

**Aus der
medizinischen Fakultät der Julius-Maximilians-Universität
Würzburg
Abteilung für Thorax-, Herz- und thorakale Gefäßchirurgie
Direktor: Professor Dr. Rainer Leyh**

**Identifikation von Lungentumoren aus der Atemluft von
Patienten durch Einsatz einer massenspektroskopisch-
basierten Messmethode**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von
Veronika Kolmer
aus
Kirchberg im Wald**

Würzburg, September 2014



Referent: Prof. Dr. Thorsten Walles

Korreferent: Prof. Dr. Michael Schmidt

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 11.05.2015

Die Promovendin ist Zahnärztin

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung.....	1
1.1 Epidemiologie des Lungenkarzinoms	1
1.2 Pathophysiologie und Stadieneinteilung des Lungenkarzinoms	4
1.3 Diagnostik des Lungenkarzinoms.....	6
1.4 Analyse flüchtiger organischer Bestandteile der Atemluft (VOCs).....	9
1.5 Fragestellung.....	13
2 Materialien und Methoden.....	14
2.1 Studiendesign.....	14
2.2 Studiengruppen	14
2.3 Klinische Datenerhebung.....	16
2.4 Analyseverfahren	17
2.4.1 Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC-MS)	17
2.4.2 SonyNose-G2_SN8.....	19
2.5 Sammelgefäße	20
2.5.1 Probenröhrchen.....	20
2.5.2 Gasmaus (Gasprobenbehälter).....	21
2.6 Probensammlung.....	23
2.7 Übertragung der VOC`s auf Tenax absorbierende Röhrchen.....	24
2.8 Probenmessung	26
2.8.1 GC-MS-Messung der Tenax-Röhrchen nach Probentransfer	26
2.8.2 Handhabung der SonyNose-G2_SN8.....	28
2.9 Statistische Auswertung	29
3 Ergebnisse	30
3.1 Zusammensetzung der Untersuchungsgruppen.....	30
3.1.1 Verwendete Proben für GC-MS-Messungen.....	33
3.1.2 Verwendete Proben für die SonyNose-G2_SN8.....	36
3.2 Probengewinnung von Patienten mit Lungenkrebserkrankung.....	39

3.3	Lagerungszeitraum der Proben	39
3.4	Krebserkrankungen.....	40
3.5	Nebenerkrankungen	41
3.6	Medikamente als Störfaktoren	44
3.7	GC-MS Messungen.....	44
3.7.1	Messung der leeren PP-Watte	44
3.7.2	Messungen der beatmeten PP-Watte.....	47
3.8	SonyNose-G2_SN8	53
3.8.1	Sensor-Resistenzverhalten	53
3.8.2	Untersuchungen zur Luftfeuchtigkeit und Temperatur	56
3.8.3	Patientenspezifische Analyse	57
3.8.4	Kontrolle der Reproduzierbarkeit der Messungen.....	60
4	Diskussion.....	62
4.1	Lungenkrebs als diagnostische Herausforderung.....	62
4.2	Evidenz für VOCs als lungenkrebspezifische Marker	63
4.3	Ergebnisse dieser Studie im Kontext zu bereits veröffentlichten Studien	65
4.4	Elektronische Nasen.....	67
4.5	Technische Limitationen bei unserer Studie	69
4.6	Einsatz der SonyNose-G2_SN8 in der klinischen Praxis.....	69
4.7	Ausblick	71
5	Zusammenfassung.....	72
Anhänge.....		79
I	Vorstudie: Atemgasanalyse bei einem Raucher und einem Patienten mit Lungenkrebs.....	79
II	Medikamenteneinnahme der Studienteilnehmer	82
III	Identifizierte Substanzen durch GC-MS-Messungen	88
7	Danksagungen	93
8	Tabellarischer Lebenslauf.....	94

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Geschätzte Zahl jährlicher Lungenkrebserkrankungen in Deutschland	1
Abb. 2: Prozentuale Verteilung der Lungenkarzinom-Histologien	4
Abb. 3: Einteilung der Studienteilnehmer	16
Abb. 4: Erhebungsbogen für die Studienteilnahme	18
Abb. 5: T-Sensor auf einem Chip-Träger	19
Abb. 6: Herstellung der Probenröhrchen	20
Abb. 7: Sony Gasmaus	21
Abb. 8: Gasmaus mit Temperatur-Indikator (Produkt-Nr. SEMA4343)	23
Abb. 9: Probensammlung Probenröhrchen und Gasmaus	24
Abb. 10: Netzsch TG 209, Netzsch DSC 204 und Stand-alone Thermoextraktor	25
Abb. 11: GC-MS Gerät	27
Abb. 12: SonyNose-G2_SN8	29
Abb. 13: Darstellung der Studienpopulation für die GC-MS-Messungen	33
Abb. 14: Vergleich der verwendeten Proben für die Untersuchungen	34
Abb. 15: Darstellung der Studienpopulation für die SonyNose-G2_SN8	37
Abb. 16: Histologische Subtypisierung des Lungenkarzinoms aller Studienteilnehmer	40
Abb. 17: Verteilung der Tumorstadien	41
Abb. 18: Begleiterkrankungen der Studienteilnehmer	42
Abb. 19: TGA-Thermogram und DSC-Thermogram der PP-Watte	44
Abb. 20: GC-Chromatogramm einer Atemprobe (Lungenkrebs-Patient L114)	47
Abb. 21: Graphische Darstellung des Resistenzverhaltens der Sensoren	54
Abb. 22: Sensitivität der Sensoren in Bezug zur Atemprobe	55
Abb. 23: Umgebungstemperatur, Luftfeuchtigkeit und Temperatur der E-Nose innerhalb des Untersuchungszeitraums	56
Abb. 24: Hauptkomponentenanalyse für die 3 Untersuchungsgruppen	57
Abb. 25: Hauptkomponentenanalyse bezüglich Gruppenzugehörigkeit, Raucherstatus, Geschlecht und Altersgruppe	59
Abb. 26: Reproduzierbarkeit	60
Abb. 27: Reproduzierbarkeit des verwendeten Messverfahrens	61
Abb. 28: Medikamenteneinnahme der gesunden Probanden	84

Abb. 29: Medikamenteneinnahme der Patienten mit Lungenkrebs	85
Abb. 30: Medikamenteneinnahme der Patienten mit COPD	86
Abb. 31: Medikamenteneinnahme der Patienten mit non NSCLC RF	87

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Prognose des nicht kleinzelligen Lungenkarzinoms	3
Tab. 2: TNM-Klassifikation und Stadieneinteilung des Lungenkarzinoms	5
Tab. 3: Häufigkeit von Initialsymptomen beim Lungenkarzinom	7
Tab. 4: Literaturübersicht zur Detektion von Lungenkrebs durch elektronische Messverfahren	11
Tab. 5: Ein- und Ausschlusskriterien	15
Tab. 6: Zusammensetzung der Untersuchungsgruppen	32
Tab. 7: Subgruppenvergleich gesamtes Patientenkollektiv und verwendete Proben für GC-MS-Messungen	35
Tab. 8: Subgruppenvergleich gesamtes Patientenkollektiv und verwendete Proben für die SonyNose-G2_SN8	38
Tab. 9: Nebenerkrankungen der Studienteilnehmer	43
Tab. 10: Liste der identifizierten Substanzen- Lungenkrebs-Patient L114	48
Tab. 11: Identifizierte Unterschiede zwischen den Gruppen	50
Tab. 12: Verhalten der Sensoren im Bezug zum Widerstand	55
Tab. 13: Temperatur und Luftfeuchtigkeit	56
Tab. 14: Lungenkrebspezifische Substanzen in Übereinstimmung mit vorausgegangenen Studien	65
Tab. 15: Literaturübersicht zur Detektion von Lungenkrebs mittels elektronischer Nasen	68
Tab. 16: Vergleich Raucher/Lungenkrebspatient	80

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ca	Karzinom
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease (deutsch: chronisch obstruktive Lungenerkrankung)
CT	Computertomographie
J	Jahre
m	männlich
NSCLC	Non-small-cell lung cancer (deutsch: nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom)
SCLC	Small-cell lung cancer (deutsch: kleinzelliges Lungenkarzinom)
Tab.	Tabelle
UICC	Union international contre le cancer (deutsch: Internationale Vereinigung gegen Krebs)
w	weiblich
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
FDG	Fluoro-Desoxy-Glucose
VOC	volatile organic compound
GC-MS	Gaschromatographie mit Massenspektrometrie gekoppelt
BC	Bronchialkarzinom
PP	Polypropylen
RF	Raumforderung
n	Anzahl
DD	Differentialdiagnose
KHK	Koronare Herzkrankheit
chron.	chronisch
rez.	rezidivierend
PCA	Principal Component Analysis
PCR	Polymerase chain reaction

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie des Lungenkarzinoms

Der Lungenkrebs, also Krebs von Luftröhre, Bronchien und Lunge, stellt weltweit die häufigste zum Tode führende Krebsart dar. In Deutschland ist Lungenkrebs nach dem Prostatakarzinom die zweithäufigste Tumorerkrankung beim Mann sowie die dritthäufigste Tumorerkrankung bei der Frau- nach Brustkrebs und kolorektalem Krebs [1]. Im Jahr 2010 erkrankten 52.000 Personen, davon 35.000 Männer und 17.000 Frauen, in Deutschland an einem Lungenkarzinom. Dies entspricht knapp 15% aller Krebsneuerkrankungen beim Mann und 6% bei der Frau [2]. Das mittlere Erkrankungsalter bei Lungenkrebs liegt sowohl für Männer als auch für Frauen bei etwa 68 Jahren [3].

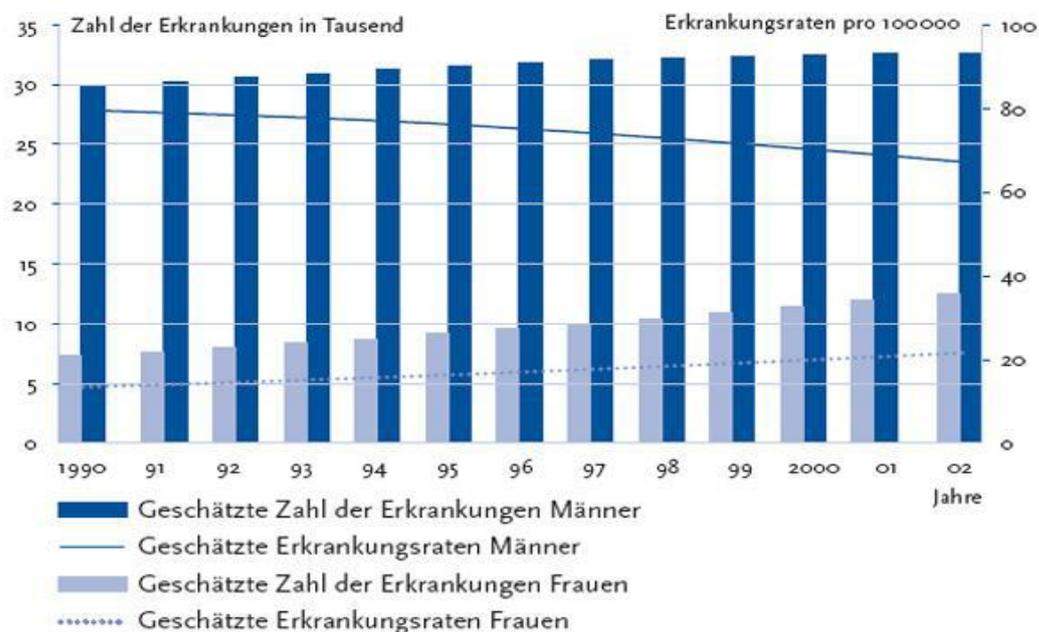


Abb. 1: Geschätzte Zahl jährlicher Lungenkrebserkrankungen in Deutschland (Quelle: Dachdokumentation Krebs) [3].

Die Angaben zur Krebsmortalität in Deutschland beruhen auf der Zahl der Krebssterbefälle eines Jahres nach der amtlichen Todesursachenstatistik des Statistischen Bundesamtes. Die Mortalität für bösartige Neubildungen der Bronchien und Lunge lag im Jahr 2010 bei insgesamt 43.008 Personen, davon 29.381 Männer und 13.627 Frauen [1]. Somit ist Lungenkrebs die viert häufigste Todesursache und die häufigste Krebstodesursache [4]. Etwa 25% aller Krebstodesfälle bei Männern und 14% bei Frauen sind auf Lungenkrebs zurückzuführen [1]. Bei Männern und Frauen in der Altersgruppe zwischen 80-84 Jahren erreicht die alters- und geschlechtsspezifische Mortalitätsrate ihr Maximum [2]. Im Jahre 2030 wird der Lungenkrebs zur jeweils dritten bzw. fünften führenden Todesursache in Ländern mit mittlerem und hohem Einkommen ansteigen [5-7].

Männer erkranken wesentlich häufiger an Lungenkrebs als Frauen. Die Neuerkrankungen unter Frauen nehmen aber aufgrund des gesteigerten Zigarettenkonsums deutlich zu. Erstmals traten bei Frauen unter 40 Jahren so viele Erkrankungen an Lungenkrebs auf, wie unter gleichaltrigen Männern [2]. Bei Männern zeigt sich ein gegenläufiger Trend: Die Mortalität sowie die Inzidenz erreichten in Deutschland bei Männern zwischen Mitte und Ende der 1970er Jahre ihren Höchststand. Seitdem ist ein rückläufiger Trend erkennbar, und zwar um ca. 0,9 Prozent pro Jahr. Aufgrund der erhöhten Lebenserwartung nimmt die absolute Zahl der Neuerkrankungen jedoch auch unter Männern zu [3].

Die Überlebenswahrscheinlichkeit kann als mittlere Überlebensrate oder 5-Jahres-Überlebensrate angegeben werden. Dabei ist die 5-Jahres-Überlebensrate der Prozentsatz aller Erkrankten, die fünf Jahre nach Diagnosestellung noch leben. Die mittlere Überlebenszeit gibt darüber hinaus die Zeit an, die ein Erkrankter im Durchschnitt noch lebt. *„Die relative 5-Jahres-Überlebensrate für Lungenkrebs wird in der Bundesrepublik Deutschland mit etwa 15% bei Männern und 18% bei Frauen angegeben“* [2]. *„Nach den Ergebnissen des Tumorzentrums München beträgt das relative Survival nach 5 Jahren für ab 1996 diagnostizierte Patienten mit kleinzelligem Lungenkarzinom (SCLC) 5,6% und mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (NSCLC) 17,2%, nach 10 Jahren sind ca. 95% der SCLC- und 90% der NSCLC-Patienten tumorbedingt verstorben“* [8]. Die 5-Jahres-Überlebensrate variiert in Abhängigkeit vom Tumorstadium zum Zeitpunkt der Diagnose. Dabei liegt die 5-Jahres-

Überlebensrate bei Patienten im Stadium I bei 70%, während die Patienten mit Stadium III nur eine Überlebenschance von 20% aufweisen [9].

Tab. 1: Prognose des nicht kleinzelligen Lungenkarzinoms [10].

Stadium nach UICC	5-Jahres-Überleben	Mittleres Überleben in Monaten
IA	73%	119
IB	54%	70
IIA	48%	54
IIB	38%	33
IIIA	25%	23
IIIB	19%	16
IV	21%	18

Der Hauptrisikofaktor für Lungenkrebs, das inhalative Tabakrauchen, ist seit langem bekannt. Er ist für ca. 85% der Lungenkarzinomfälle verantwortlich [8]. Dabei gibt es eine direkte Korrelation zwischen der Anzahl der gerauchten Zigaretten und dem Risiko, ein Lungenkarzinom zu entwickeln. Die Dauer des Rauchens ist dabei der wichtigste Einflussfaktor. Weltweit steigen die Inzidenzraten vor allem bei Frauen, was sich auf den gesteigerten Zigarettenkonsum zurückführen lässt. In einer europäischen Studie zeigte sich bei männlichen Rauchern ein 24-fach höheres Risiko an Lungenkrebs zu erkranken, als für lebenslange Nichtraucher, Ex-Raucher haben ein 7,5-fach erhöhtes Risiko [11]. Nur 9% bis 15% der Lungenkarzinome lassen sich auf andere Ursachen, zum Beispiel Passivrauchen, Luftverschmutzung, Strahlung oder berufliche Exposition, zurückführen [10]. Durch Passivrauchen erhöht sich die Wahrscheinlichkeit ein Lungenkarzinom zu entwickeln etwa um 26% [12].

Eine andere häufige Lungenerkrankung, die mit dem Rauchen vergesellschaftet ist, ist die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD). COPD zeichnet sich durch eine typische Verschlechterung der Lungenfunktion sowie einer chronisch-systemischen und lokalen Entzündung der Atemwege aus. Außerdem liegt eine Veränderung der

Strukturen des Lungenparenchyms vor. COPD ist dabei häufig Vorgänger oder Begleiterkrankung zu einem Lungenkarzinom.

1.2 Pathophysiologie und Stadieneinteilung des Lungenkarzinoms

Mediziner definieren Lungenkrebs als eine Entartung der Zellen der Lunge. Dabei entsteht der Krebs aus verschiedenen Gewebearten der Lunge. Es wird zwischen zwei Gruppen des Lungenkarzinoms unterschieden, dem kleinzelligen Karzinom (SCLC) und dem nicht kleinzelligen Karzinom (NSCLC) [13]. Zu den nicht kleinzelligen Karzinomen zählen das Plattenepithelkarzinom (entstammt den Plattenepithelien der Bronchien), das Adenokarzinom (entsteht aus Drüsenzellen), das großzellige Karzinom sowie das sarkomatoide Karzinom, das undifferenzierte Karzinom und das mukoepidermoide Karzinom. Die vier häufigsten histologischen Typen zeigt Abb. 2.

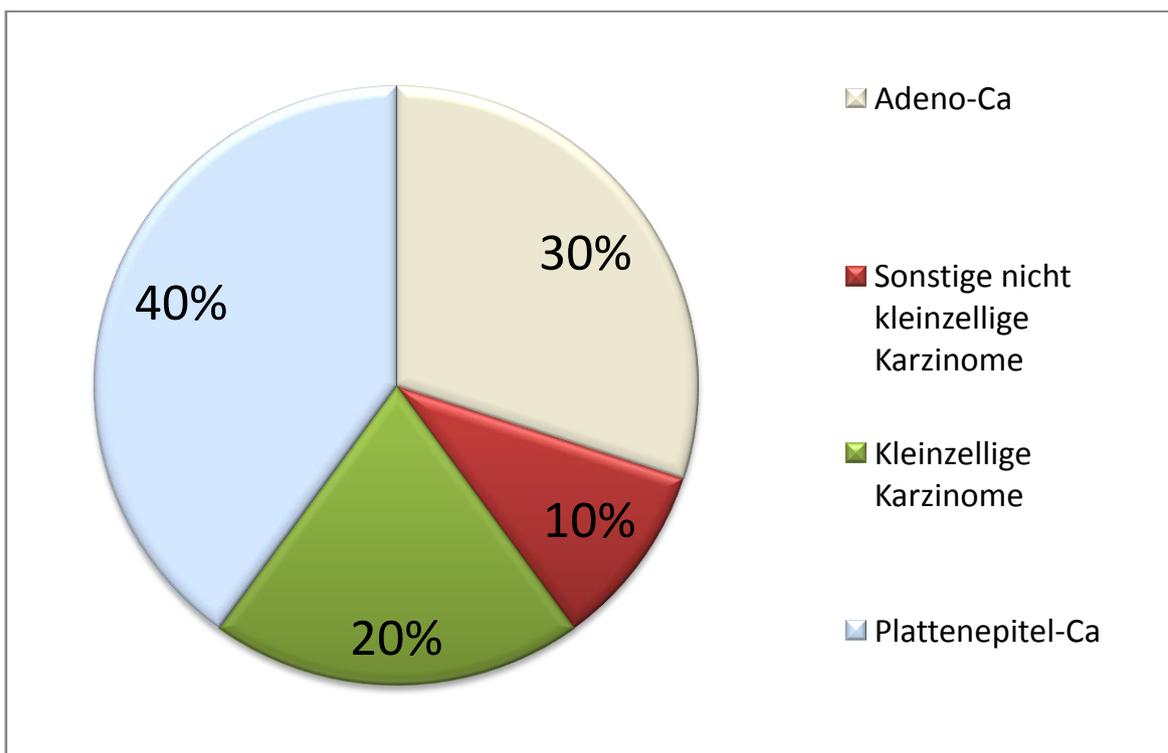


Abb. 2: Prozentuale Verteilung der häufigsten Lungenkarzinom-Histologien [10].

Das Staging ist von entscheidender Bedeutung für die prognostische Einschätzung und die Therapieplanung. „Der therapeutische Ansatz hängt bei Patienten mit Lungenkarzinom von der Tumorgröße, der lokalen Tumorausbreitung mit Lappen- oder Organüberschreitung, dem Befall hilärer und mediastinaler Lymphknoten und von einer potentiellen Fernmetastasierung ab“ [8]. Bösartige Tumore werden von Ärzten und Wissenschaftlern nach international gültigen Regeln beschrieben. Das am weitesten verbreitete Verfahren zur Tumorklassifikation stellt das TNM-System dar. Die UICC legte dafür in den 1950er-Jahren die Kriterien für die Einteilung fest. Im Jahre 2009 erschien die aktualisierte 7. Auflage [14]. Das Codesystem aus Buchstaben und Zahlen steht dabei für definierte Tumormerkmale. In Tab. 2 wird die aktuelle TNM-Klassifikation für das Lungenkarzinom aufgezeigt.

Tab. 2: TNM-Klassifikation und Stadieneinteilung des Lungenkarzinoms nach UICC, 7.Auflage [14].

