dr. Christoph Wohikönl (tagsüber erreichbar unter 0316 385 80631)  
OA Dr. med. Robert Wurm (tagsüber erreichbar unter 0316 385 86123)  
Univ.-Prof. Dr. med. Horst Olschewski (tagsüber erreichbar unter Tel: 0316 385 12183)

Seite 2 von 3

Suche nach potentiellen Tumormarkern im Kondensat der Ausatemluft, Version 2, 23.4.2010

**6. Einwilligungserklärung**

Name des Patienten in  
Druckbuchstaben:.....

Geb. Datum: ..... Code: .....

Ich bin von meinem Prüfartz ausführlich und verständlich über den Ablauf der Studie aufgeklärt worden. Ich habe darüber hinaus den Text dieser Patientenaufklärung und Einwilligungserklärung, die insgesamt 3 Seiten umfasst, gelesen. Aufgetretene Fragen wurden mir vom behandelnden Arzt verständlich und genügend beantwortet. Ich hatte ausreichend Zeit, mich zu entscheiden. Ich habe zurzeit keine weiteren Fragen mehr.

Ich behalte mir das Recht vor, meine freiwillige Mitwirkung jederzeit zu beenden, ohne dass mir daraus Nachteile für meine weitere medizinische Betreuung entstehen.

Ich bin zugleich damit einverstanden, dass meine im Rahmen dieser Studie ermittelten Daten aufgezeichnet werden. Beim Umgang mit den Daten werden die Bestimmungen des Datenschutzgesetzes beachtet. Eine Kopie dieser Patientenaufklärung und Einwilligungserklärung habe ich erhalten. Das Original verbleibt beim Prüfartz.

Ich erkläre mich bereit, an der Studie „Früherkennung von Lungentumoren durch Marker im Kondensat der Ausatemluft“ teilzunehmen.

.....  
(Datum und Unterschrift des Patienten)

.....  
(Datum, Name und Unterschrift des verantwortlichen Arztes)

Seite 3 von 3

## 7.2 CURRICULUM VITAE

### Angaben zur Person

Name	Rinner Sabine Elisabeth
Geboren am	08. Februar 1986
Geburtsort	St. Veit/Glan
Nationalität	Österreich



### Schulbildung

1996–2004	Bundesgymnasium St. Veit/Glan
06/2004	Reifeprüfung mit ausgezeichnetem Erfolg
1992–1996	Volksschule 1 St. Veit/Glan

### Ausbildung

07/2011	Abschluss des 3. Studienabschnittes Humanmedizin
09/2010	Abschluss des 2. Studienabschnittes Humanmedizin
09/2005	Abschluss des 1. Studienabschnittes Humanmedizin
10/2004	Inskription Diplomstudium Humanmedizin an der Medizinischen Universität Graz

### **Diplomarbeit**

Originaltitel	Suche nach potentiellen Tumormarkern im Kondensat der Ausatemluft
Ausgeführt an der	Medizinischen Universität Graz
Betreuer	Dr. med. univ. Christoph Wohlkönig Univ.-Prof. Dr. med. Horst Olschewski

### **Praktisches Jahr**

09/2010	2. Fächergruppe, Charité Berlin Innere Medizin, Kardiologie und Angiologie
11/2010	3. Fächergruppe, LKH Graz Dermatologie und Venerologie
12/2010	Pflichtfamulatur Allgemeinmedizin, Graz Dr <sup>in</sup> . med. univ. Elke Amtmann
04/2011	1. Fächergruppe, LKH Graz Unfallchirurgie

### **Famulaturen**

07/2009	DOS Friesach Innere Medizin
07/2008	DOS Friesach Unfallchirurgie
07/2007	DOS Friesach Allgemeinchirurgie
07/2006	DOS Friesach Allgemeinchirurgie