	T1		T2		T3	T4	M1	
	T1a	T1b	T2a	T2b			M1a	M1b
N0	IA	IA	IB	IIA	IIB	IIIA	IV	IV
N1	IIA	IIA	IIA	IIB	IIIA	IIIA	IV	IV
N2	IIIA	IIIA	IIIA	IIIA	IIIA	IIIB	IV	IV
N3	IIIB	IIIB	IIIB	IIIB	IIIB	IIIB	IV	IV
M1	M1a	IV	IV	IV	IV	IV	IV	
	M1b	IV	IV	IV	IV	IV	IV	

T1: Tumor ≤ 3 cm, umgeben von Lungengewebe oder viszeraler Pleura, keine Infiltration proximal eines Lappenbronchus

T1a: Tumor < 2 cm

T1b: Tumor 2-3 cm

T2: Tumor > 3 cm und < 7 cm oder befällt Hauptbronchus mindestens 2 cm distal der Hauptkarina oder infiltriert viszerale Pleura oder assoziierte Atelektase/ obstruktive Entzündung bis zum Hilus, aber nicht der ganzen Lunge

T2a: Tumor > 3 cm ≤ 5 cm

T2b: Tumor > 5 cm < 7 cm

T3: Tumor > 7 cm oder Infiltration der Brustwand, des Zwerchfells, mediastinaler Pleura oder Nervus phrenicus oder Tumor < 2 cm distal der Carina, Carina aber nicht befallen oder mit Atelektase oder obstruktiver Entzündung der gesamten Lunge oder mehrere Tumorherde im gleichen Lappen

T4: Infiltration von Herz, große Gefäße, Trachea, Oesophagus, Wirbelkörper, Carina oder Stimmbandlähmung oder separater Tumorherd in einem anderen ipsilateralen Lappen

N0: keine Lymphknotenmetastasen

N1: Intrapulmonale, peribronchiale oder hiläre Lymphknotenmetastasen

N2: Ipsilaterale mediastinale oder subkarinale Lymphknotenmetastasen

N3: Kontralaterale mediastinale oder hiläre Lymphknotenmetastasen, Skalenus- oder Supraklavikuläre Lymphknotenmetastasen beidseits

M1: Metastasen

M1a: Tumorherde in kontralateraler Lunge oder Pleurakarzinose, maligner Pleura- oder Perikarderguss

M1b: Fernmetastasen

1.3 Diagnostik des Lungenkarzinoms

Zumeist beruht der klinische Verdacht auf ein Lungenkarzinom auf einer pathologischen Röntgen-Thorax-Untersuchung und/oder auf lokalen oder systemischen Symptomen. Etwa 90% der Patienten weisen bei Diagnosestellung klinische Symptome auf, die direkt oder indirekt auf den Tumor zurückzuführen sind [8](Tab. 3).

Zur Basisdiagnostik gehören Anamnese, klinische Untersuchungen, Laboruntersuchungen sowie bildgebende Verfahren und Untersuchungen aus histologischem und zytologischem Material des Tumors.

Tab. 3: Häufigkeit von Initialsymptomen beim Lungenkarzinom [2].

Symptome bzw. klinisches Zeichen	Häufigkeit
Husten	8-75%
Gewichtsverlust	0-68%
Luftnot	3-60%
Brustschmerzen	20-49%
Hämoptyse	6-35%
Knochenschmerzen	6-25%
Trommelschlägelfinger (Clubbing)	0-20%
Fieber	0-20%
Schwächegefühl	0-10%

Die besten Überlebens-Prognosen haben die Patienten, bei denen der Tumor in einem frühen Stadium entdeckt und operiert werden kann [12]. Die 5-Jahres-Überlebensrate verbessert sich dabei von ca. 20% im Stadium III auf ca. 70% im Stadium I des Lungenkarzinoms [10]. Deshalb ist eine frühzeitige Identifizierung der in diesem Stadium meist asymptomatischen Patienten wichtig. Hierfür kommen vor allem bildgebende Verfahren, also Röntgen-Thorax oder Computertomographie, zum Einsatz. Die Übersichtsaufnahme in zwei Ebenen (Röntgen-Thorax) ist das am häufigsten eingesetzte initiale radiologische Verfahren im Thoraxbereich. *„Das Lungenkarzinom zeigt sich gemeinhin direkt oder indirekt als Rundherd, Raumforderung, Atelektase, Mediastinalverbreiterung oder mit einem Pleuraerguss. Es bleibt aber festzuhalten, dass ein normaler Befund bei einer Thorax-Röntgenaufnahme einen zentralen Lungen- oder Mediastinaltumor nicht ausschließt“* [8]. Durch die Low Dose Computertomographie konnte durch Verringerung des Röhrenstroms die Dosisexposition auf bis zu ein Zehntel des Standardwertes eines CT-Untersuchungsgerätes verringert werden. Wesentliche anatomische Informationen über die Lunge gehen dabei nicht verloren, jedoch ist zu beachten, dass bei solchen niedrigen Dosiswerten eine differenzierte Beurteilung der mediastinalen Strukturen nicht mehr möglich ist [8]. Im Low Dose CT wurde eine fast sechsfach höhere Zahl an Lungenkarzinomen im Stadium I entdeckt als im Röntgenbild des Thorax. Die meisten

dieser Tumoren waren nicht größer als 1 cm [15]. Bei bereits bestehendem Verdacht auf ein Lungenkarzinom oder zum Staging bei bekanntem Malignom sollte aufgrund der Einschränkungen der Niedrigdosis-CT jedoch die Standard-Dosis-CT bevorzugt werden [8].

Die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) ist ein nicht-invasives, nuklearmedizinisches Schnittbildverfahren. Zur Darstellung und quantitativen Messung physiologischer Funktionen und biochemischer Prozesse werden entsprechende Radiopharmaka eingesetzt. In der Onkologie nutzt die PET den erhöhten Tumorstoffwechsel und andere spezifische pathophysiologische Prinzipien zur Ganzkörperdiagnostik. Aufgrund des stark vermehrten Glukosemetabolismus der meist soliden Tumore wird in der klinischen Praxis zur Diagnose des Lungenkarzinoms fast ausschließlich das Glucoseanalogon 2-F-18-Fluoro-2-Desoxy-D-Glucose (F-18-FDG) eingesetzt. Durch die Fusion der PET (Vorteil: hohe Sensitivität) mit der CT (Vorteil: sehr gute morphologische Auflösung und anatomische Darstellbarkeit) konnten separat akquirierte PET-Bilder oder CT-Bilder übertroffen werden [2]. Jedoch sind falsch-negative Befunde der PET bei kleinen Herden unter 1 cm zu beobachten. Auch in langsam wachsenden Karzinomen reichert FDG wesentlich schlechter an, wodurch die Sensitivität deutlich verringert wird. Außerdem wird die Spezifität der Methode aufgrund der vermehrten Anreicherung von FDG in entzündlich verändertem Gewebe reduziert [16, 17]. Außerdem zeigen zunehmend mehr Studien, dass die durch das PET gegebenen Möglichkeiten, Lungentumoren eindeutig und frühzeitig zu identifizieren, ebenfalls limitiert sind [18, 19].

Um eine histologische Sicherung des Tumors, der durch radiologische Verfahren entdeckt wurde, zu erreichen, sind invasive Verfahren erforderlich. Die Bronchoskopie stellt dabei die wichtigste Methode zur Diagnosesicherung dar. Bei radiologischem Tumorverdacht kann in ca. 50% der Fälle ein Tumor erfasst werden. Etwa 3-5 Biopsien sind bei sichtbaren Tumoren ausreichend [8]. Insbesondere bei zentralen Tumoren besteht eine ausgezeichnete diagnostische Sicherheit, bei peripheren Tumoren hängt die Trefferquote von der Größe und der Lage des Rundherdes ab.

Mittels der transbronchialen Nadelaspiration können zytologische Präparate aus tiefer liegenden Tumoranteilen gewonnen werden. Als zusätzliche zytologische Methode mit niedriger Komplikationsrate und hoher diagnostischer Aussage kann der

Bürstenabstrich eingesetzt werden, vor allem bei Tumoren, bei denen ein hohes Blutungsrisiko besteht [8].

Die zytologische Untersuchung von Sputum ist die am wenigsten invasive Methode zum Nachweis eines Lungenkarzinoms. Ihre diagnostische Genauigkeit ist abhängig von der Zahl gewonnener Proben, deren Aufarbeitung sowie Tumorage und -größe. Aufgrund der höheren Irrtumswahrscheinlichkeit hinsichtlich der Tumorklassifikation eines Lungenkarzinoms mittels Zytologie im Vergleich zur Histologie und der daraus resultierenden, relevanten therapeutischen Konsequenzen sollte jedoch zusätzlich eine histologische Diagnosesicherung in jedem Fall angestrebt werden [8].

1.4 Analyse flüchtiger organischer Bestandteile der Atemluft (VOCs)

Zurückgehend auf erste Erfahrungsberichte aus dem Jahr 2001 [20, 21], wurde vereinzelt versucht, Hunde auf die Identifikation von krebsspezifischen organischen Verbindungen in der Atemluft von Patienten mit Lungenkrebs zu trainieren. In einzelnen Serien wurde hierfür über eine alle bildgebenden Verfahren übertreffende Spezifität und Sensitivität berichtet [21, 22]. In einer von unserer Arbeitsgruppe durchgeführten vorausgegangenen Untersuchung [23] wurden ebenfalls Spürhunde auf die Identifikation von krebsspezifischen organischen Verbindungen in der Atemluft von Patienten mit Lungentumoren trainiert. In dem verwendeten Studien-Setting konnte gezeigt werden, dass die Hunde mit einer Sensitivität von 72% und einer Spezifität von über 90% den Lungenkrebs identifizieren konnten [23]. Aus den Erkenntnissen zu den Hundestudien kann gefolgert werden, dass die Hunde mit hoher Empfindlichkeit volatile organische Substanzen (VOCs) einer Erkrankung in der Atemluft eines Patienten erkennen können. Da jedoch das „Messsystem Hund“ störanfällig ist und wahrscheinlich niemals standardisierbar sein wird, wurde in vorliegender Untersuchung versucht, den Lungenkrebs aus der Atemluft von Patienten mittels einer elektronischen „Nase“ zu ermitteln. Diese elektronischen Nasen nutzen eine Vielzahl mikroelektronischer Gassensoren, die jeweils sensitiv auf bestimmte VOCs ansprechen. Die Gesamtheit der Sensorsignale wird dabei charakteristischen Gerüchen zugeordnet [24]. Bei chromatographischen Verfahren wird die Separation unterschiedlicher Verbindungen nach ihren Massen ausgenutzt, um die absoluten und relativen Bestandteile zu bestimmen. Massenspektrometer schließlich analysieren das

Verhältnis von Masse-zu-Ladung im ionisierten Zustand. Am besten eignet sich eine Kombination von Gaschromatographie mit Massenspektrometern zur Analyse von flüchtigen Stoffen in geringer Konzentration [25]. Der Gaschromatograph dient dabei zur Auftrennung des zu untersuchenden Stoffgemisches und das Massenspektrometer zur Identifizierung und gegebenenfalls auch Quantifizierung der einzelnen Komponenten.

Phillips et al publizierte im Jahre 2003 [26] erstmals eine Untersuchungsmethode, in der gezeigt wurde, dass in der Atemluft von Patienten signifikante VOC`s gemessen werden können. Eine Übersicht der weiteren Publikationen zu diesem Thema zeigt Tab. 4.

Um das Lungenkarzinom schon im frühen Stadium diagnostizieren zu können, wurden schon seit längeren Forschungen mit der Atemluft der Patienten durchgeführt. Um hierdurch neue Ergebnisse bzw. Erkenntnisse zu erlangen, bedarf es innovativer Technologien. Diese sind die Proteomik, die Metabolomik, die Massenspektrometrie, die Gaschromatographie/Massenspektrometrie sowie die Ionenmobilitätsspektrometrie. Diesen neuesten Technologien wird ein großes Potential zugesprochen, krankheitsspezifische Biomarker in der ausgeatmeten Luft von Lungenkrebs-Patienten zu identifizieren [27].

Tab. 4: Literaturübersicht zur Detektion von Lungenkrebs durch elektronische Messverfahren [28].

VOC`s in Patienten mit Lungenerkrankungen		
Autor	Erkrankung	Signifikante VOC`s
Phillips 2003 [26]	Lungenkrebs	Butane; 3-methyl-tridecane; 7-methyl-tridecane; 4-methyl-octane; 3-methyl-hexane; heptanes; 2-methyl-hexane; pentane; 5-methyl-decane
Machado 2005 [29]	Lungenkrebs	Isobutene; methanol; ethanol; acetone; pentane; isoprene; isopropanol; dimethylsulfide; carbon-disulfide; benzene; toluene
Poli 2005 [30]	Lungenkrebs NSCLC	2-methyl-pentane; pentane; ethylenbenzene; Xylenes (total); trimethyl-benzene; toluene; benzene; decane; octane; pentamethyl-heptane
Barker 2006 [31]	Zystische Fibrose	Ethane; propane; pentane; methanol; ethanol; 2-propanol; acetone; isoprene; benzene; toluene; dimethyl-sulfide; limonene
Dragonieri 2007 [32]	Asthma	4-methyl-octane; 2,4-dimethyl-heptane; isopropanol; toluene; isoprene; alkane; acetic acid; acetone; 2,6,11-trimethyl-dodecane; 3,7-dimethyl-undecane; 2,3-dimethyl-heptane
Chen 2007 [33]	Lungenkrebs	Styrene; decane; isoprene; benzene; undecane; 1-hexene; hexanol; propylene-benzene; 1,2,4-trimethyl-benzene; heptanal; methyl-cyclopentane

Peng 2010 [34]	Lungen-, Colon-, Krebs	Brust-, Prostata-	1-methyl-4-(1-methyl)benzene; toluene; dodecane; 3,3-dimethyl-pentane; 2,3,4- trimethyl-hexane; 1,1-(1-butenylidene)-bis- benzene; 1,3-dimethyl-benzene; 1- iodononane; (1,1-dimethylethyl- thio)acetic-acid; 4-(4-propylcyclohexyl)-4- cyano[1,1-biphenyl]4-yl-ester-benzoic-acid; 2-amino-5-isopropyl-8-methyl-1- azulenecarbonitrile; 5-(2- methylpropyl)nonane; 2,3,4-trimethyl- decane; 6-ethyl-3-octyl-ester 2 trifluoromethyl benzoic acid; p-xylene, 2,2- dimethyldecane
Fuchs 2010 [35]	Lungenkrebs		Aldehydes-butanal; formaldehyde; acetaldehyde; pentanal; hexanal; octanal; nonanal
Wang 2012 [36]	Lungenkrebs		Adenocarcinom-2,4,6-trimethyloctane; 2- methyldodecane; 2-tridecanone; 2- pentadecanone; 8-methyl-heptadecane; 2- heptadecanone; nonadecane; eicosane; squamous-methanoic acid; 2-nonanone; 2- pentadecanone; nonadecane; eicosane; SCC-2-decanone; 2-hendecanone; 2- methylnaphthaline; 2-tridecanone; 2,6- dimethylnaphthaline; 1-heptadecanol; 2- heptadecanone; nonadecane; eicosane

1.5 Fragestellung

In der vorliegenden Studie wurde ein neu entwickeltes elektronisches Detektionssystem getestet. Die Fragestellung dabei lautete zum einen, ob es mit dem von der Firma Sony entwickelten Messgerät SonyNose-G2_SN8 möglich ist, Lungentumore in der Atemluft von Patienten zu identifizieren und von krebsunabhängigen entzündlichen Prozessen der Lunge und der Atemwege zu unterscheiden, zum anderen, welche Substanzen sich in der Atemluft von Patienten mit Lungenkrebs, COPD und gesunden Kontrollprobanden identifizieren lassen und mit der Krankheit Lungenkrebs in Verbindung gebracht werden können. Die Proben wurden dabei einmal gaschromatographisch und einmal mittels GC-MS-Messungen analysiert. Sollten die Untersuchungen zufriedenstellend verlaufen, so könnten zukünftig zahlreiche aufwändige und für den Patienten oft belastende Untersuchungen vermieden und gleichzeitig schneller eine Diagnose gesichert werden. So könnten künftig z.B. Atemproben von Patienten für ein Tumorscreening in Risikogruppen (z.B. langjährige Nikotinabhängige) verwendet werden. Außerdem könnte irgendwann im Rahmen des onkologischen Stagings bei der Abklärung eines pulmonalen Rundherdes die Atemspende einzelne für den Patienten belastende Untersuchungen (z.B. diagnostische Bronchoskopie zur Gewebebegewinnung) ersetzen.

Für unsere Untersuchungen wurde eine eigene Methodik zur Analyse der Atemluft von einem Raucher (bevor und nachdem er eine Zigarette geraucht hat) und einem Patienten mit Lungenkrebs entwickelt. In eigenen Vorversuchen¹ konnte mit Hilfe unserer Methodik gezeigt werden, dass in der Atemluft nach dem Zigarettenrauchen 13 Substanzen nachweisbar sind, die bei einem seit Jahren nicht mehr rauchenden Lungenkrebs-Patienten ebenfalls vorhanden sind. Die Ergebnisse sind im Anhang I dargestellt.

¹ Die Vorversuche wurden in den Laboren der Firma Sony Deutschland GmbH, Material Science Laboratory (Hedelfingerstr. 61, 70327 Stuttgart) mit Hilfe von Frau Tatjana Malter ausgearbeitet und durchgeführt.

2 Materialien und Methoden

2.1 Studiendesign

Es handelt sich bei dieser Arbeit um eine experimentelle interventionelle Studie mit drei Untersuchungsarmen. Alle Untersuchungen wurden in der Abteilung Thoraxchirurgie der Klinik Schillerhöhe in Gerlingen bei Stuttgart durchgeführt. Die Studienprotokolle wurden von der zuständigen Ethikkommission der Universitätsklinik Tübingen [Projekt-Nr. 010/2012BO1] freigegeben.

Die Untersuchungen wurden mit Hilfe des Studienbüros der Abteilung für Thoraxchirurgie² der Klinik Schillerhöhe geplant, organisiert, durchgeführt, ausgewertet und archiviert.

Sponsor dieser Studie ist die Firma Sony Deutschland GmbH, Material Science Laboratory (Hedelfingerstr. 61, 70327 Stuttgart). Die Firma stellte den Prototypen SonyNose-G2_SN8 (siehe 2.2.4) und die verwendeten Gasmäuse (siehe 2.2.2) zur Analyse der Atemproben zur Verfügung. In den Laboren der Firma Sony wurden die gaschromatographisch-massenspektroskopie-basierten Untersuchungen (GC-MS-) der Probenröhrchen durchgeführt.

2.2 Studiengruppen

Die Studienteilnehmer waren

- a) Patienten der Abteilung Thoraxchirurgie der Klinik Schillerhöhe in Stuttgart
- b) Patienten der Pneumologie der Klinik Schillerhöhe in Stuttgart
- c) Mitarbeiter der Klinik Schillerhöhe in Stuttgart

Alle Studienteilnehmer erfüllten die in Tab. 5 ausgewiesenen Ein- und Ausschlusskriterien.

² Prof. Walles leitete als Mitglied der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg in den Jahren 2012 und 2013 in Nebentätigkeit das von ihm initiierte Studienbüro an der Klinik Schillerhöhe. Das Studienbüro der Abteilung für Thoraxchirurgie wurde mit öffentlichen Fördermitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung für die Organisation und Durchführung von klinischen Studien an der Klinik Schillerhöhe eingerichtet.

Tab. 5: Ein- und Ausschlusskriterien.

	Kollektiv A	Kollektiv B	Kollektiv C
Beschreibung	Gesunde Kontrollpersonen	Studienkollektiv BC-Patienten	Studienkollektiv COPD-Patienten
Einschluss- Kriterien	18 - 80 LJ einwilligungsfähig unauffällige kardiopulmonale Auskultation	18 – 80 LJ einwilligungsfähig radiologischer Verdacht auf ein BC	18 – 80 LJ einwilligungsfähig pathologische Bodyplethysmo- graphie COPD-Anamnese
Ausschluss- Kriterien	Krebsanamnese (jeder Krebs)	in nachfolgender routinemäßiger Befundabklärung kein BC andere maligne Erkrankung (auch in der Anamnese)	Krebsanamnese (jeder Krebs)
Rekrutierung	Klinik Schillerhöhe		
Fallzahl	50	40	10

Die Studiendauer betrug für den einzelnen Probanden weniger als 15 Minuten. Die gesamte Studie wurde in dem Zeitraum vom 30.05.2012-04.10.2012 durchgeführt.

Auf Basis der erhobenen Parameter wurden alle Studienteilnehmer in die Gruppen „Gesund“, „Krebs“ und „COPD“ eingeteilt.

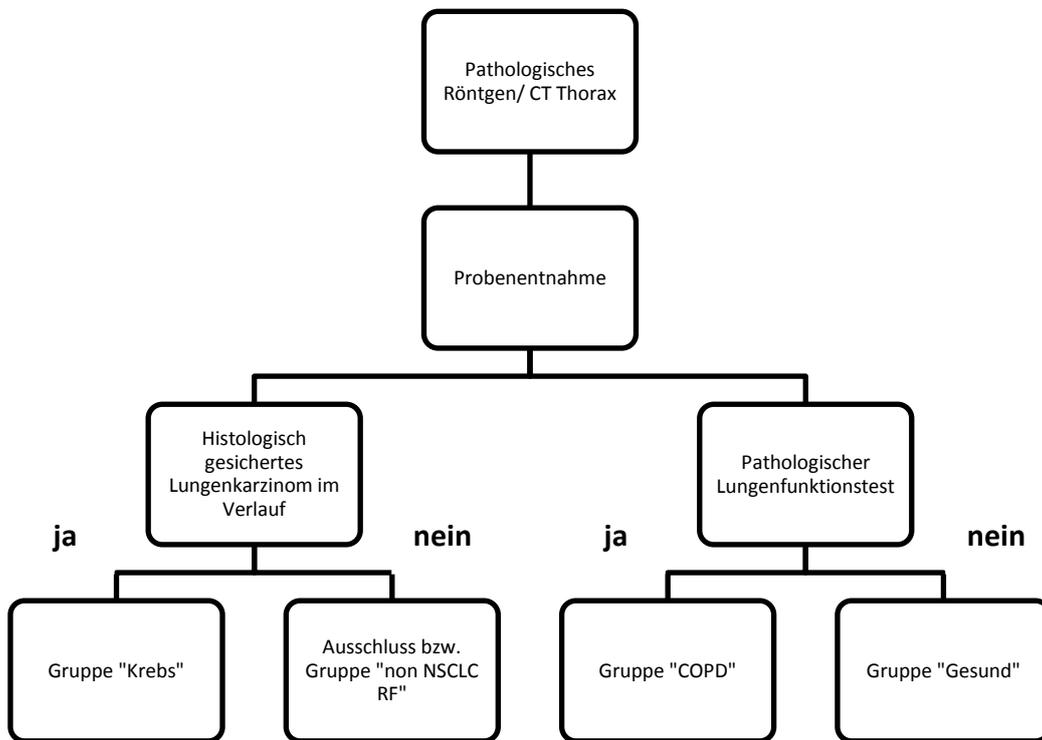


Abb. 3: Einteilung der Studienteilnehmer.

2.3 Klinische Datenerhebung

Von allen Studienteilnehmern wurden folgende Daten erfasst: Alter, Geschlecht, Vor- und Begleiterkrankungen, Krankheitssymptome, Medikamenteneinnahme (regelmäßig und am Abgabetag der Atemprobe), Nikotinkonsum (nie, aktuell, Ex-Raucher).

Jeder Studienteilnehmer wurde als Raucher eingestuft, der am Tag der Probennahme bzw. einen Tag vorher noch geraucht hat. Ein Proband der mindestens eine Woche vor Probennahme das Rauchen eingestellt hat, wurde als Ex-Raucher eingestuft. Nicht-Raucher war derjenige, der zeitlebens keinen Tabak konsumiert hat.

Des Weiteren wurden bei Probennahme Raumtemperatur, Luftfeuchtigkeit und Uhrzeit notiert.

Bei Patienten mit Lungenkrebs wurde zusätzlich erfasst, ob die Probennahme vor oder nach einer Tumorbiopsie (Intervention ≥ 14 Tage) gewonnen wurde sowie der histologische Tumortyp und das Tumorstadium.

Für die Datenerfassung wurde ein Erhebungsbogen verwendet (Abb.4).

2.4 Analyseverfahren

2.4.1 Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC-MS)

Durch die Massenspektrometrie lassen sich neben Molekülmasse und Summenformel einer Verbindung ebenso chemische Strukturinformationen gewinnen. Ihre hohe Empfindlichkeit, die Vielfalt der zur Verfügung stehenden Methoden und die mögliche Kopplung mit chromatographischen Verfahren und Verknüpfung mit Datenbanken machen sie zu einem sehr wertvollen und weitverbreiteten Hilfsmittel in der chemischen Analytik. Bei der Massenspektrometrie überführt man den Analyt, also die zu untersuchende Substanz, in einen Strahl gasförmiger Ionen. Die Ionen werden durch ein elektrisches Feld beschleunigt und dann nach ihrem Masse-Ladungs-Verhältnis aufgetrennt. *„Damit gehört die Massenspektrometrie streng genommen nicht zu den spektroskopischen Methoden, da sie nicht auf der Absorption oder Emission elektromagnetischer Strahlung beruht. Sie ist eine spektrometrische Analyseverfahren“* [37]. Ein Massenspektrometer besteht aus drei Einheiten: 1) der Ionenquelle, in der der Analyt ionisiert wird; 2) dem Analysator, durch den die Auftrennung entsprechend dem Masse-zu-Ladung-Verhältnis im Vakuum erfolgt, und 3) einem Detektor, der die eintreffenden Ionen registriert und als Signale aufzeichnet. Das so erhaltene Massenspektrum ist eine Auftragung der detektierten Ionen gegen die Signalintensität. Je höher das Signal ist, desto stabiler ist das zugehörige Ion [37].

Probennummer/ Probanden-ID	Datum Probenentnahme:	Geburtsjahr:	Geschlecht:
<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> .20 <input type="text"/> <input type="text"/>	19 <input type="text"/> <input type="text"/>	m <input type="checkbox"/> w <input type="checkbox"/>

Einschlusskriterien:

ist eine Frage mit „nein“ zu beantworten, so ist der Proband von der Studie auszuschließen

Ja Nein

- | | | |
|---|--------------------------|--------------------------|
| 1. Alter über 18 Jahre | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 2. Proband ist einwilligungsfähig | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 3. schriftliche Einverständniserklärung liegt vor | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

Ausschlusskriterien:

ist eine Frage mit „ja“ zu beantworten, so ist der Proband von der Studie auszuschließen

- | | | |
|--|--------------------------|--------------------------|
| 1. maligne Erkrankungen in der Vorgeschichte | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
|--|--------------------------|--------------------------|

Begleiterkrankungen: _____

Medikamente: _____

Wurden heute Medikamente eingenommen? Ja Nein

Wenn ja welche: _____

Nikotin:

Nie Raucher:

Aktiver Raucher _____ Zigaretten /Tag _____ PY*

Ex Raucher bis: _____ PY*

*PY (pack years) ist die Zahl der täglich konsumierten Zigarettenpackungen (Inhalt ca. 20 Stück) wird mit der Zahl der Raucherjahre multipliziert. Beispiel: Ein Raucher raucht vier Jahre lang zwei Packungen Zigaretten am Tag, somit ergeben sich (2x4) acht Packungsjahre.

Probenabgabe:

Uhrzeit: _____ Uhr Raumtemperatur: _____ °C Luftfeuchtigkeit: _____ %
 Gasmaus-Nr. _____ / Referenz-Nr. _____

Abb. 4: Erhebungsbogen für die Studienteilnahme.

Als Gaschromatographie wird ein Trennverfahren bezeichnet, bei dem heterogene Gleichgewichte zur Stofftrennung genutzt werden können. Voraussetzung dafür ist, dass sich die Stoffe beim Wechsel zwischen den Phasen nicht zersetzen. Es werden Gleichgewichte zwischen den Phasen fest und gasförmig genutzt. Dabei ist die feste Phase unbeweglich (=stationär), die andere ist beweglich (=mobil). Die mobile Phase, in der sich die Stoffe befinden, die getrennt werden sollen, durchströmt die feste Phase. Die Stofftrennung erfolgt nach dem Prinzip, dass die Einzelkomponenten aufgrund unterschiedlicher Wechselwirkungen mit der stationären Phase mehr oder weniger stark zurückgehalten werden [37]. *„An der stationären Phase stellen sich Gleichgewichte zwischen der Lösung und dem Festkörper ein: Unterschiedliche Verteilungskoeffizienten und mehrfache Wiederholung der Gleichgewichtseinstellung führen am Ende zur Trennung. Auch die Länge der Wegstrecke, die sich die mobile Phase in der stationären bewegt, spielt dabei eine Rolle“* [37].

2.4.2 SonyNose-G2_SN8³

Die SonyNose ermöglicht es, komplexe Gasproben zu analysieren. Dies sind zum Beispiel auch Atemproben. Es werden keine Einzelkomponenten gemessen, sondern die Gesamtheit der Proben, welche mit einem Referenzgas (gereinigte Luft mit 50% Luftfeuchtigkeit) verglichen werden. Das Gerät ermöglicht die Messung, das Anzeigen und die Speicherung des Messsignals (Widerstand gegen Zeit) der 32 chemischen Sensoren und eines Temperatursensors. Alle Sensoren sind auf einem Chipträger platziert und bilden das Sensorarray. Die Sensoren basieren auf einer Nanoverbundstruktur, welche Metall-Nanopartikel mit organischen Molekülen verkettet. Folgenden Materialien sind in den Sensoren enthalten: AuS2 „neu“, AuMAO, AuBHA, AuHDT, AuS2 „alt“, Pt2MPA, PtPEIb, PtC12A, PtP4, PtHDT, PtNT, PtMAH, PtP1, PtBGA, AuDT, PtPPA.



Abb. 5: T-Sensor auf einem Chip-Träger.

³ Sonynose Bedienungsanleitung_Final Version 14062012

2.5 Sammelgefäße

2.5.1 Probenröhrchen

Die für die Probennahme verwendeten Probenröhrchen bestehen aus einem Duranglasröhrchen mit einem Durchmesser von 22 mm, einer Glasdicke von 1,8 mm und einer Länge von 120 mm von der Firma Gaßner Glastechnik GmbH (Haderunstr. 4, 81375 München). An beiden Seiten kann dieses Glasröhrchen mit einem Gummistopfen (17x 23x 30 mm) verschlossen werden. Die Füllung bildet eine Polypropylenwatte (Firma Asota Ges.m.b.H., Schachenmayerstr. 22, A-4021 Linz, Österreich). Diese Watte wurde zur Hälfte jeweils hydrophil und hydrophob silikonisiert (Firma CHT BEZEMA, CHT R. BEITLICH GMBH, Bismarckstr. 102, D-72072 Tübingen). Jeweils ein 6 mal 4 cm großer Streifen dieser Watten wurden aufeinander gelegt, zusammengerollt und in die Duranglasröhrchen gesteckt.

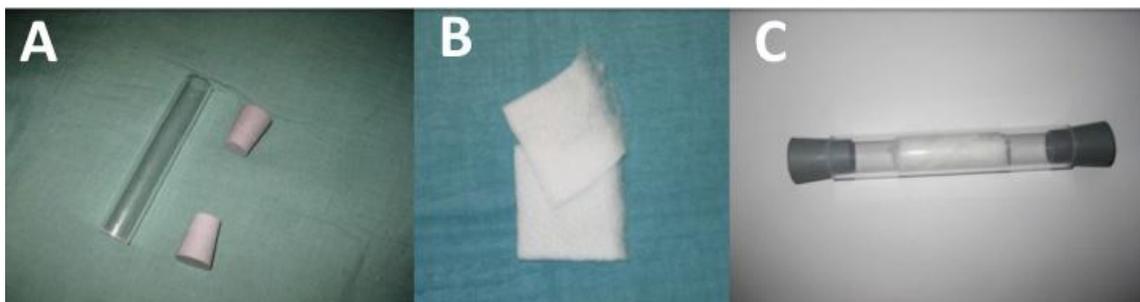


Abb. 6: Herstellung der Probenröhrchen.

A) Duranglasröhrchen mit Gummistopfen, B) Je ein hydrophob bzw. hydrophil silikonisierter Polypropylenwattestreifen, C) Fertiges Probenröhrchen.

Alle Röhrchen wurden auf dieselbe Art gefüllt. Um eine mögliche Kontamination der Watte mit Körpersekreten zu minimieren, wurden bei der Herstellung Handschuhe getragen. Die fertigen Röhrchen wurden unter Lichtausschluss bei Zimmertemperatur in Kartons im Studienbüro der Abteilung Thoraxchirurgie der Klinik Schillerhöhe aufbewahrt.

2.5.2 Gasmaus (Gasprobenbehälter)

Die Gasmäuse wurden von der Firma Sony Deutschland GmbH (Hedelfingerstr. 61, 70327 Stuttgart) zur Verfügung gestellt. Es handelt sich hierbei um einen Glaskolben (SUPELCO, product Nr. 2-2145-U), der an beiden Enden durch ein Ventil zu öffnen oder zu schließen ist. Die Ventile bestehen aus Teflon (PTFE, weiß) und Polypropylen (PP, grün). Das Volumen der Gasmaus beträgt 1 Liter. Um für die Studie verwendet werden zu können, wurde der kommerzielle Supelco Glaskolben modifiziert:

- 1) Das Bohrloch des PTFE Ventils wurde von 2 mm auf 4 mm Durchmesser vergrößert.
- 2) Das Septum wurde von einem Glas-Bläser versiegelt.
- 3) Das Innere des Glaskolbens wurde mit Monochlorotrimethylsilane (Aldrich, Catalog Nr. 92361, 99%) beschichtet.



Abb. 7: Sony Gasmaus.

Der Silanisationsprozess wurde in acht Schritten durchgeführt: Zuerst wurden die grünen Polypropylen-Teile von den Ventilen entfernt. Daraufhin wurden die Ventile mit einem Teflonband gesichert und 1ml Monochlorotrimethylsilan (Aldrich, Catalog Nr. 92361, Reinheit 99%, CAS-Nummer. 75-77-4) in die Gasmaus injiziert. Die Gasmaus wurde daraufhin für zwei Stunden bei +175°C in einen Heizofen verbracht. Nach dem Abkühlungsprozess wurde die Gasmaus, um alle Reste zu entfernen, zuerst mit 70%-igem Ethanol (CAS-Nummer. 64-17-5) gespült und mit sterilem Wasser (CAS-Nummer. 7732-18-5) gewaschen und daraufhin noch einmal für zwei Stunden bei +160°C ohne

die Ventile in den Heizofen verbracht. Nach diesem Vorgang werden die Ventile remontiert und die Gasmaus kann verwendet werden.

Je Proband werden zwei Sony Gasmäuse verwendet. Eine davon wird für die Atemprobe des Probanden verwendet, die zweite wurde von der Firma Sony mit einem Testgas (gereinigte Luft mit 50% Luftfeuchtigkeit) gefüllt und dient als Referenz. Die Gasprobenbehälter dürfen nur einmal verwendet werden und sind danach in der Originalverpackung an die Firma Sony zurückzuschicken. Dort durchlaufen diese eine spezielle Reinigung und sind dann erneut verwendbar.

Der Reinigungsprozess der Gasmäuse wird in 10 Schritten durchgeführt: Zuerst wird die Gasmaus innen mit einem 70%-igem Ethanol-Wasser-Gemisch gespült. Danach werden an beiden Seiten von dem Glaskolben die Ventile entfernt und für einen separaten Waschgang beiseite gelegt. Die Ventile werden in ihre Bestandteile, Teflon (PTFE, weiß) und Polypropylen (PP, grün), zerlegt. Die grünen Polypropylen-Bestandteile werden wiederum in einem 70%-igem Ethanol-Wasser-Gemisch gereinigt und dann bei Raumtemperatur getrocknet. Daraufhin wird an der äußeren Oberfläche des Glaskolbens ein Temperatur-Indikator (Hersteller: VWR, Produkt-Nr. SEMA4343) befestigt. Der Glaskolben und die weißen Teflon-Bestandteile der Ventile werden in einen Heizofen verbracht und dort bei +180°C für zwei Stunden belassen. Nach Ablauf der zwei Stunden und Abkühlung des Glaskolbens und der Teflon-Bestandteile auf Raumtemperatur, können die einzelnen Bestandteile der Ventile wieder zusammen gebaut werden. Der Temperatur-Indikator muss überprüft werden. Der Indikator sollte sich gelb verfärbt haben und schwarze Streifen aufweisen, wenn die Temperatur im Ofen +180°C erreicht hat und über zwei Stunden diese Temperatur gehalten wurde.



Abb. 8: Gasmaus mit Temperatur-Indikator (Produkt-Nr. SEMA4343) (A) und versiegelte und etikettierte Gasmaus (B).

Die Ventile werden an beiden Enden des Glaskolbens befestigt. Die Gasmaus wird mit einem Testgas (gereinigte Luft mit 50% Luftfeuchtigkeit) bei Raumtemperatur gefüllt und in einen Plastikbeutel zum Transport in die Klinik Schillerhöhe verbracht. Der Plastikbeutel wird mit einem Etikett, wie in Abbildung 8 gezeigt, versehen.

2.6 Probensammlung

Alle Atemproben wurden in einem speziell hierfür eingerichteten Raum mit wenig Publikumsverkehr gewonnen, um das Risiko einer Kontamination zu minimieren. In dem Raum wurden vier Stunden vor Probennahme keine flüchtigen Desinfektionsmittel oder organische Lösungsmittel eingesetzt. Außerdem wurden Atemproben von jeweils einem gesunden Probanden sowie einem Patienten mit Verdacht auf ein Lungenkarzinom in einem Zeitraum von 24 Stunden gesammelt, um eine annähernd gleiche Umgebungsatmosphäre zu gewährleisten.

Nach Aufklärung des Probanden und Erhebung der Anamnese mit den für die Studie relevanten Daten (siehe Abb. 4), wurden von dem Probenröhrchen beide Gummistopfen entfernt. Für die Atemprobengewinnung mussten die Studienteilnehmer 3- bis 5-malig tief einatmen und anschließend ruhig und anhaltend (nicht forciert) durch das Probenröhrchen ausatmen. Um zu gewährleisten, dass auch der alveoläre Anteil der Atemluft erfasst wird, wurden die Patienten aufgefordert, möglichst viel auszuatmen. Das Röhrchen wurde zur Aufbewahrung wieder mit den Gummistopfen verschlossen, mit einem vierstelligen pseudonymisierten

Patientencode versehen und für die gaschromatographischen analytischen Untersuchungen in den F&E Bereich der Firma Sony Deutschland GmbH verbracht.

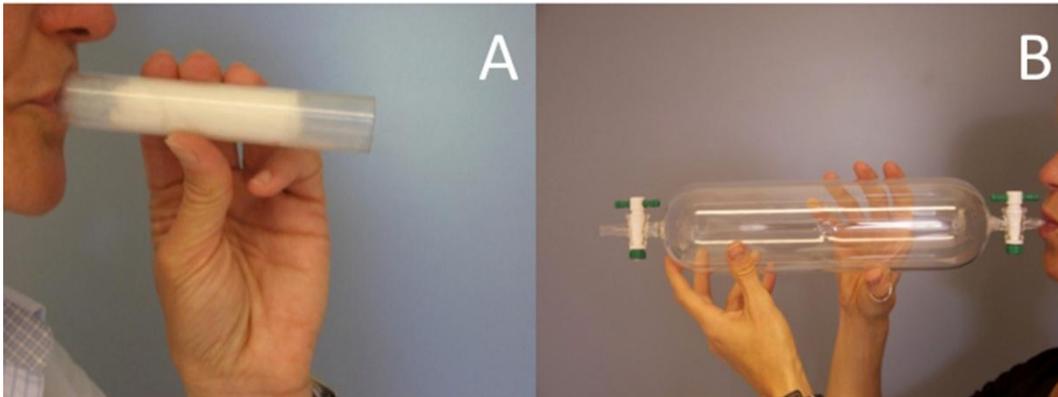


Abb. 9: Probensammlung Probenröhrchen (A) und Gasmaus (B).

Des Weiteren gab der Proband eine weitere Atemprobe in die Gasmaus ab. Dazu wurden die Ventile an beiden Seiten der Gasmaus geöffnet, sodass ein Luftaustausch in der Gasmaus stattfinden konnte. Der Proband wurde erneut aufgefordert, 3- bis 5-mal tief einzuatmen und anschließend ruhig und anhaltend durch die Gasmaus auszuatmen. Um die Reproduzierbarkeit der Methodik untersuchen zu können, musste jeder Patient zwei Gasmäuse mit einer Atemprobe füllen. Nach Probengewinnung wurden die Ventile wieder luftdicht verschlossen, die Gasmäuse mit einem vierstelligen pseudonymisierten Code versehen und innerhalb der nächsten 20 Minuten mittels der SonyNose-G2_SN8 durch Einbringen der Atemluftprobe in das Gerät analysiert.

2.7 Übertragung der VOC`s auf Tenax absorbierende Röhrchen

Tenax ist ein poröses Polymerharz auf der Basis von 2,6-Diphenyloxid⁴. Es wurde speziell für das Einfangen von flüchtigen volatilen organischen Bestandteilen aus der Luft bzw. Atemluft entwickelt. Um die bestmögliche Übertragung der flüchtigen organischen Verbindungen (VOC) von der PP-Watte auf Tenax zu gewährleisten, wurden vorab einige Tests durchgeführt. Diese Experimente hatten den Zweck, die

⁴ <http://www.sisweb.com/index/referenc/tenaxtam.htm>

besten Bedingungen für die Übertragung zu identifizieren. Dabei spielten vor allem die Temperatur und die Zeit, sowie der Schmelz- und Zersetzungspunkt der Watte eine wichtige Rolle. Würde sich die Watte zersetzen, würde das Gerät Verbindungen messen, die aus der Watte, nicht aber aus der Atemluft des Patienten stammen.

Die thermogravimetrische Analyse (TGA) und die dynamische Differenzkalorimetrie (DSC) wurden an einem Netzsch TGA 209 und Netzsch DSC 204 (Erich Netzsch GmbH & Co. Holding KG, Gebrüder-Netzsch-Straße 19, 95100 Selb, Deutschland) durchgeführt (Abb. 10).

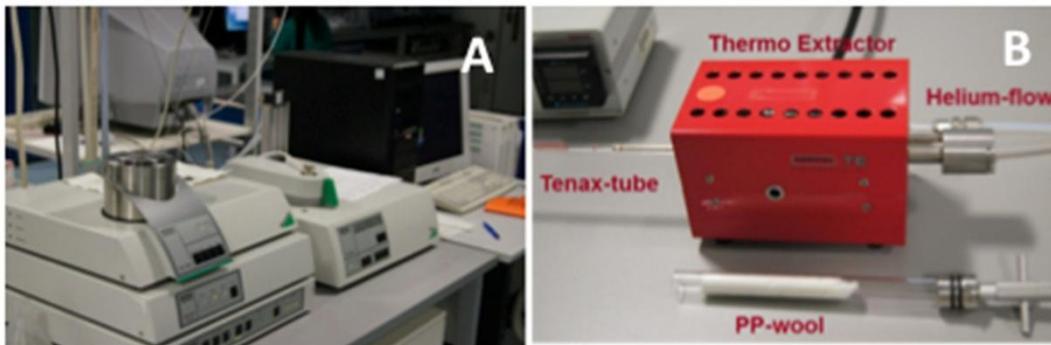


Abb. 10: Netzsch TG 209, Netzsch DSC 204 (A) und Stand-alone Thermoextraktor (B).

Für die thermogravimetrische Analyse wurden etwa 10 mg der PP-Watte in einen Al_2O_3 -Tiegel verbracht. Die Messung wurde bei $+25^\circ\text{C}$ gestartet und mit einer Heizrate von 10 K/min und mit gereinigtem N_2 als Spülgas bis $+900^\circ\text{C}$ fortgeführt. Die Daten wurden unter Verwendung der Netzsch Software ausgewertet. Der Beginn der Zersetzung wurde als Zersetzungstemperatur bestimmt. Für die dynamische Differenzkalorimetrie wurden etwa 5 mg von der PP-Watte abgewogen und in einen Al-Tiegel verbracht. Pro Probe wurden zwei Heiz – Kühl- Zyklen durchgeführt. Die Starttemperatur für den Erhitzungs-Zyklus lag bei $+30^\circ\text{C}$, für den Kühl-Zyklus bei $+230^\circ\text{C}$. Die Heizrate von 10K/min und gereinigtes N_2 als Spülgas wurde in allen Experimenten beibehalten.

Der Zweck all dieser Experimente bestand darin, so quantitativ wie möglich die VOC`s, die sich auf der PP-Watte aus den Probenröhrchen befinden, auf Tenax-Röhrchen (Tenax TA 60/80 mesh, GERSTEL, Deutschland) zu transferieren. Letztere wurden für die CG -MS-Analyse verwendet, um die VOC`s in Atemproben von gesunden Probanden, Lungenkrebs- und COPD-Patienten zu identifizieren. Der Transfer wurde an

einem Stand-alone Thermoextraktor (GERSTEL GmbH & Co.KG, Eberhard-Gerstel-Platz 1, 45473 Mühlheim an der Ruhr, Deutschland) durchgeführt (Abb. 10).

Vor der Übertragung wurden die Tenax Röhrchen durch Erhitzen auf +280°C und Spülen mit He-Gas über einen Zeitraum von vier Stunden vorkonditioniert, um eine Kontamination des Tenax zu verhindern. Außerdem wurden GC-MS-Messungen der vorkonditionierten Röhrchen durchgeführt, um die Leerspektren zu bestimmen. Vor der Übertragung wurde die PP-Watte aus den Probenröhrchen entnommen und in ein Quarzrohr mit einem Durchmesser passend zu dem Einlass des Thermoextraktors überführt. Das vorkonditionierte Tenax Röhrchen wurde am Auslass des Thermoextraktors montiert. Um die VOC aus der PP-Watte auf das Tenax-Röhrchen zu übertragen, wurde He-Gas (Druck: 4 bar) als Trägergas durch das Rohrsystem geleitet. Die Betriebstemperatur des Thermoextraktors lag bei allen Experimenten bei +50 °C, die Übertragungszeit betrug jeweils 15 Minuten.

2.8 Probenmessung

2.8.1 GC-MS-Messung der Tenax-Röhrchen nach Probentransfer

Die GC-MS-Messungen wurden auf einem GC-MS 6890N Gaschromatographen (Agilent Technologies, Herrenberger Str. 130, 71034 Böblingen, Deutschland) durchgeführt. Dieses Gerät ist mit einem MS 5975 inerten massenselektiven Detektor (Agilent Technologies), einem Autosampler (TDSA) und einer Thermodesorptionseinheit (TDSS) (beide von GERSTEL GmbH & Co.KG, Eberhard-Gerstel-Platz 1, 45473 Mühlheim an der Ruhr, Deutschland) ausgestattet. Die Kapillarsäule Agilent Ultra 2/50m, Durchmesser 320.00 µm (Modell Nummer: Agilent 19091B -015) mit 5% Phenylmethylsiloxan wurde als stationäre Phase (nominale Schichtdicke: 0,17µm) verwendet. Die Zersetzungstemperatur in der TDS wurde bei +280 °C festgelegt.

Die GC Datenauswertung wurde mit einer GC-502 Data Analysis Software (Agilent Technologies, Herrenberger Str. 130, 71034 Böblingen, Deutschland) durchgeführt. Um die VOC-Peaks identifizieren zu können, wurde die Datenbank WILEY 6N-L mit ihren Referenzsubstanzen herangezogen. Dabei wurden die Massen-Spektren der

gemessenen Peaks und deren Verweildauer mit den Einträgen in der Referenzdatenbank verglichen. Eine Substanz wurde als „reichlich vorhanden“ in der Probe berücksichtigt, wenn die Übereinstimmung zwischen dem gemessenen Massenmuster und dem Muster in der Datenbank höher als 76% war. Alle Stoffe mit einer positiven Übereinstimmung (>76%) wurden nach ihren Retentionszeiten in einer Excel-Tabelle zur weiteren statistischen Auswertung aufgelistet.



Abb. 11: GC-MS Gerät. A) GC-MS Gerät B) Ansicht des geschlossenen Autosamplers C) Tenax absorbierende Röhrchen

2.8.2 Handhabung der SonyNose-G2_SN8

Eine eingebaute Pumpe sorgt für die Entnahme der Gasproben aus den Gasprobenbehältern und strömt das Gas über die Sensoren. Mit Hilfe eines eingebauten Ventils wird von Referenzgas zu Testgas hin und her geschaltet. Durch den Gasauslass fließt das Gas wieder aus dem Gerät heraus. Der Gaseinlass des Referenz- und des Testgases sowie der Gasauslass befinden sich an der rechten Seite des Gerätes. Auf der linken Seite des Gerätes befinden sich der Stromanschluss, ein Anschluss für die Netzwerkverbindung und das USB-Kabel sowie der Ein- und Ausschaltknopf.

Das Gerät muss 2 Stunden vor Gebrauch eingeschaltet werden, um eine gleichbleibende Temperatur während des Betriebs zu gewährleisten. Ist die Betriebstemperatur nicht konstant, besteht die Gefahr, dass die Messdaten fehlerhaft sind und nicht verwendet werden können.

Um eine Messung zu starten, werden zuerst die Informationen, die mit der Datei gespeichert werden sollen, in das Fenster „information entry “ eingegeben. Diese Informationen sind Patienten-Code, Geschlecht, Alter, Rauchverhalten, Diagnose, Temperatur, Luftfeuchtigkeit und die Gasmausnummer. Danach werden die Gasprobenbehälter Referenzgas und Testgas mit dem jeweiligen Gaseinlass verbunden. Dazu wird ein Ventil der Gasmaus geöffnet und die Nadel des passenden Schlauches (Referenzgas oder Testgas) in den Gasprobenbehälter eingeführt. Die Probensonde muss dabei etwas Spiel am Einlass aufweisen, um einen Unterdruck während der Messung zu vermeiden indem Umgebungsluft in den Gasprobenbehälter gezogen werden kann. Nun kann die Messung gestartet werden, indem man auf den grünen Pfeil im Control-Fenster klickt.

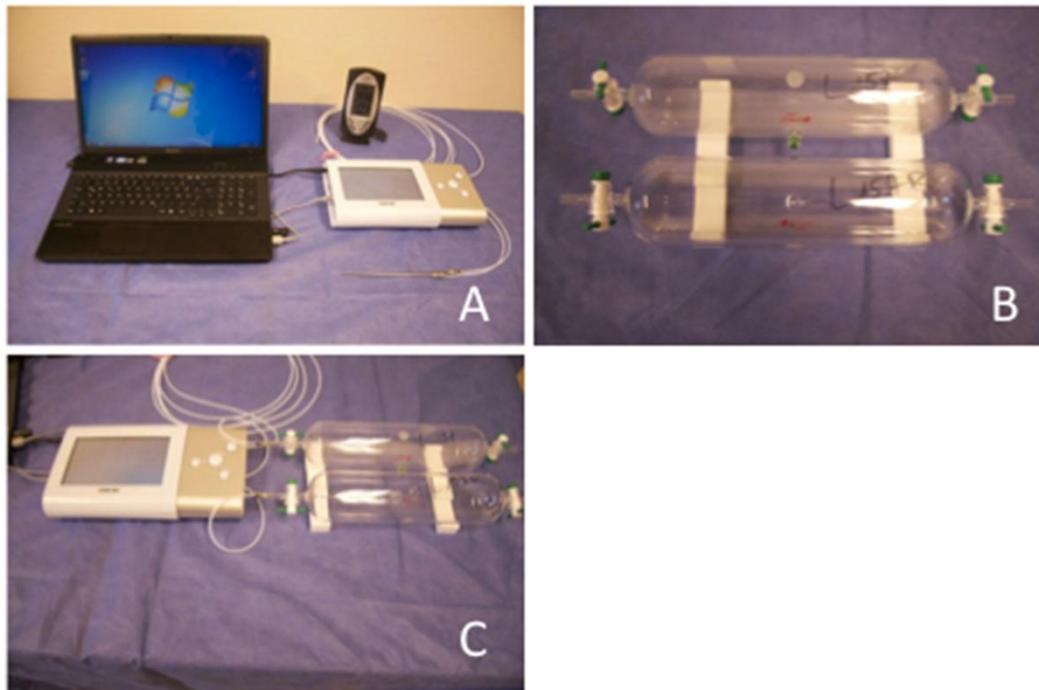


Abb. 12: SonyNose-G2_SN8.

A) Laptop zur Datenerfassung mit angeschlossener SonyNose-G2_SN8 und Temperatur- und Luftfeuchtigkeitsmessinstrument B) Test-Gasmaus und Gasmaus mit Referenzgas C) SonyNose-G2_SN8 mit Gasprobenbehälter (Testgas und Referenzgas).

2.9 Statistische Auswertung

Unter Zuhilfenahme des Statistikprogramms SPSS (Version 15 für Windows, SPSS Inc, Chicago, Ill), wurden alle statistischen Auswertungen vorgenommen. Dazu gehört die Ermittlung der Mittelwerte, der Standardabweichungen und der Signifikanzniveaus ρ . Um die qualitativen Variablen zu testen, wurde der Chi^2 -Test angewendet. War dieser nicht anwendbar, wurde eine Vier-Felder-Tafel erstellt und diese mittels Fisher`s exact Test ausgewertet. Mittels Mann-Whitney-U-Test wurden die quantitativen Variablen berechnet. Bei den Vergleichen werden die Signifikanzniveaus ρ angegeben. Bei Werten von $\rho \leq 0,05$ unterscheiden sich die Gruppen ausreichend voneinander, bei $\rho > 0,05$ ist der Unterschied zwischen den Gruppen nicht signifikant.

3 Ergebnisse

3.1 Zusammensetzung der Untersuchungsgruppen

Für die Studie wurden in dem Zeitraum vom 30.05.2012 bis zum 04.10.2012 insgesamt Atemproben von 124 Probanden gesammelt, davon 65 gesunde Studienteilnehmer, 43 Patienten mit histologisch gesichertem Lungenkrebs und 10 Patienten mit COPD. Außerdem wurden entgegen dem Protokoll noch 6 weitere Proben von Patienten, die nach histologischer Abklärung an keinem Lungenkrebs, sondern an anderen raumfordernden Prozessen der Lunge litten, in die Untersuchungen mit eingeschlossen. Diese werden unter der Gruppe „nicht lungenkrebspezifische Raumforderungen“ (auch als „non NSCLC RF“ bezeichnet) zusammengefasst. Die Untersuchungsgruppen wurden gemäß der Ein- und Ausschlusskriterien, wie in Kapitel 2.2 beschrieben, nach Fertigstellung der funktionellen Untersuchungen und des onkologischen Stagings eingeteilt.

Für jede Untersuchungsgruppe wurde die Verteilung der Parameter Alter, Geschlecht, aktueller Zigarettenkonsum, Krebserkrankungen in der Vorgeschichte, Vor- und Nebenerkrankungen sowie aktuelle Medikamenteneinnahme analysiert.

Die Geschlechtsverteilung sowie die Altersverteilung waren in den Gruppen deutlich verschieden. In der gesunden Gruppe befinden sich zu über 70% weibliche Studienteilnehmer, in der „Lungenkrebs“-Gruppe finden sich mehr männliche Studienteilnehmer und in der Gruppe „COPD“ war die Geschlechterverteilung ausgewogen. In der Gruppe „nicht lungenkrebspezifische RF“ befinden sich 67% männliche Studienteilnehmer.

Das Durchschnittsalter der gesunden Studienteilnehmer lag bei $35,6 \pm 12,5$ Jahren, das der Lungenkrebs-Patienten bei $65,3 \pm 9,5$ Jahren und das der COPD-Patienten bei $67,8 \pm 7,6$ Jahren. Das Durchschnittsalter der Gruppe „nicht lungenkrebspezifische RF“ lag bei $58,5 \pm 12,2$ Jahren.

Entgegen dem Protokoll hatten in der Gruppe der Lungenkrebs-Patienten 2 Probanden eine Krebserkrankung in der Vorgeschichte. In der Gruppe der Gesunden und der an COPD erkrankten Patienten wurde eine maligne Vorerkrankung ausgeschlossen. Bei

einem Teil der Patienten mit Lungenkrebs wurde vor der Probenentnahme schon eine Bronchoskopie oder CT gesteuerte Punktion durchgeführt.

Alle Studienteilnehmer der Gruppe „COPD“ waren bzw. sind Raucher, in der „Lungenkrebs“-Gruppe waren bzw. sind etwa 74% Raucher, in der Gruppe der Gesunden ist das Verhältnis zwischen Raucher und Nicht-Raucher annähernd ausgeglichen.

Tab. 6: Zusammensetzung der Untersuchungsgruppen.

	Gruppe „Gesund“	Gruppe „Krebs“	Gruppe „COPD“	Gruppe „non NSCLC RF“	Gesamt
n	65	43	10	6	124
Alter (J), MW±SD	35,6±12,5	65,3±9,5	67,8±7,6	58,5±12,2	49,6±18,5
Geschlecht (m:w) n	19:46	26:17	5:5	4:2	54:70
Rauchverhalten n					
Nie-Raucher n/%	31/47,6	11/25,6	0/0	1/16,7	43/34,7
Ex-Raucher n/%	17/26,2	21/48,8	9/90,0	5/83,3	52/41,9
Raucher n/%	17/26,2	11/25,6	1/10,0	0/0	29/23,4
Krebs in Anamnese n/%	0/0	2/4,7	0/0	1/16,7	3/2,4
Vorherige Intervention n/%	0/0	13/30,2	0/0	0/0	13/10,5

3.1.1 Verwendete Proben für GC-MS-Messungen

Insgesamt wurden für diese Messungen 124 Atemproben von Probanden gesammelt. Aufgrund von umfassenden Restrukturierungsmaßnahmen der Firma Sony⁵, die zu einer Einstellung des Forschungsbetriebs in der kooperierenden Abteilung am Standort Stuttgart führten, konnten leider nicht alle Proben ausgewertet werden: Für die gaschromatographische-massenspektrometrische Analyse wurden lediglich 27 Probenröhrchen untersucht und stehen für die nachfolgenden Auswertungen zur Verfügung. Von diesen 27 Proben gehörten 11 Proben zu der histologisch gesicherten Lungenkrebs-Gruppe, 9 Proben zu den gesunden Probanden und 1 Probe der Gruppe COPD an. Sechs Proben wurden aufgrund des nachfolgenden histologischen Befundes aus der Gruppe Krebs ausgeschlossen, da es sich um entzündliche Prozesse bzw. nicht tumoröse Rundherde in der Lunge handelte. Zum Vergleich werden die 6 aussortierten Proben jedoch unter „nicht lungenkrebspezifische Raumforderungen“ in die Auswertung miteinbezogen. Die nicht lungenkrebspezifischen Raumforderungen der 6 Probanden unterteilen sich in Hamartochondrom, Lymphom, Mesotheliom, entzündlicher Tumor und in Metastasen eines Kolon-Karzinoms.

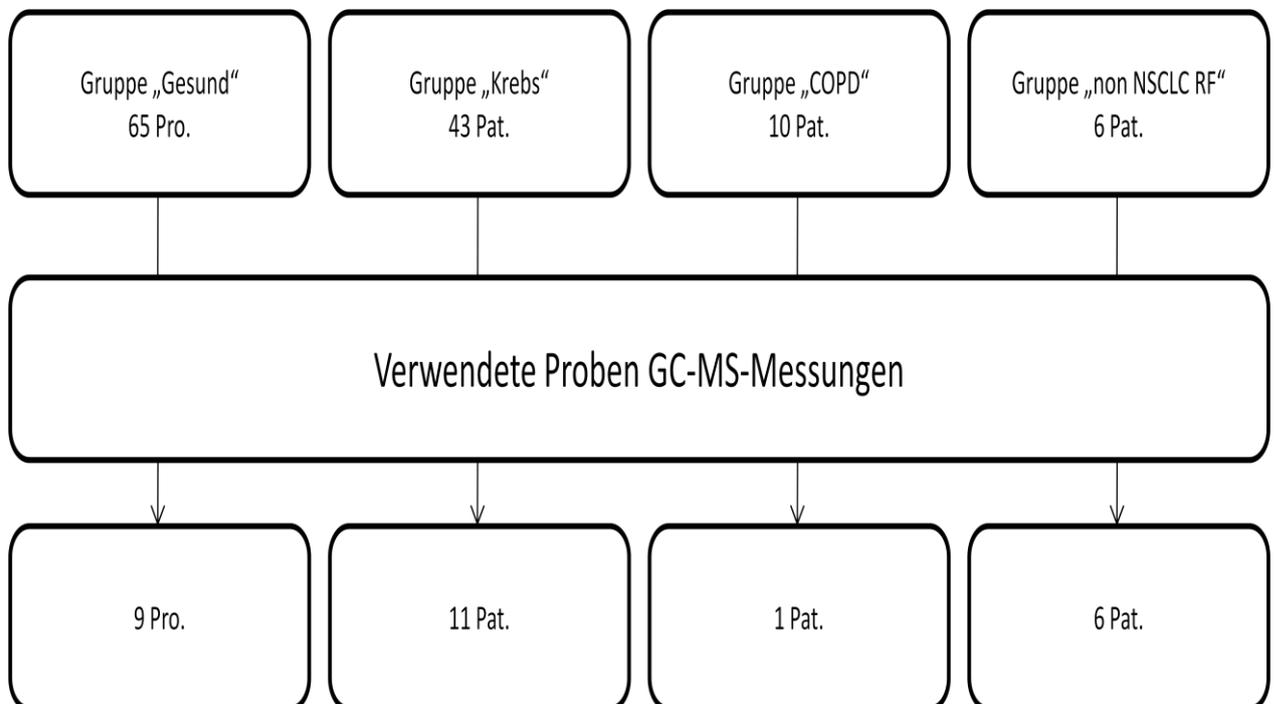


Abb. 13: Darstellung der Studienpopulation für die GC-MS-Messungen.

⁵ <http://www.pcpro.co.uk/news/372562/2-9-billion-loss-plunges-sony-into-crisis>

Die Geschlechterverteilung in den einzelnen Untersuchungsgruppen ist deutlich unterschiedlich: In der Lungenkrebsgruppe befinden sich zu etwa 45% Männer, in der Gruppe der gesunden Probanden sind jedoch ausschließlich Frauen integriert. In der Gruppe der nicht lungenkrebspezifischen Raumforderungen befinden sich 67% Männer.

Das Durchschnittsalter in der Gruppe Lungenkrebs liegt bei $67,5 \pm 9,9$ Jahren, das in der Gruppe der gesunden Probanden bei $46,1 \pm 6,5$ Jahren. In der Gruppe der nicht lungenkrebspezifischen Raumforderungen beträgt das Durchschnittsalter $58,5 \pm 12,2$ Jahre.

Diese 27 Probanden sind jedoch nicht repräsentativ für das gesamte Patientenkollektiv, da die Unterschiede in dieser analysierten Subgruppe in der Geschlechterverteilung (Gruppe Gesund 70% vs. 100% weibliche Studienteilnehmer, Gruppe Krebs 40% vs. 55% weibliche Studienteilnehmer) sowie im Patienten-Alter (Gruppe Gesund $35,6 \pm 12,5$ vs. $46,1 \pm 6,5$ Jahre, Gruppe Krebs $65,3 \pm 9,5$ vs. $67,5 \pm 9,9$ Jahre) zu groß sind.

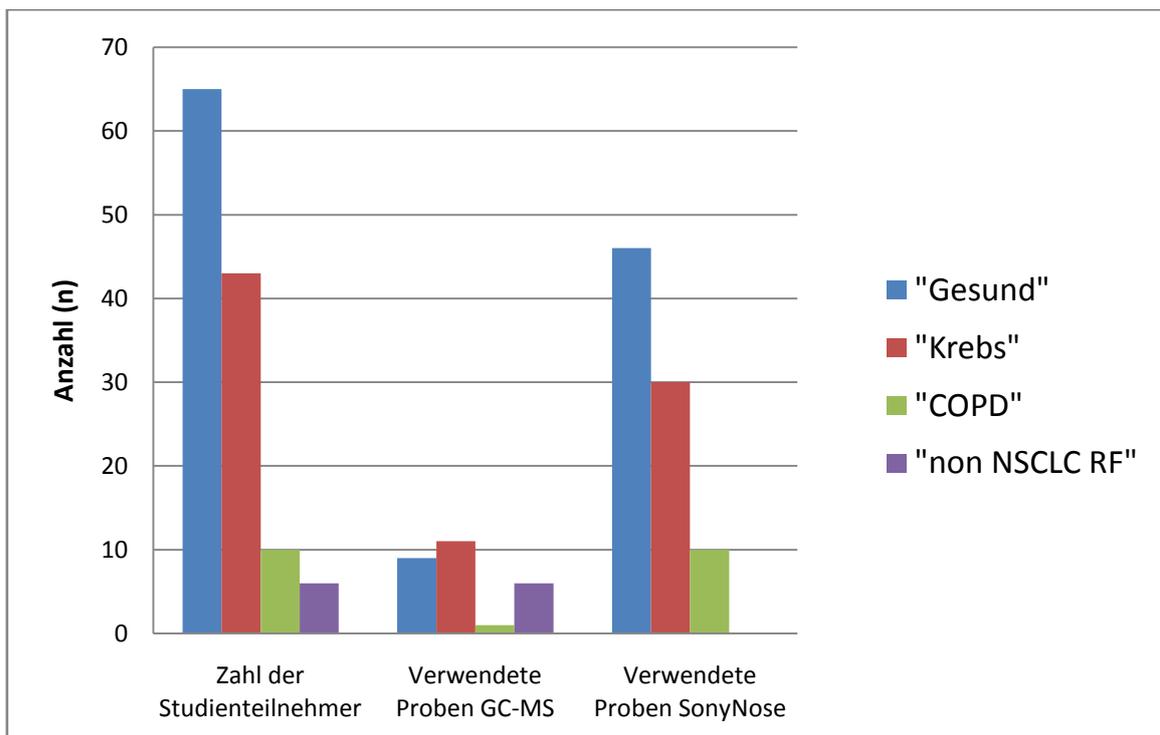


Abb. 14: Vergleich der verwendeten Proben für die Untersuchungen.

Tab. 7: Subgruppenvergleich gesamtes Patientenkollektiv und verwendete Proben für GC-MS-Messungen.

	Gesund		Krebs		COPD		Non NSCLC RF		Gesamt	
	Gesamt	GC-MS	Gesamt	GC-MS	Gesamt	GC-MS	Gesamt	GC-MS	Gesamt	GC-MS
n	65	9	43	11	10	1	6	6	124	27
Alter (J) MW±SD	35,6±12,5	46,1±6,5	65,3±9,5	67,5±9,9	67,8±7,6	77±0	58,5±12,2	58,5±12,2	49,6±18,5	58,7±13,4
Geschlecht (m:w) n	19:46	0:9	26:17	5:6	5:5	1:0	4:2	4:2	54:70	10:17
Nie-Raucher n/%	31/47,6	4/44,5	11/25,6	5/45,5	0/0	0/0	1/16,7	1/16,7	43/34,7	10/37,1
Ex-Raucher n/%	17/26,2	3/33,3	21/48,8	4/36,4	9/90,0	1/100	5/83,3	5/83,3	52/41,9	13/48,1
Raucher n/%	17/26,2	2/22,2	11/25,6	2/18,1	1/10,0	0/0	0/0	0/0	29/23,4	4/14,8
Krebs in Anamnese n/%	0/0	0/0	2/4,7	0/0	0/0	0/0	1/16,7	1/16,7	3/2,4	1/3,7
Vorherige Intervention n/%	0/0	0/0	13/30,2	2/18,2	0/0	0/0	0/0	0/0	13/10,5	2/7,4

3.1.2 Verwendete Proben für die SonyNose-G2_SN8

Insgesamt wurden aus den 124 gesammelten Atemproben 10 Atemproben aufgrund technischer Fehler ausgeschlossen. Dabei handelte es sich unter anderem um 6 Atemproben die vor dem 30.05.2012 gesammelt wurden, jeweils 4 von gesunden Probanden (P301-P304) und 2 von Lungenkrebs-Patienten (L101-L102). Außerdem wurde eine Atemprobe eines gesunden Probanden (P354) vom 18.09.2012 verworfen, da die Betriebstemperatur von 31°C der SonyNose-G2_SN8 noch nicht erreicht wurde. Eine gesunde (P359) Atemprobe vom 24.09.2012 und eine Lungenkrebs-Atemprobe (L105) vom 30.05.2012 wurden aufgrund eines Ausfalls des Messgerätes ebenfalls ausgeschlossen, sowie eine gesunde Atemprobe (P365) vom 02.10.2012, da nur sehr wenige VOCs im Gasbehälter vorhanden waren.

Außerdem zeigte sich im Experimentverlauf, dass am 18.07.2012 eingesetzte neue Sensoren eine andere Verhaltensweise aufwiesen als die zuvor verwendeten Sensoren. Deshalb wurden für die weitere Analyse nur diejenigen Atemproben verwendet, die nach dem 18.07.2012 gesammelt und ausgewertet wurden.

Somit wurden 30 Atemproben aus der Gruppe Lungenkrebs, 45 Atemproben aus der Gruppe Gesund und 10 Atemproben aus der Gruppe COPD für die endgültige Analyse verwendet (Abb. 15).

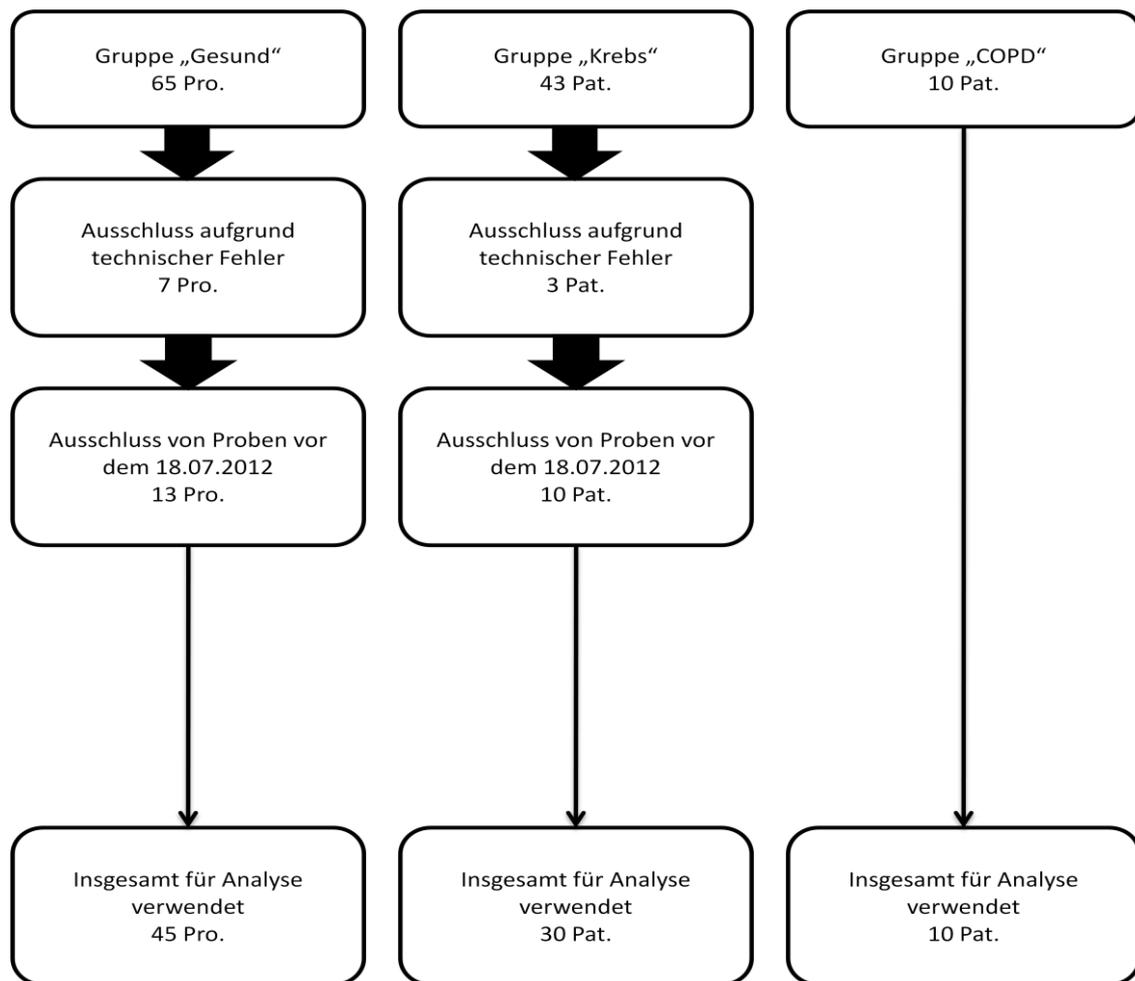


Abb. 15: Darstellung der Studienpopulation für die SonyNose-G2_SN8.
(Pro.=Proband, Pat.=Patient)

Die Geschlechterverteilung in den resultierenden Untersuchungsgruppen ist deutlich unterschiedlich: In der Lungenkrebs-Gruppe befinden sich 57% Männer, in der Gruppe der gesunden Probanden sind zu etwa 30% Männer integriert. In der Gruppe der COPD-Patienten ist das Geschlechterverhältnis ausgeglichen.

Das Durchschnittsalter in der Gruppe Lungenkrebs liegt bei $63,2 \pm 9,3$ Jahren, das in der Gruppe der gesunden Probanden bei $34,9 \pm 13,3$ Jahren. In der COPD-Gruppe beträgt das Durchschnittsalter $67,8 \pm 7,6$ Jahre.

Wenn man die zur Auswertung verwendeten Proben mit dem gesamten Patientenkollektiv vergleicht, gibt es gute Übereinstimmungen zwischen der Lungenkrebs-Gruppe, der COPD-Gruppe und der Gruppe der gesunden Probanden in Bezug auf Alter und Geschlecht.

Tab. 8: Subgruppenvergleich gesamtes Patientenkollektiv und verwendete Proben für die SonyNose-G2_SN8.

	Gesund		Krebs		COPD		Non NSCLC RF		Gesamt	
	Gesamt	SonyNose	Gesamt	SonyNose	Gesamt	SonyNose	Gesamt	SonyNose	Gesamt	SonyNose
n	65	45	43	30	10	10	6	0	124	85
Alter (J) MW±SD	35,6±12,5	34,9±13,3	65,3±9,5	63,2±9,3	67,8±7,6	67,8±7,6	58,5±12,2	0±0	49,6±18,5	48,7±18,7
Geschlecht (m:w) n	19:46	14:31	26:17	17:13	5:5	5:5	4:2	0:0	54:70	36:49
Nie-Raucher n/%	31/47,6	20/44,4	11/25,6	7/23,3	0/0	0/0	1/16,7	0/0	43/34,7,	27/31,7
Ex-Raucher n/%	17/26,2	14/31,1	21/48,8	14/46,7	9/90,0	9/90,0	5/83,3	0/0	52/41,9	37/43,5
Raucher n/%	17/26,2	11/24,5	11/25,6	9/30,0	1/10,0	1/10,0	0/0	0/0	29/23,4	21/24,7
Krebs in Anamnese n/%	0/0	0/0	2/4,7	2/6,7	0/0	0/0	1/16,7	0/0	3/2,4	2/2,4
Vorherige Intervention n/%	0/0	0/0	13/30,2	9/30,0	0/0	0/0	0/0	0/0	13/10,5	9/10,6

3.2 Probengewinnung von Patienten mit Lungenkrebserkrankung

Es wurden insgesamt 57 Atemproben von Patienten mit radiologischem Verdacht auf Lungenkrebs gesammelt, da die Gewinnung der Atemproben schon vor der histologischen Sicherung erfolgen sollte. So konnte die gewünschte Fallzahl von 40 Patienten mit gesichertem Lungenkrebs erreicht werden. Um eine ausreichende Fallzahl zu gewinnen, wurden in Erweiterung der ursprünglichen Ausschlusskriterien auch Patienten miteinbezogen, die bereits vor mehr als 14 Tagen eine Bronchoskopie oder computertomographisch gesteuerte Punktion erhalten hatten. Außerdem wurden 2 Patienten mit einer malignen Vorerkrankung in die Gruppe „Krebs“ eingeschlossen.

3.3 Lagerungszeitraum der Proben

Nach den Erfahrungen der vorangegangenen Studie [23] können die für die Untersuchung verwendeten Probenröhrchen problemlos für 40 Tage gelagert werden. Die Probenröhrchen wurden gesammelt, um dann mehrere Probenröhrchen gleichzeitig mit dem technisch aufwändigen gaschromatographisch-massenspektrometrischen-Verfahren durchmessen zu können. Die Untersuchungsproben wurden nach Abschluss der Studie entsorgt.

Die Atemproben in den Gasmäusen wurden vor Ort innerhalb von 20 Minuten nach Probennahme mit dem von der Firma Sony bereitgestellten Messgerät SonyNose-G2_SN8 in der Klinik Schillerhöhe analysiert. Die Behältnisse wurden daraufhin an die F&E Einheit der Sony Deutschland GmbH verbracht um dort gereinigt und autoklaviert zu werden.

3.4 Krebserkrankungen

Bei der histologischen Subtypisierung der Lungenkarzinome leidet das Patientenkollektiv zu etwa 60 % an einem Adenokarzinom und zu ca. 28% an einem Plattenepithelkarzinom. Der Rest verteilt sich mit ähnlicher Häufigkeit auf das typische Karzinoid, das atypische Karzinoid, das sarkomatoide Karzinom, das neuroendokrine Karzinom und das großzellig-neuroendokrine Karzinom mit anteilig plattenepithelialer Differenzierung.

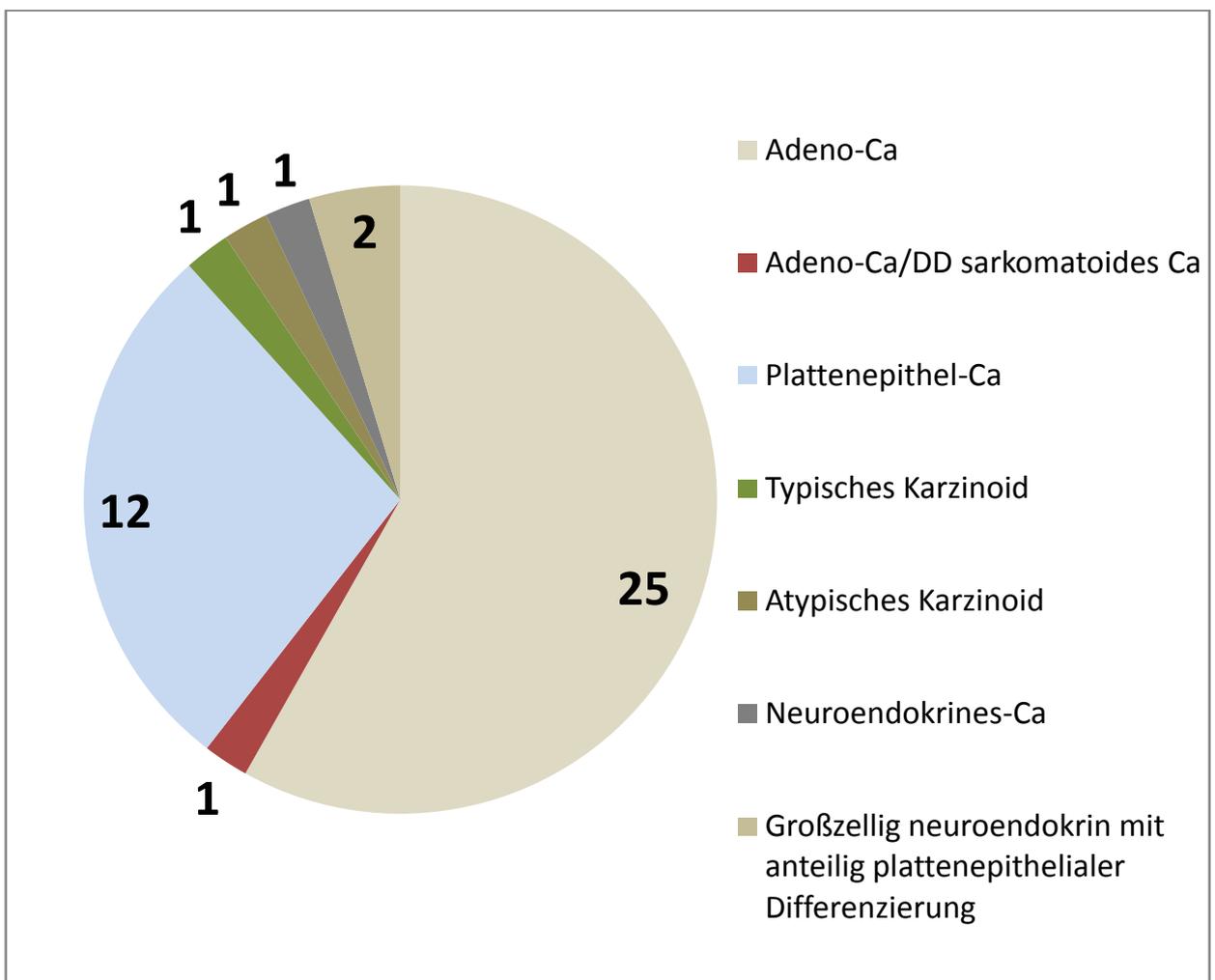


Abb. 16: Histologische Subtypisierung des Lungenkarzinoms aller Studienteilnehmer.

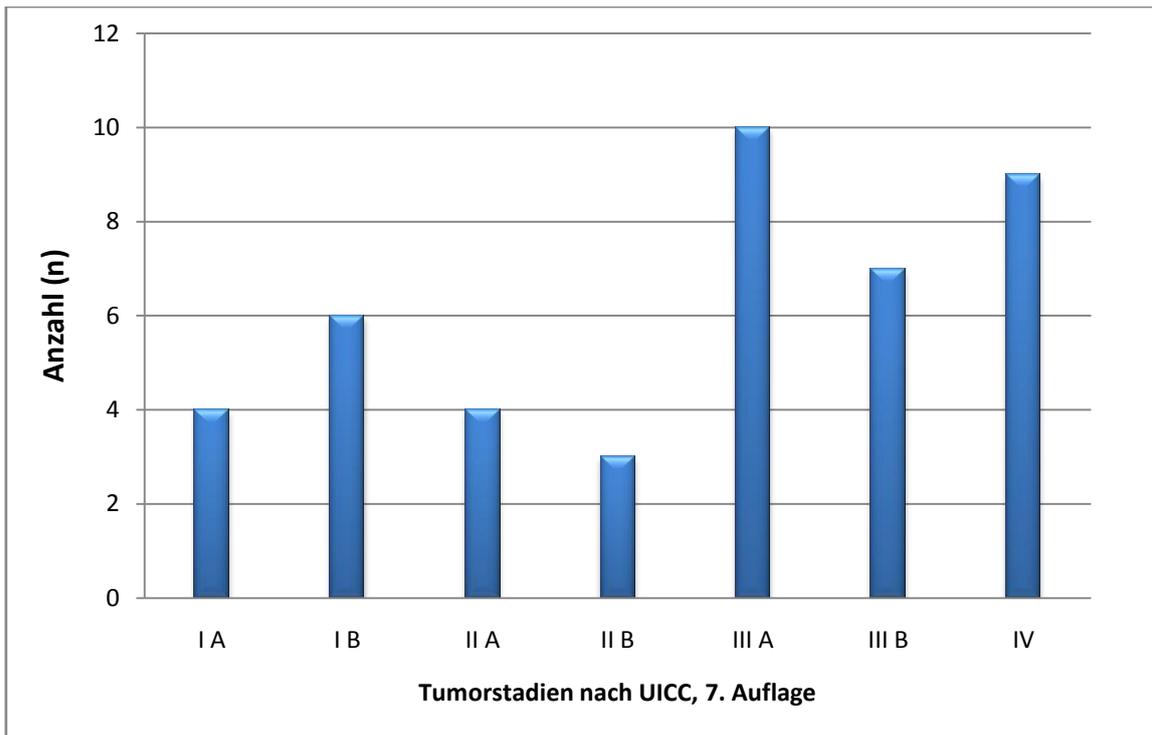


Abb. 17: Verteilung der Tumorstadien.

Wie man an der Abbildung 17 erkennen kann, gehört die Mehrzahl der an Lungenkrebs erkrankten Patienten den fortgeschrittenen Tumorstadien an (10 der Lungenkrebs-Probanden Tumorstadium UICC IIIA, 7 der Lungenkrebs-Patienten Stadium IIIB und 9 Lungenkrebs-Probanden dem Stadium UICC IV). Somit weisen über 60% der an Lungenkrebs erkrankten Studienteilnehmer bereits mehrere Lymphknotenmetastasen beziehungsweise Fernmetastasen auf.

3.5 Nebenerkrankungen

Um Auswirkungen von vorliegenden Begleiterkrankungen auf die Untersuchungen zu ermitteln, wurden diese bei allen Studienteilnehmern protokolliert. Insgesamt wurden 28 Begleiterkrankungen der Studienpopulation dokumentiert. Dabei liess sich feststellen, dass die Gruppe mit Lungenkrebs und die Probanden mit COPD zusätzlich an mehr Begleiterkrankungen leiden gegenüber der Gruppe Gesund.

Die vier häufigsten Begleiterkrankungen zeigt Abbildung 18. Die restlichen Begleiterkrankungen wurden in der Tabelle 9 zusammengefasst.

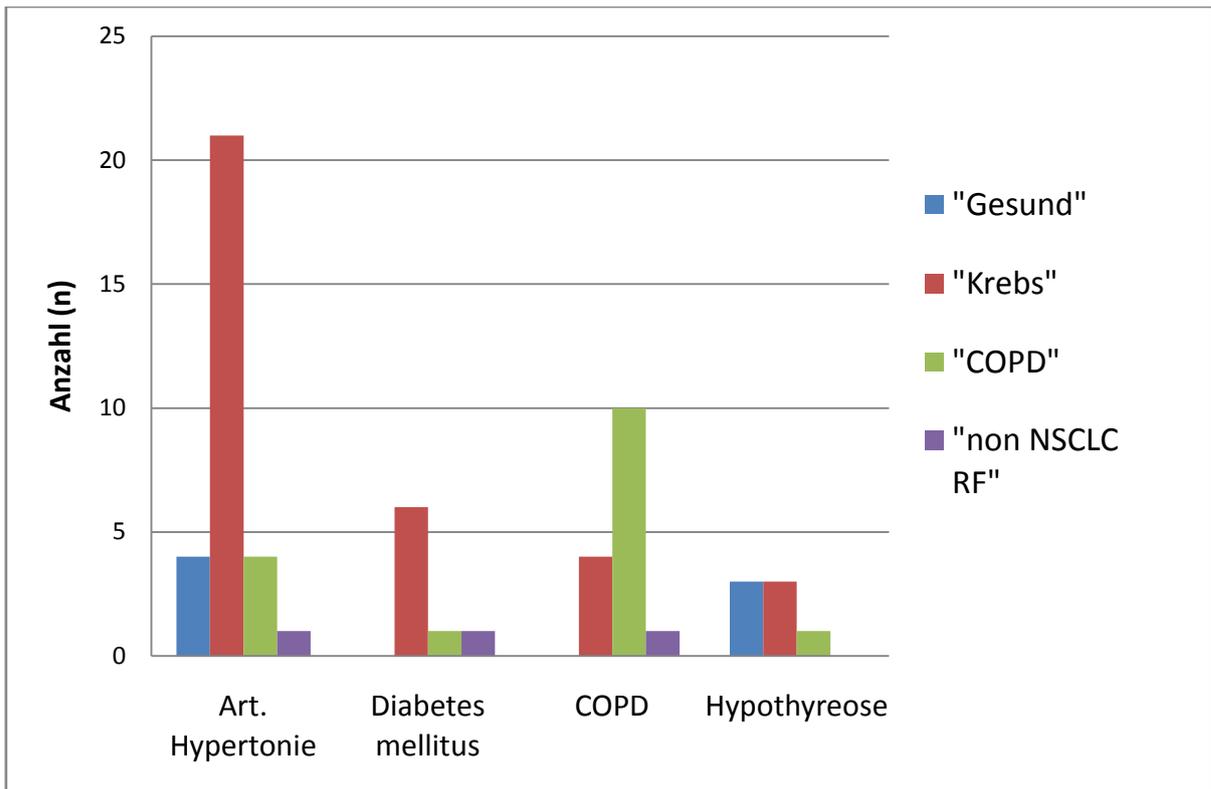


Abb. 18: Die vier häufigsten Begleiterkrankungen der Studienteilnehmer.

Tab. 9: Nebenerkrankungen der Studienteilnehmer.

	Gesund	Krebs	COPD	Non NSCLC
	n/%	n/%	n/%	RF
				n/%
Arthritis	0/0	1/2,3	1/10,0	1/16,7
Asthma	6/9,2	0/0	0/0	0/0
Chron. Anämie	1/1,5	0/0	0/0	0/0
Chronische Gastritis	0/0	0/0	1/10,0	1/16,7
Chron. Niereninsuffizienz	0/0	1/2,3	1/10,0	0/0
Colitis	1/1,5	0/0	0/0	0/0
Gicht	0/0	1/2,3	0/0	0/0
Glaukom	0/0	1/2,3	0/0	0/0
Hashimoto	0/0	0/0	0/0	1/16,7
Herzinfarkt	0/0	4/9,3	0/0	0/0
Herzinsuffizienz	0/0	2/4,7	0/0	0/0
Heuschnupfen	2/3,1	2/4,7	0/0	0/0
Hypercholesterinämie	0/0	3/7,0	0/0	0/0
Hyperkalzämie	0/0	0/0	1/10,0	0/0
Hyperlipidämie	0/0	2/4,7	0/0	0/0
Hyperthyreose	0/0	2/4,7	1/10,0	0/0
Hyperurikämie	0/0	2/4,7	1/10,0	0/0
KHK	0/0	5/11,6	0/0	0/0
Mitralklappeninsuffizienz	0/0	2/4,7	0/0	0/0
M. Crohn	0/0	1/2,3	0/0	0/0
M. Parkinson	0/0	1/2,3	0/0	0/0
Osteoporose	0/0	1/2,3	2/20,0	0/0
Rez. Bronchitis	0/0	2/4,7	0/0	0/0
Struma nodosa	0/0	1/2,3	1/10,0	1/16,7

3.6 Medikamente als Störfaktoren

Insgesamt wurden bei unseren 124 Studienteilnehmern bei der Erhebung der regelmäßig eingenommenen Medikamente und eingenommenen Medikamente am Tag der Probenentnahme 100 unterschiedliche Wirkstoffe detektiert (siehe Anlage II). Dabei lässt sich feststellen, dass die Gruppe Gesund wie zu erwarten nur wenige Medikamente einnimmt. Die Gruppe Krebs konsumiert hauptsächlich Medikamente gegen Herzerkrankungen, die Gruppe COPD gegen Lungenerkrankungen.

3.7 GC-MS Messungen

3.7.1 Messung der leeren PP-Watte

Um die Bedingungen für den Probentransfer festzulegen, wurden einige Vorversuche durchgeführt. Die Ergebnisse der thermographischen Analyse (TGA) und der dynamischen Differenzkalorimetrie-Messung (DSC) einer leeren PP-Watte zeigt Abbildung 19. In der Abbildung wird die Zersetzungstemperatur der Watte bei ca. +300°C dargestellt. Die Watte schmilzt jedoch bereits bei niedrigeren Temperaturen von ca. +165°C. Deshalb wurden von der Firma Sony Deutschland GmbH für den Probentransfer folgende Bedingungen festgelegt:

1. Temperatur: +50°C
2. Dauer: 15 Minuten

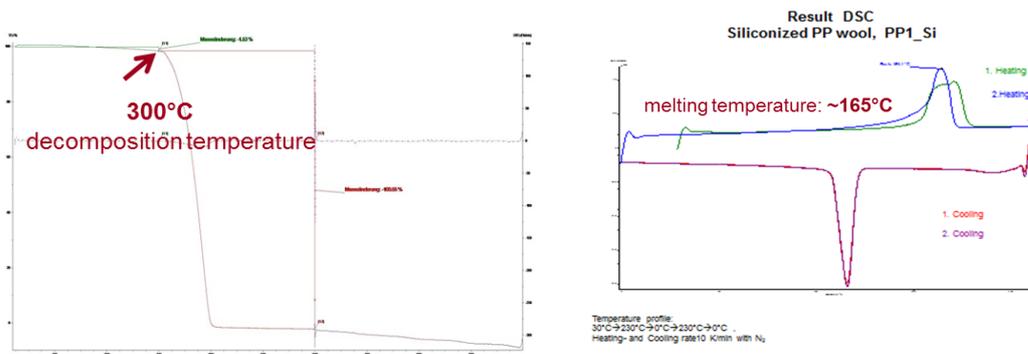


Abb. 19: TGA-Thermogram und DSC-Thermogram der PP-Watte.

Um die Substanzen, die in der Watte enthalten sind, zu identifizieren, wurde eine nicht beatmete Probe davon analysiert. Somit kann ausgeschlossen werden, dass Substanzen, die in der Watte selbst enthalten sind, fälschlicherweise als Lungenkrebs-Marker angenommen werden. Von den insgesamt 263 identifizierten Substanzen konnten 37 Substanzen innerhalb der nicht beatmeten „reinen“ Polypropylen-Watte gemessen werden.

- 1.) 2 Propanol
- 2.) N,N-dimethyl amine
- 3.) Carbon-disulfide
- 4.) Ethylamine
- 5.) Acetic acid
- 6.) Benzene
- 7.) Ethylene glycol
- 8.) Methandiamine
- 9.) Propionic acid
- 10.) Propylene glycol
- 11.) Formamide
- 12.) 2-methyl-2,4-Pentanediol
- 13.) N,N-dimethylacetamide
- 14.) α -Pinene
- 15.) 2,2 Oxybis Ethanol (diethylene glycol)
- 16.) 1,3,5-trimethyl benzene
- 17.) 2-Ethylen-1-Hexanol
- 18.) dl-Limonene
- 19.) Benzylalcohol
- 20.) 2(3H)-Furanone
- 21.) 2-Pyrrolidinone
- 22.) 1-phenyl-Ethanone
- 23.) N-Ethylaniline
- 24.) 2(2-butoxyethoxy)Ethanol
- 25.) 2,6 Dimethylbenzaldehyde

- 26.) Tetramethylthiourea
- 27.) 2,4-dimethyl benzyl alcohol
- 28.) 1-Decanol
- 29.) 1,2,4-Methenoazulene
- 30.) Dodecane
- 31.) Acetamide
- 32.) BHT-aldehyde
- 33.) 1,4 methenoazulene, Junipene
- 34.) BHT
- 35.) 2-Thylen-1,4-benzodioxin
- 36.) 2,6-di(t-butyl)-4-hydroxy-4-methyl-2,5-cyclohexadien-1-one
- 37.) 2,6-di(t-butyl)-4-methylene-2,5-cyclohexadien-1-one

3.7.2 Messungen der beatmeten PP-Watte

Ein typisches Chromatogramm einer Atemprobe zeigt Abbildung 20. Es handelt sich hierbei um die Atemprobe eines Lungenkrebs-Patienten. Die dazugehörige Liste der identifizierten Substanzen mit deren Retentionszeit und Übereinstimmungsparameter zeigt Tabelle 10. Die in rot markierten Substanzen sind Zersetzungsprodukte der PP-Watte.

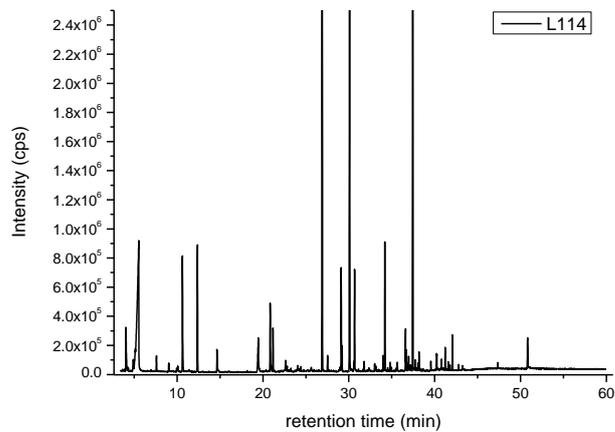


Abb. 20: GC-Chromatogramm einer Atemprobe (Lungenkrebs-Patient L114).

Tab. 10: Liste der identifizierten Substanzen- Lungenkrebs-Patient L114.

Substance	L114	Retention time, min	Match factor, %
N,N - dimethylamine	x	4,028	86
carbon-disulfide	x	4,31	83
Aceticacid	x	4,835	90
Propyleneglycol	x	9,041	91
Ethylmethylamine	x	9,956	83
Toluene	x	10,078	93
Dimethylformamide	x	10,644	91
Hexamethylcyclotrisiloxane	x	12,378	83
Acetamide	x	14,649	91
Ethanol	x	19,458	83
C3 Benzene	x	19,927	94
Phenol	x	20,37	94
Tetramethylurea	x	20,841	91
Octamethylcyclotetrasiloxane	x	21,18	83
n-Decane	x	21,35	91
1,3-Dichlorbenzene	x	21,783	97
1-methyl-2-ethylbenzene	x	22,631	97
dl-Limonene	x	22,82	98
Benzylalcohol	x	22,933	87
2-Pyrollidinone	x	24,036	83
Phenylmethylketone	x	24,413	93
n-Undecane	x	25,619	93
N-Ethylaniline	x	26,901	96
Decamethylcyclopentasiloxane	x	27,532	83
Benzaldehyde	x	28,974	91
Tetramethylthiourea	x	30,114	91
Pentadecane	x	31,782	80
n-Tridecane	x	32,338	96
methylnaphthalene	x	32,612	83
N,N-dimethylbenzamide	x	34,534	87
1,2,4-methenoazulene	x	34,836	98
n-Tetradecane	x	34,987	97
Cyperene	x	35,486	93
Junipene	x	35,656	98
Bis(1,1-dimethylethyl)-benzene	x	36,608	96
2,6-cyclohexadiene-1,4-dione	x	36,674	98
Octadecane	x	36,975	91
2,4-bis(dimethylethyl)-phenol	x	37,296	95
Eicosane	x	37,748	83
Methylethylphenylacetate	x	38,191	80
Docosane	x	40,82	90
BHT-aldehyde	x	41,245	93
Octahydro-2-(3-mitrophenyl)- (2H)1,3-Benzoxazine, trans	x	50,839	98

Insgesamt konnten in den 27 Proben 263 Substanzen (siehe Anhang III) mithilfe der Datenbank WILEY 6N-L identifiziert werden.

Bei der Auswertung der Proben wurden von den 263 gefundenen Substanzen nur diejenigen als signifikant bewertet, die im Vergleich zu den Messungen bei den gesunden Probanden einen Unterschied von Faktor 3 aufwiesen. Die Gruppe COPD kann aufgrund der geringen Fallzahl in die Auswertung nicht mit einbezogen werden. Durch diese Einschränkung konnten 20 Substanzen mit einem signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ermittelt werden. In Tabelle 11 sind die identifizierten Stoffe aufgelistet.

Tab. 11: Identifizierte Unterschiede zwischen den Gruppen.

	Gruppe „Gesund“ [n/%]	Gruppe „Krebs“ [n/%]	Gruppe „non NSCLC RF“ [n/%]
Ethylen-N,N-dimethylcarbamate	3/33,3	0/0	0/0
Pivalinsäure	2/22,2	8/72,7	2/33,3
Styrene	4/44,4	1/9,1	2/33,3
Diethylenglycol	2/22,2	8/72,7	3/50
1,2,4-Trimethylbenzene	1/11,1	5/45,5	1/16,7
1,2,3-Trimethylbenzene	1/11,1	7/63,6	0/0
2,2-OxybisEthanol (diethylenglycol)	6/66,7	2/18,2	2/33,3
2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-phenol	6/66,7	2/18,2	3/50
Benzaldehyde	6/66,7	2/18,2	5/83,3
Benzoic acid	2/22,2	7/63,6	1/16,7
Diethylenglycolmonobutylether BDG	0/0	4/36,4	1/16,7
n-Hexadecane	6/66,7	0/0	4/66,7
2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-2,5-cyclohexadien-1,4-dione	5/55,6	1/9,1	3/50
2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methyl phenol	5/55,6	1/9,1	3/50
n-Heptacosane	1/11,1	6/54,6	0/0
n-Tetracosane	1/11,1	6/54,6	0/0
Hexacosane	1/11,1	6/54,6	0/0
Methyl naphthalene	3/33,3	1/9,1	3/50
3,3,6,9,9-pentamethyl...oxide	4/44,4	1/9,1	3/50
Dodecamethylcyclohexasiloxane	3/33,3	1/9,1	0/0

Um den Faktor 3 stiegen von gesunden Probanden zu Lungenkrebs-Patienten folgende Substanzen an:

- 1.) Pivalinsäure
- 2.) Diethylenglycol
- 3.) 1,2,4-Trimethylbenzene
- 4.) 1,2,3-Trimethylbenzene
- 5.) Benzoic acid
- 6.) n-Heptacosane
- 7.) n-Tetracosane
- 8.) Hexacosane
- 9.) Diethylenglycolmonobutylether BDG

Um den Faktor 3 fielen von gesunden Probanden zu Lungenkrebs-Patienten folgende Substanzen ab:

- 1.) Ethylen-N,N-dimethylcarbamate
- 2.) Styrene
- 3.) 2,2-OxybisEthanol (diethylenglycol)
- 4.) 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-phenol
- 5.) Benzaldehyde
- 6.) Dodecamethylcyclohexasiloxane
- 7.) n-Hexadecane
- 8.) Methyl naphthalene
- 9.) 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methyl phenol
- 10.) 3,3,6,9,9-pentamethyl...oxide
- 11.) 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-2,5-cyclohexadien-1,4-dione

Zum Vergleich mit den nicht lungenkrebspezifischen Raumforderungen:

- Ethylen-N,N-dimethylcarbamate: in Lungenkrebs-Patienten und nicht lungenkrebspezifischen Raumforderungen nicht vorhanden, jedoch in gesunden Probanden signifikant erhöht
- Diethylenglycol: in Lungenkrebs-Patienten sowie in Patienten mit nicht lungenkrebspezifischen Raumforderungen signifikant erhöht

In der Gruppe „nicht lungenkrebspezifische Raumforderungen“ konnten folgende Substanzen nicht identifiziert werden:

- 1.) Ethylen-N,N-dimethylcarbamate
- 2.) 1,2,3-Trimethylbenzene
- 3.) n-Heptacosane
- 4.) n-Tetracosane
- 5.) Hexacosane
- 6.) Dodecamethylcyclohexasiloxane

3.8 SonyNose-G2_SN8

3.8.1 Sensor-Resistenzverhalten

Das Gerät SonyNose-G2_SN8 wurde in den Laboren der Firma Sony Deutschland GmbH untersucht. Die Sensorsignale werden als relative Widerstandsänderung ($\Delta R/R_{ini}$) gegen die Zeit aufgetragen. In untenstehender Abbildung (Abb. 21) ist das Sensorverhalten und somit der Widerstand der einzelnen Sensoren gegen die Zeit dargestellt.

Am 18.07.2012 wurden die Sensoren AuHEG und AuHDT durch neue Sensoren ersetzt. Der Sensor AuHEG wurde durch die Sensoren AuS2 (S1, S2) ersetzt, da AuHEG für die vorgenommenen Messungen nicht stabil genug war. Außerdem wurde der Sensor AuHDT erneuert, da diese Charge für die erforderlichen Messungen nicht empfindlich genug war.

Des Weiteren stieg der Widerstand des Sensors AuBHA im Laufe der Messungen rasant an und war deshalb ab dem 05.09.2012 nicht mehr messbar.

Aufgrund dieser Ergebnisse kann jedoch nicht davon ausgegangen werden, dass ein instabiler Widerstand gleichzusetzen ist mit einer instabilen Gasempfindlichkeit.

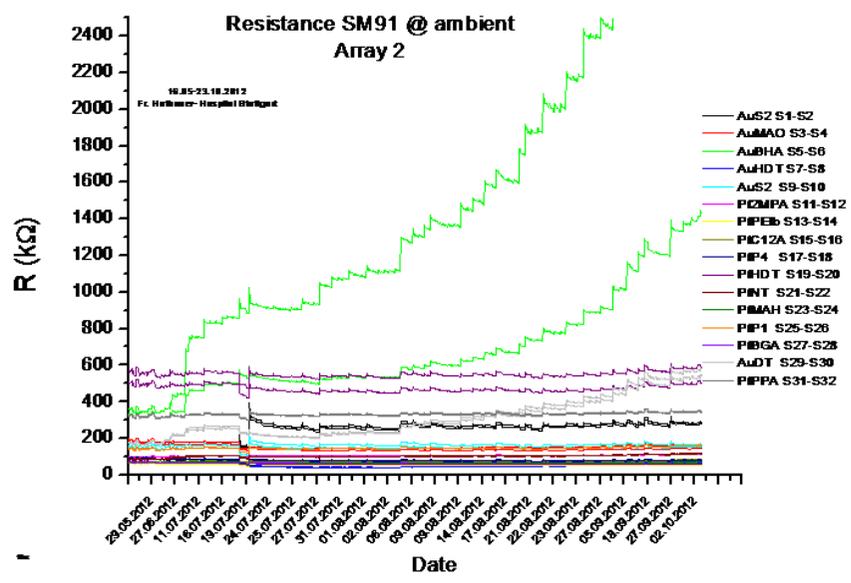
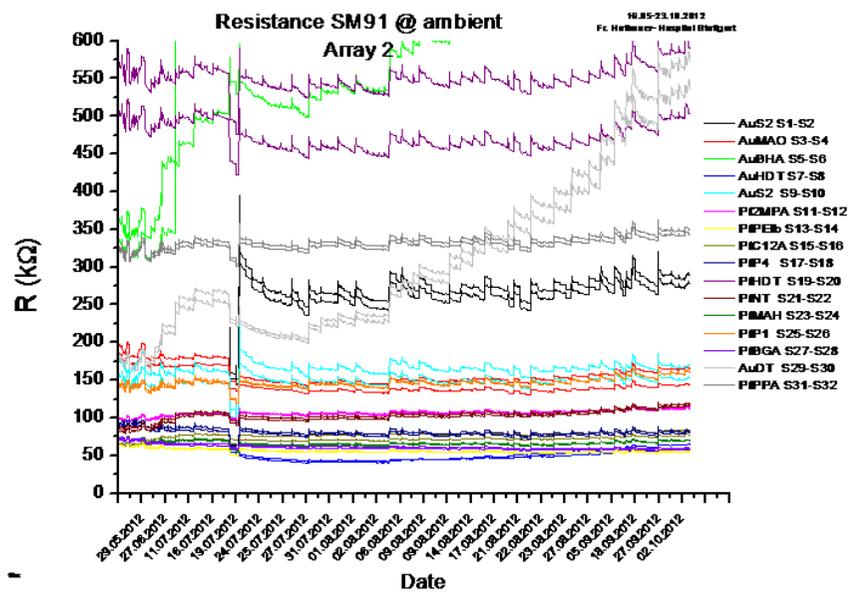


Abb. 21: Graphische Darstellung des Resistenzverhaltens der Sensoren.

Des Weiteren wurden die Sensoren auf ihre Empfindlichkeit gegenüber Atemluft getestet. In nachfolgender Abbildung ist ein Auszug der gesammelten und ausgewerteten Atemproben vom 30.05-04.10.2012 dargestellt.

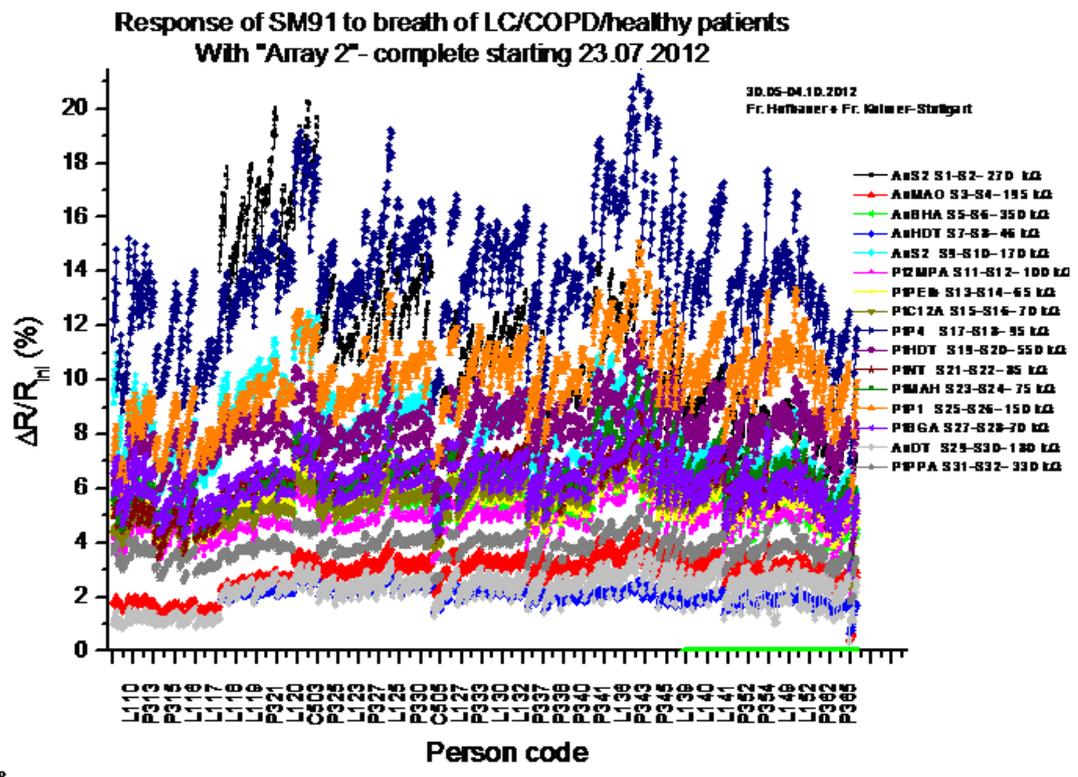


Abb. 22: Sensitivität der Sensoren in Bezug zur Atemprobe.

Es zeigt sich ein reproduzierbares Signal in Bezug auf Zeit zu Atemprobe. Erkennbar ist ferner eine Abnahme des Widerstandes des neuen AuS2-Sensors und der Anstieg des Widerstandes der Sensoren AuMAO und AuDT.

Tab. 12: Verhalten der Sensoren im Bezug zum Widerstand.

	Kriterien	Materialien
Starker Anstieg	$\Delta R/R_{ini} > +20\%$	AuDT>AuMAO>PtP1
Schwacher Anstieg	$+5\% < \Delta R/R_{ini} < +20\%$	AuBHA, Pt2MPA, PtC12A, PtHDT
Stabil	$-5\% < \Delta R/R_{ini} < +5\%$	PtBGA, PtMAH, PtNT, PtP4, PtPEIb, PtPPA
Schwache Abnahme	$-20\% < \Delta R/R_{ini} < -5\%$	AuHDT
Starke Abnahme	$\Delta R/R_{ini} < -20\%$	AuS2 „neu“>AuS2 „alt“

3.8.2 Untersuchungen zur Luftfeuchtigkeit und Temperatur

Um einen möglichen Einfluss von Temperatur und Luftfeuchtigkeit auf das Testergebnis zu untersuchen, wurden beide Parameter ebenfalls bei allen Proben erfasst. Die Durchschnittswerte, sowie minimale und maximale Temperatur- und Luftfeuchtigkeitsschwankungen sind in Tabelle 13 dargestellt.

Tab. 13: Temperatur und Luftfeuchtigkeit.

	Durchschnittswert	Minimum	Maximum
Umgebungstemperatur	25,51°C	22,7°C	29,4°C
Luftfeuchtigkeit	42,5%	31%	52%
E-Nose Temperatur	36,68°C	33,6°C	41,5°C

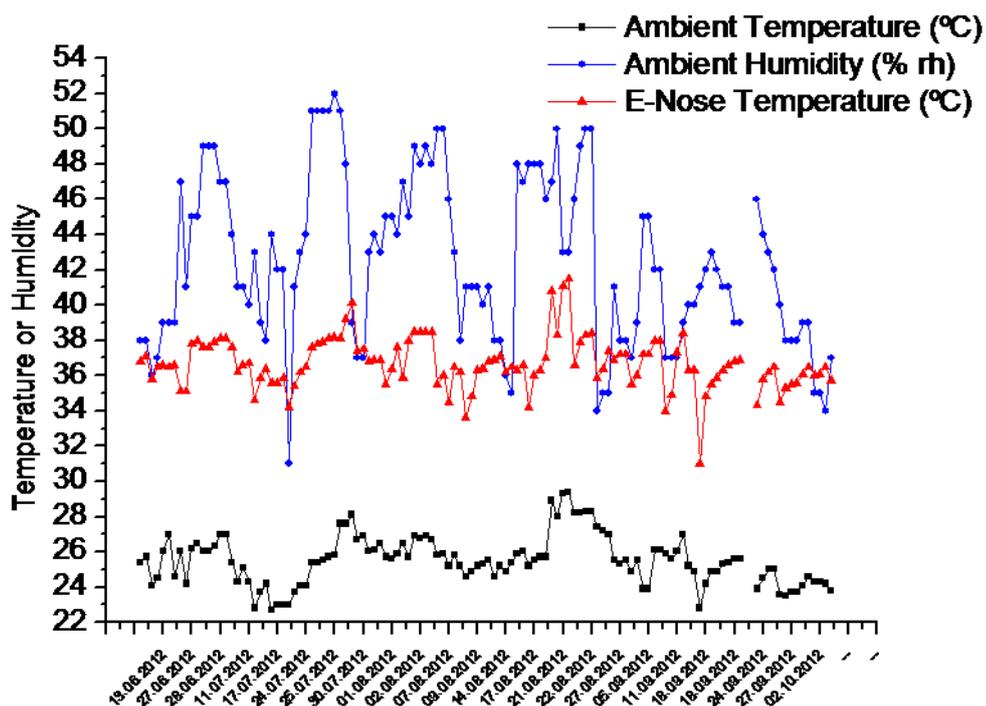


Abb. 23: Umgebungstemperatur, Luftfeuchtigkeit und Temperatur der E-Nose innerhalb des Untersuchungszeitraums.

Die Umgebungstemperatur schwankte im Untersuchungszeitraum zwischen minimaler und maximaler Temperatur um 6,7°C, die E-Nose Temperatur um 7,9°C. Die

Klimaschwankungen der SonyNose-G2_SN8 sind damit begrenzt. Abbildung 23 zeigt graphisch den Temperaturverlauf.

3.8.3 Patientenspezifische Analyse

Zur Analyse unserer Messergebnisse wurde von der Firma Sony die Hauptkomponentenanalyse mit 16 Komponenten gewählt. Dabei wurden die 16 bedeutsamsten Sensoren aus den 32 Vorhandenen ausgewählt. Die Hauptkomponentenanalyse (englisch Principal Component Analysis (PCA)) ist ein Verfahren der multivariaten Statistik. Sie dient dazu, umfangreiche Datensätze zu strukturieren, zu vereinfachen und zu veranschaulichen. Dies geschieht, indem eine Vielzahl statistischer Variablen durch eine geringe Zahl möglichst aussagekräftiger Linearkombinationen genähert wird.⁶

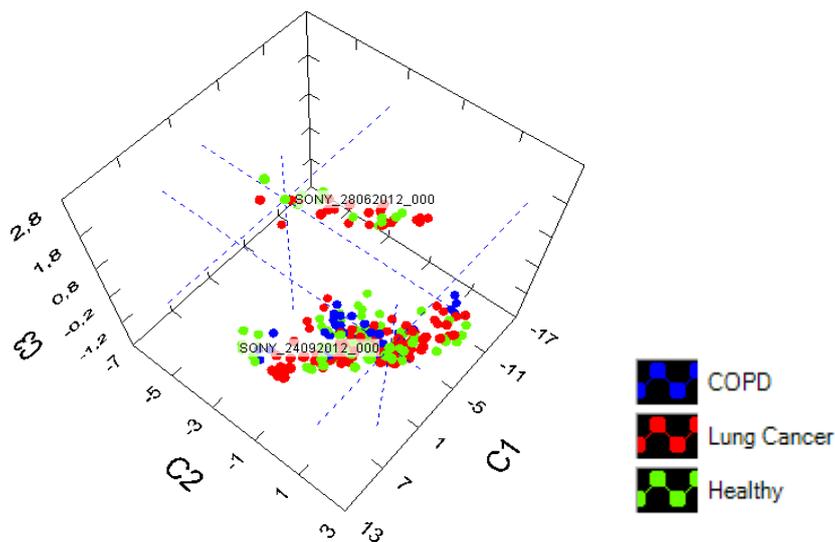


Abb. 24: Hauptkomponentenanalyse für die 3 Untersuchungsgruppen.

In einer ersten Analyse wurde die Trennschärfe unserer Messmethode nach Untersuchungsgruppen ausgewertet.

Wie man in Abb. 24 erkennen kann, gibt es eine klare Trennung der Atemproben vor und nach dem 18.07.2012 jedoch keine eindeutige Trennung der Untersuchungsgruppen. Die Trennung vor und nach dem 18.07.2012 ist auf den bereits in 3.8.1 beschriebenen Austausch der Sensoren AuHEG und AuHDT zurückzuführen.

⁶ <http://de.wikipedia.org/wiki/Hauptkomponentenanalyse>

Aufgrund der hier identifizierten unterschiedlichen Verhaltensweisen der verwendeten Sensoren vor und nach dem 18.07.2012, wurden für die weitere Analyse nur diejenigen Atemproben verwendet, die nach dem 18.07.2012 gesammelt und ausgewertet wurden.

Die graphische Darstellung der Gruppenzugehörigkeit und des Rauchverhaltens der Patienten ist in Abbildung 25A dargestellt. In der Analyse zur Gruppenzugehörigkeit der Probanden zeigt sich eine zufällige Anordnung zu den Gruppen „Gesund“, „Lungenkrebs“ und „COPD“. Es konnte mit der durchgeführten Analytik kein Zusammenhang zum wirklichen Gesundheitszustand des Probanden hergestellt werden. Auch andere Sensor-Kombinationen lieferten in der Hauptkomponentenanalyse keine aussagekräftigeren Ergebnisse (Ergebnisse hier nicht gezeigt).

Auch war mit der durchgeführten Sensoranalyse keine Unterscheidung von Rauchern und Nichtrauchern möglich (Abb. 25B).

Mittels der SonyNose-G2_SN8 wurden keine Unterschiede bezüglich Probandengeschlecht und –Altersgruppe detektiert. Da mit dem verwendeten Analyseverfahren nach krankheitsspezifischen Veränderungen gesucht werden sollte, wäre ein detektierter Unterschied hier auch als falsch-positiv zu werten gewesen.

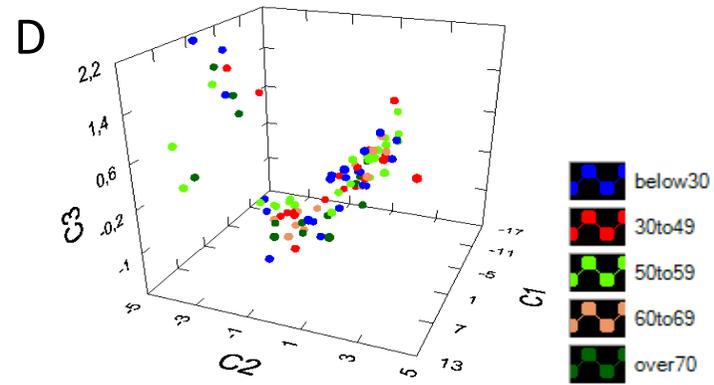
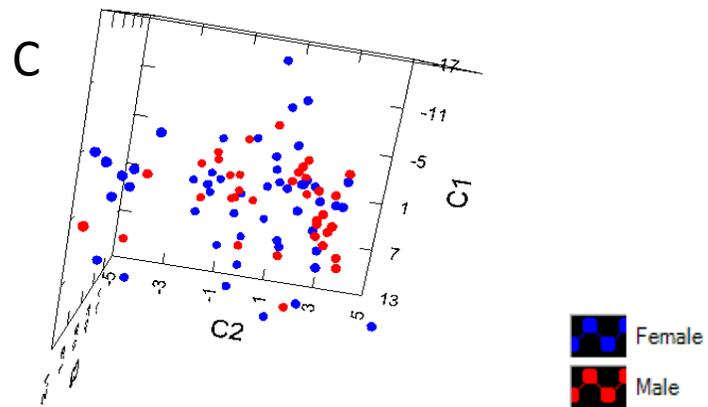
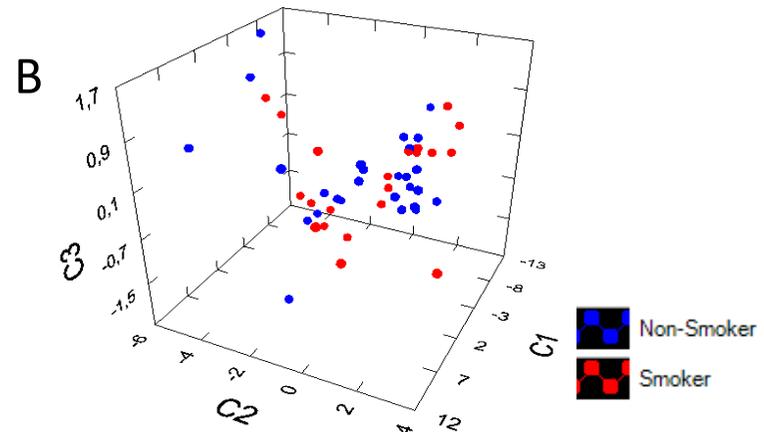
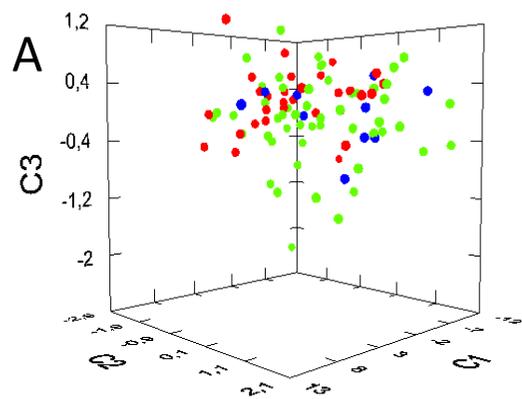


Abb. 25: Hauptkomponentenanalyse bezüglich A) Gruppenzugehörigkeit, B) Raucherstatus, C) Geschlecht und D) Altersgruppe.

3.8.4 Kontrolle der Reproduzierbarkeit der Messungen

Bei dem getesteten Messverfahren wird eine komplexe biologische Probe (=Atemprobe) mittels 32 Sensoren analysiert und mittels eines komplexen mathematischen Algorithmus (=Hauptkomponentenanalyse) ausgewertet. Um als diagnostisches Messverfahren verwendbar zu sein, sollten wiederholte Messungen der gleichen Atemprobe bzw. wiederholte Messungen von Atemproben derselben Probanden zu übereinstimmenden Ergebnissen führen. Deshalb haben wir mehrere Messungen innerhalb einzelner Probanden durchgeführt: In Abb. 26 sind Messungen innerhalb von 14 Personen in der 31. Kalenderwoche (30.07-02.08.2012) dargestellt. Es wurden jeweils 2 Gasmäuse pro Proband jeweils zweimal gemessen und ausgewertet. Abb. 27 zeigt Atemproben von 6 Probanden, die unabhängig von deren Gesundheitszustand gemessen und miteinander verglichen wurden.

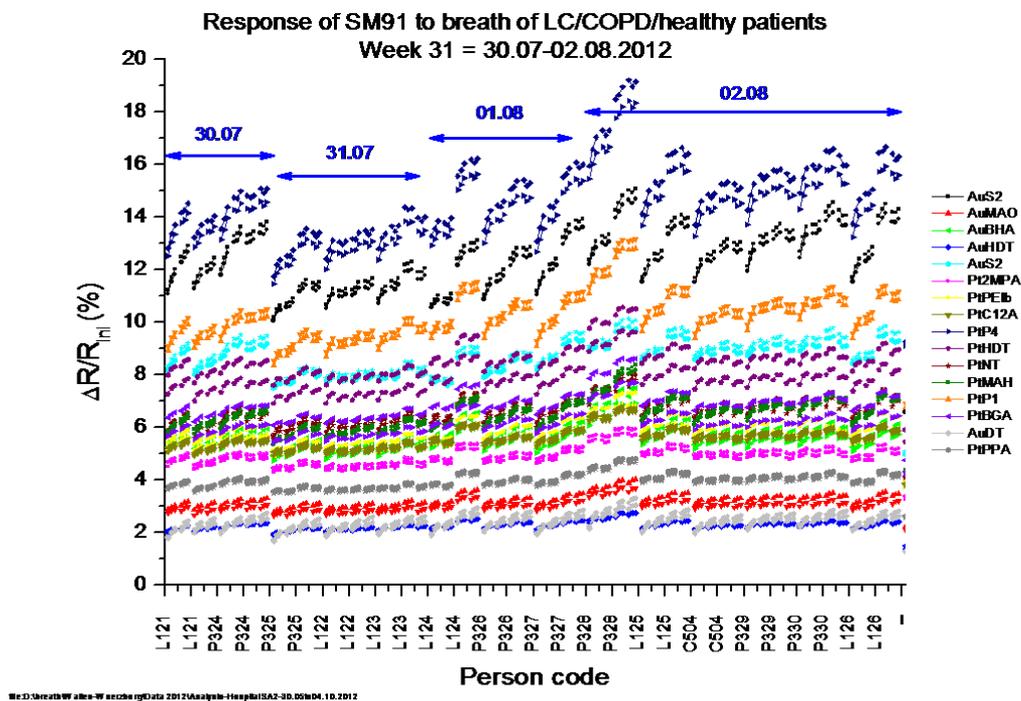


Abb. 26: Reproduzierbarkeit.

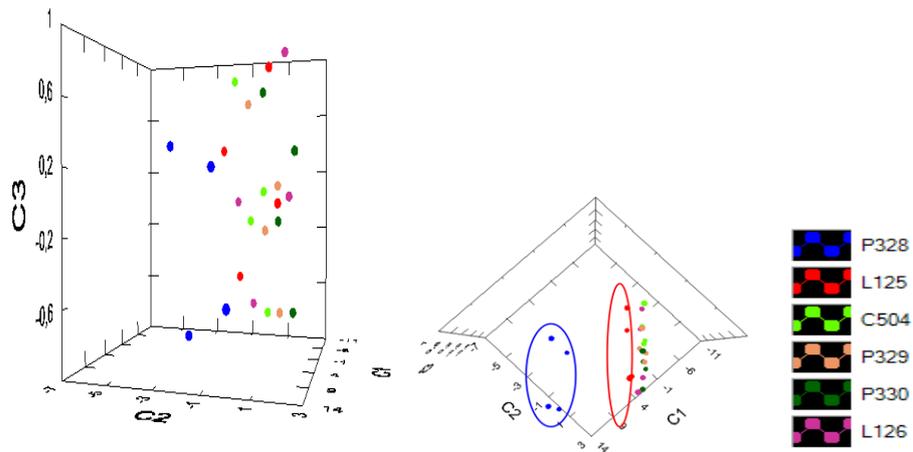


Abb. 27: Reproduzierbarkeit des verwendeten Messverfahrens.

Es wurden 31 Sensoren mit jeweils 4 Messungen bei 6 Probanden bewertet. Innerhalb desselben Probanden finden sich Unterschiede in den Messungen.

4 Diskussion

4.1 Lungenkrebs als diagnostische Herausforderung

Lungenkrebs ist die dritthäufigste Krebsart, jedoch die häufigste Krebstodesursache in Deutschland. Unbehandelt führt er, unabhängig vom Tumorstadium, im Durchschnitt innerhalb von 10 Monaten zum Tod des Patienten [38]. Die Prognose und somit die Überlebenschancen des Patienten ist vor allem abhängig vom Tumorstadium bei der Krebsdiagnose. Die besten Heilungschancen haben dabei Patienten, bei denen die Erkrankung sehr früh entdeckt wird und die aufgrund eines limitierten Tumorstadiums operiert werden können. Dies setzt jedoch eine frühzeitige Identifizierung der meist asymptomatischen Patienten voraus. Wenn der Krebs in einem frühen Stadium diagnostiziert wird, steigt die 5-Jahres-Überlebensrate auf 60-80% [39]. Derzeit kommen bei der Untersuchung von Patienten mit einem Verdacht auf Lungenkrebs in der Regel mehrere unterschiedliche bildgebende Untersuchungsverfahren zum Einsatz. Da sich die Untersuchungen zum Staging mitunter als sehr belastend für den Patienten erweisen, wird schon seit mehreren Jahren an neuen, wenig belastenden Untersuchungsmethoden geforscht. In dem 2011 publizierten National Lung Screening Trial konnte in einem Kollektiv von 53.454 Patienten mit hohem Risiko für ein Lungenkarzinom gezeigt werden, dass regelmäßige CT-Vorsorgeuntersuchungen dabei helfen können, Lungenkrebs frühzeitig zu entdecken [40]. Allerdings hatten 96,4% der als krebsverdächtig aufgefallen Patienten letztendlich doch keinen Lungenkrebs und im statistischen Schnitt mussten 900 CT-Aufnahmen durchgeführt werden, um einen Lungenkrebs zu sichern. Dies bedeutet, dass weiterhin kein praktikables Screening-Verfahren für die Diagnose eines Lungenkrebses zur Verfügung steht.

Die Atemluftanalyse von Patienten stellt ein für die Forschung interessantes neues Thema dar. Neben den bekannten Bestandteilen der ausgeatmeten Luft, wie zum Beispiel Stickstoff, Sauerstoff, Kohlendioxid, inerte Gase und Wasserdampf, besteht diese aus zahlreichen flüchtigen und nichtflüchtigen Komponenten [7].

Pauling et al. beschrieb 1971 als erster die volatilen organischen Verbindungen in der menschlichen Ausatemluft [41]. Seitdem konnten mehr als 3000 verschiedene

Substanzen in der ausgeatmeten Luft des Menschen nachgewiesen werden, die meisten in Konzentrationen im picomolaren Bereich [25].

Ausgeatmete organische Bestandteile in der Atemluft können zwei Ursprünge haben: Entweder es sind exogene flüchtige Stoffe, die eingeatmet wurden oder durch die Haut absorbiert wurden, um dann wieder ausgeatmet zu werden, oder es handelt sich um endogene Stoffe, die im Körper durch verschiedenste biochemische Prozesse hergestellt wurden [7]. Mit der VOC-Bildung können somit grundlegende zelluläre Funktionen einschließlich der Wahrung der Integrität der Zellmembran, der Energiestoffwechsel sowie oxidativer Stress in Verbindung gebracht werden [7]. Alkane werden dabei während der Lipidperoxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren erzeugt. Es wird diskutiert, ob die sogenannten Atem-Alkane als neuer Biomarker für oxidativen Stress stehen [42, 43]. Aldehyde, Ethan und Pentan werden ebenfalls im Lipidstoffwechsel produziert und können in der Atemluft des Menschen nachgewiesen werden [44]. Unabhängig davon, wo die Produktion der Stoffe im Körper abläuft, werden die VOC's mit dem Blut zur Lunge transportiert und über die Luft abgeatmet [7].

Die Arbeitsgruppe um Prof. Walles konnte in einer prospektiven randomisierten Studie erstmals nachweisen, dass in der Atemluft von Patienten mit Lungenkrebs krebsspezifische Substanzen vorhanden sein müssen, die diese Patienten von Gesunden unterscheidet [23]. Als „Nachweissystem“ dienten bei der Untersuchung speziell dafür abgerichtete Hunde. Vor dem Hintergrund der gemachten Erfahrung und der Tatsache, dass die Anzeige von Spürhunden in der klinischen Praxis zu inkonsistent und nicht standardisierbar ist, sollen technische Analyseverfahren weiter untersucht werden.

4.2 Evidenz für VOCs als lungenkrebspezifische Marker

Volatile organische Verbindungen (VOC's) können mittels GC-MS gemessen werden. Die Analyse der Atemluft kann dabei in der Gasphase oder als ausgeatmetes Kondensat in der flüssigen Phase durchgeführt werden. Somit konnte zum Beispiel durch die Chemolumineszenz-Analyse festgestellt werden, dass ausgeatmetes Stickstoffmonoxid bei Asthma-Patienten erhöht ist, dieses sich aber bei einer

Glukokortikoid-Behandlung wieder verringert [13, 27]. Patienten mit COPD hatten im Vergleich zu einer gesunden Kontroll-Gruppe in der einen Studie einen erniedrigten Gehalt an Stickstoffmonoxid, während eine andere Studiengruppe rund um J. Liu einen erhöhten Stickstoffmonoxid-Gehalt in COPD-Patienten nachwies [13, 46, 47]. Auch bei Lungenkrebs-Patienten wurde über erhöhte Stickstoffmonoxid-Werte berichtet [13, 48] Durch die Gaschromatographie-Massenspektrometrie-Analysen (GC-MS) konnten volatile organische Verbindungen wie Ethan und Pentan gefunden werden, die in der ausgeatmeten Luft von Asthma- und COPD-Patienten erhöht waren [49]. So konnte in vorausgegangenen Untersuchungen bereits gezeigt werden, dass Patienten mit Lungenkrebs unabhängig vom Tumorstadium von gesunden Probanden unterschieden werden können [26, 30, 45]. Phillips et al. konnten bereits im Jahr 2003 nachweisen, dass Lungenkrebs-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden abnorme Atemtest-Ergebnisse aufwiesen, die mit dem beschleunigten Abbau von Alkanen und monomethylierten Alkanen in Verbindung gebracht werden. Dabei konnten die Autoren 9 verschiedene Substanzen mit einer hohen Sensitivität und Spezifität dem Lungenkrebs zuordnen (siehe Tab. 4) [26]. Poli et al. konnten 2 Jahre später mit einer Kombination aus 13 verschiedenen Substanzen Lungenkrebs-Patienten identifizieren [30]. In ihrer ersten Untersuchung differenzierten Phillips et al. bei Patienten mit einer anormalen Röntgenaufnahme des Thorax zwischen denen mit und denen ohne Lungenkrebs mit Hilfe einer Kombination aus 22 verschiedenen VOCs, bestehend überwiegend aus Alkanen, Derivate der Alkane und Benzenderivate [45]. Diese Untersuchung war dabei unabhängig vom Tumorstadium. Die Sensitivität lag bei 100%, die Spezifität bei 81,3%.

Weitere Autoren, unter anderem Machado im Jahr 2005 [29], Barker im Jahr 2006 [31], Dragoniere und Chen im Jahr 2007 [32,33], Peng und Fuchs im Jahr 2010 [34, 35] sowie Wang 2012 [36], folgten (siehe Tab. 4). Somit wurden durch unterschiedlichste Arbeitsgruppen und verschiedenste Analyse-Verfahren bereits volatile organische Substanzen in der Atemluft von Probanden detektiert und mit dem Lungenkrebs in Verbindung gebracht. Die Analyse von Atemproben ist somit ein vielversprechender Ansatz um entzündliche und tumoröse Atemwegs-Erkrankungen zu untersuchen [50].

4.3 Ergebnisse dieser Studie im Kontext zu bereits veröffentlichten Studien

In der hier vorliegenden Studie konnten 20 volatile organische Verbindungen nachgewiesen werden, die in der Atemluft von Lungenkrebs-Patienten in deutlich abweichenden Konzentrationen vorkommen. Einige dieser Substanzen konnten bereits von vorangegangenen Arbeitsgruppen in der Atemluft von Patienten mit einem Lungenkarzinom nachgewiesen werden (siehe auch Tab. 4). So brachten Poli et al [30] im Jahre 2005 Trimethylbenzene mit Lungenkrebs in Verbindung, sowie Chen [33] im Jahre 2007 1,2,4-trimethylbenzene. In vorliegender Studie wurden ebenfalls zwei Trimethylbenzene identifiziert, nämlich 1,2,3-Trimethylbenzen sowie 1,2,4-Trimethylbenzen. Des Weiteren konnte Chen Styrene signifikant in seiner Arbeit nachweisen. Diese Substanz haben wir ebenfalls detektiert. Methylnaphthalin wurde 2012 von Wang et al [36] als signifikante volatile organische Verbindung in der Atemluft von Lungenkrebs-Patienten protokolliert. Diese Substanz konnten auch wir in unseren Untersuchungen nachweisen.

Tab. 14: Lungenkrebspezifische Substanzen in Übereinstimmung mit vorausgegangenen Studien.

Autor	Substanz
Poli 2005 [30]	Trimethylbenzene
Chen 2007 [33]	1,2,4-trimethylbenzene Styrene
Wang 2012 [36]	Methylnaphthalin

Außerdem konnten wir in unserer Studie weitere 16 Verbindungen mit einem deutlichen Unterschied zwischen den Gruppen „Gesund“ und „Krebs“ nachweisen. Diese Substanzen wurden vor unseren Untersuchungen noch nicht als lungenkrebspezifische Marker beschrieben.

1. Ethylen-N,N-dimethylcarbamate
2. Pivalinsäure
3. Diethylenglycol
4. 2,2-OxybisEthanol (diethylenglycol)

5. 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-phenol
6. Benzaldehyde
7. Benzoic acid
8. Diethylenglycolmonobutylether BDG
9. n-Hexadecane
10. 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-2,5-cyclohexadien-1,4-dione
11. 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methyl phenol
12. n-Heptacosane
13. n-Tetracosane
14. Hexacosane
15. 3,3,6,9,9-pentamethyl...oxide
16. Dodecamethylcyclohexasiloxane

Zu klären ist, ob es sich bei den von uns identifizierten Substanzen wirklich um krebsspezifische Substanzen handelt oder um krankheitsunabhängige Metabolite, wie zum Beispiel von Medikamenten. Auch Auswirkungen des Rauchverhaltens auf die Ergebnisse müssten ausgeschlossen werden.

Die Mehrzahl der Studienteilnehmer mit einer Lungenkrebserkrankung war in einem fortgeschrittenem Stadium des Tumorwachstums. Sollten die von uns identifizierten Verbindungen tatsächlich spezifisch für die Lungenkrebserkrankung sein, so müsste geklärt werden, ob diese auch in frühen Tumorstadien zu finden sind und sie somit überhaupt für ein Tumor-Screening geeignet sind.

Da in dieser Studie nur die Atemproben von Lungenkrebs-Patienten verwendet wurden, kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob die identifizierten Substanzen typisch für einen Tumor in der Lunge sind. Es könnte sich auch um Stoffe handeln, die generell jeder Tumor produziert. Dies kann nur durch weitere Untersuchungen überprüft werden.

Ebenso kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob diese volatilen organischen Verbindungen vom Tumor selbst herrühren oder ob es sich um Stoffe handelt, die durch das umliegende entzündliche Gewebe produziert werden.

4.4 Elektronische Nasen

Ähnlich dem olfaktorischen System des Menschen generiert eine elektronische Nase einen Duft-Abdruck, der mit zuvor gespeicherten Duft-Abdrücken verglichen werden kann. Jedoch sind die Geruchsstoffe, die für eine Krebserkrankung sprechen, noch nicht bekannt. Außerdem ist noch nicht bekannt, ob es sich bei dem Geruchsträger um nur einen einzigen Stoff oder um eine Zusammensetzung von mehreren Stoffen handelt. Der Einsatz einer elektronischen Nase zur Frühdiagnostik von Lungentumoren bietet theoretisch einige Vorteile: Die Stärken liegen dabei in der hohen Empfindlichkeit solcher Geräte, sowie die einfache Handhabung der Tests. Außerdem ist der Detektor leicht zu transportieren. Es können aber auch einige Nachteile aufgezeigt werden: Zu den Einschränkungen gehören sowohl der Verlust der Empfindlichkeit in Gegenwart von Wasserdampf oder anderer Komponenten mit hohen Konzentrationen, als auch die mitunter relativ kurze Lebensdauer der Sensoren. Außerdem können keine quantitativen Daten durch diese Geräte erhalten werden und für jede spezifische Anwendung ist die Weiterentwicklung der Methoden notwendig [7].

In vorausgegangenen Studien wurden elektronische Nasen untersucht.

In einer Studie von Di Natale und Mitarbeitern wurde ein Quarz-Mikrobalance-Sensor System verwendet. Der Quarz-Sensor war dabei mit einem Metalloporphyrin beschichtet, um die VOC's zu binden. Der Autor berichtet über eine Sensitivität von 90% bei der er die Lungenkrebs-Gruppe von der Kontroll-Gruppe unterscheiden konnte [51].

Machado et al. testete eine weitere elektronische Nase bestehend aus 32 separaten Carbon-Polymer Sensoren. In der Kontroll-Gruppe befanden sich hierbei sowohl gesunde Nicht-Raucher wie auch Patienten mit diversen Lungenerkrankungen. Auch Machado et al. konnte Unterschiede zwischen der Lungenkrebs-Gruppe und der Kontroll-Gruppe feststellen [29].

Dragonieri et al. konnte außerdem Lungenkrebs-Patienten von solchen mit COPD unterscheiden [52].

Tab. 15: Literaturübersicht zur Detektion von Lungenkrebs mittels elektronischer Nasen.

Verfasser	Jahr	Technik	Referenz
Di Natale C.	2003	Quarz- Mikrobalance- Sensor mit Metalloporphyrin- Beschichtung	[51]
Machado R.	2005	32 separate Carbon-Polymer Sensoren	[29]
Mazzone P.	2007	Colorimetrisches Sensor-Array	[53]
Barash O.	2009	Sensoren auf der Basis von Goldnanopartikeln	[54]
Peng G.	2009	Sensoren auf der Basis von Goldnanopartikeln	[55]

Volatile organische Verbindungen zu messen und zu analysieren wurde bis jetzt noch nicht standardisiert und stellt deshalb den limitierenden Faktor für diese Untersuchungen dar. Jörres et al. testete im Jahr 2011 vier Geräte gleichen Typs mit drei typischen, unterschiedlichen Messaufbauten. Für jede Messung wurden jeweils dieselben drei Probanden verwendet. Jörres konnte in dieser Studie nachweisen, dass sich je nach Messaufbau die Ergebnisse unterscheiden [56].

Somit Bedarf es Weiterentwicklungen der elektronischen Nasen um ein für die Klinik zuverlässiges und praktikables Screening-Verfahren zu entwickeln.

4.5 Technische Limitationen bei unserer Studie

Grundsätzlich gilt: Je größer die Studienpopulation, umso repräsentativer ist auch eine Studie. In vorliegender Studie wurde deshalb versucht, durch eine möglichst hohe Probandenzahl aussagekräftige Ergebnisse zu erzielen. Leider mussten die Sony Forschungslabore des Stuttgart Technology Center während der Projektlaufzeit aufgrund von Konzern-Umstrukturierungsmaßnahmen die Arbeiten einstellen und führte so die vertraglich vereinbarten GC-MS-Messungen nicht zu Ende. Ein alternativer Kooperationspartner mit vergleichbaren technischen Kompetenzen stand für das Projekt nicht zur Verfügung. Deshalb wurden von den insgesamt 124 Atemproben lediglich 27 Proben mittels GC-MS-Messungen ausgewertet. Aufgrund der geringen Fallzahl der ausgewerteten Proben der Gruppe COPD (n=1) wurden diese von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Um dennoch einen Vergleich der Proben durchführen zu können, wurden die 6 Proben aus den 27, die nach histologischer Sicherung nicht an einem Lungenkrebs, sondern unter entzündlichen Erkrankungen der Lunge litten, unter der Gruppe „nicht lungenkrebspezifische Raumforderungen“ in die Bewertung miteinbezogen.

Insgesamt wurden 118 Atemproben mittels der SonyNose-G2_SN8 analysiert. Die Auswertung zeigte jedoch, dass einzelne während des Untersuchungszeitraums ausgetauschte Sensoren eine inkonsistente Anzeige lieferten. Deshalb wurden für die weitere Auswertung nur die analysierten Atemproben verwendet, die nach dem 18.07.2012 gemessen worden sind. Dies waren insgesamt 85 Atemproben.

4.6 Einsatz der SonyNose-G2_SN8 in der klinischen Praxis

In der vorliegenden Studie war es mit der SonyNose-G2_SN8 nicht möglich, Patienten mit Lungenkrebs von solchen mit COPD oder gesunden Probanden zu unterscheiden. Außerdem konnte keine Unterscheidung in Bezug auf Rauchverhalten, Geschlecht und Alter nachgewiesen werden. Des Weiteren wurden intraindividuelle Kontrollen durchgeführt, indem die Atemproben derselben Patienten wiederholt getestet wurden. Die Untersuchung der gleichen Atemprobe zeigte eine sehr hohe Variabilität der Sensorsignale sowie eine sehr geringe Reproduzierbarkeit der Messergebnisse.

Somit ist die neuentwickelte SonyNose in ihrer bestehenden Form nicht für die klinische Diagnostik geeignet.

Vor allem das Resistenzverhalten der einzelnen Sensoren war in dieser Studie nicht zufriedenstellend. Hierfür müssten Materialien untersucht und verwendet werden, die über einen längeren Zeitraum ihre Stabilität wahren. Die Hauptfehlerquelle der elektronischen Nase lag jedoch in der geringen Reproduzierbarkeit der Messergebnisse. Das Gerät müsste in der Lage sein, dieselbe Atemprobe eines Probanden zuverlässig und zum wiederholten Male zu analysieren und zu einem eindeutigen gleichen Ergebnis zu gelangen. Dies kann nur durch die technische Weiterentwicklung des Gerätes erzielt werden.

Einflüsse durch das Wetter bzw. die Umgebungsbedingungen können auf Basis unserer Untersuchungen weitgehend ausgeschlossen werden, sind jedoch abschließend nicht zu quantifizieren. Obwohl die Bedingungen zur Probennahme einem standardisierten Protokoll folgten, könnte vielleicht durch weitere Einschränkungen dieser Bedingungen eine Verbesserung der Ergebnisse erzielt werden. Dadurch wäre eine Kontamination der Proben eventuell gänzlich zu vermeiden. Außerdem könnte das Patienten- bzw. Probandenkollektiv weiter in Bezug auf Rauchverhalten und Essgewohnheiten vor der Probennahme eingeschränkt werden. Somit würden intensive Gerüche, die zu einer Störung des Gerätes führen, ausgeschlossen werden. Auch das Sammeln einer größeren Menge der ausgeatmeten Luft jedes Probanden, könnte eine Verbesserung der Ergebnisse nach sich ziehen. Diese Überlegungen müssten jedoch in weiteren Untersuchungen überprüft und erfasst werden. Dennoch bleibt anzumerken, dass der Einsatz einer elektronischen Nase im klinischen Alltag nur sinnvoll erscheint, wenn das Gerät größeren Schwankungen der Umgebungsbedingungen ausgesetzt werden kann.

Die SonyNose-G2_SN8 ist eine elektronische Nase, die keine Einzelkomponenten sondern lediglich die Gesamtheit einer Probe messen kann. Da der Unterschied zwischen Patienten mit Lungenkrebs und gesunden Probanden gegebenenfalls nur an einer einzigen Komponente in der Atemluft festzustellen sein könnte, kann es sich dabei um eine Schwachstelle des Gerätes handeln. Um diese Hypothese zu bestätigen, müsste der Prototyp jedoch weiterentwickelt und in einer neuen Studie getestet werden.

4.7 Ausblick

Die Analyse von Atemproben stellt vor dem Hintergrund vorausgegangener Untersuchungen unserer und anderer Arbeitsgruppen einen vielversprechenden Ansatz als Screening-Verfahren zur Früherkennung von Lungenkrebs dar. Ein großer Vorteil dieses Verfahrens stellt die einfache Probengewinnung dar: Die Patienten geben ohne operativen Eingriff innerhalb von wenigen Minuten eine Atemprobe in ein dafür vorgesehenes Behältnis ab. Dieses Verfahren kann jederzeit wiederholt werden, selbst Menschen mit einem schlechten Allgemeinzustand oder auch Kinder können daran teilnehmen. Diese Methodik ist nicht invasiv und für den Patienten ohne Nebenwirkungen.

In der hier vorliegenden Studie konnten wir 16 neue Substanzen in der Atemluft von Lungenkrebs-Patienten identifizieren, die eventuell mit der Krebserkrankung in Verbindung stehen. Die Identifikation von volatilen organischen Verbindungen, die genau für ein Erkrankungsmuster sprechen, wäre ein großer Fortschritt für die Medizin.

Der Ansatz durch elektronische Geräte Substanzen oder Verbindungen in der Atemluft von Patienten zu identifizieren, sollte deshalb weiter erforscht werden. Bei diesen Untersuchungen muss das Patienten- sowie Probandenkollektiv jedoch eingegrenzt und umfassend charakterisiert werden. Insbesondere sollte eine Abgrenzung zu Stoffen, die durch inhalatives Zigarettenrauchen in der Atemluft von Probanden vorhanden sind, vorgenommen und Medikamentenmetabolite in der Atemluft müssen ausgeschlossen werden.

Des Weiteren sollte auch bei den gaschromatographischen-massenspektrometrischen-Analyseverfahren die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse untersucht und überprüft werden, um ein für den klinischen Einsatz praktikables Gerät entwickeln zu können.

5 Zusammenfassung

Lungenkrebs ist die führende Todesursache unter den Krebstodesfällen. Vor allem in späten Stadien diagnostizierter Lungenkrebs ist schwer zu behandeln und mit einer schlechten Prognose vergesellschaftet. Daher ist es wünschenswert, die Tumorerkrankung möglichst früh zu diagnostizieren und idealerweise in einem Screening-Test finden zu können. In der hier vorliegenden Studie wollten wir die Frage klären, ob ein von der Firma Sony neu entwickeltes Messverfahren SonyNose-G2_SN8 für die Untersuchung von Atemluft und für die Diagnose von Lungentumoren geeignet ist.

Für die Studie wurden Atemproben von insgesamt 124 Probanden gesammelt, davon 65 gesunde Studienteilnehmer, 43 Patienten mit histologisch gesichertem Lungenkrebs, 10 Patienten mit COPD und 6 Studienteilnehmern mit nicht lungenkrebspezifischen Raumforderungen. Die Atemproben wurden innerhalb von 20 Minuten nach Probennahme analysiert. Als Referenz zur getesteten Atemprobe wurde ein Luftgemisch aus gereinigter Luft mit 50%-iger Luftfeuchtigkeit verwendet. Technisch handelt es sich bei der Auswertung um eine gaschromatographische Prüfmethode.

Außerdem wurden zusätzliche Atemproben von den Patienten bzw. Probanden gesammelt, um diese mittels GC-MS-Messungen auf ihre volatilen organischen Bestandteile hin zu überprüfen. In den GC-MS-Untersuchungen der Atemproben konnten 263 verschiedene chemische Verbindungen identifiziert werden. Davon konnten 20 Substanzen ermittelt werden, die sich signifikant zwischen der Gruppe „Gesund“ und der Gruppe „Lungenkrebs“ unterschieden. Diese Substanzen könnten sich folglich als Marker für den Lungenkrebs eignen. Weitere Untersuchungen sind zur Überprüfung dieser Hypothese jedoch erforderlich.

Nicht zuletzt aufgrund von Problemen mit der Stabilität einzelner Sensoren, war es mit der SonyNose-G2_SN8 nicht möglich, zwischen Lungenkrebs-Patienten, Patienten mit COPD und gesunden Probanden zu unterscheiden. Das getestete Gerät eignet sich also nicht für das Lungenkrebs-Screening im klinischen Einsatz. Auch nach der hier

vorliegenden Untersuchung bleibt offen, ob Analyseverfahren zur Atemluftdiagnostik als Screening-Methode zur Früherkennung von Lungenkrebs grundsätzlich geeignet sind. Der Einsatz der gaschromatographischen-massenspektrometrischen Untersuchungsmethode ist für die Routinediagnostik derzeit noch zu zeitaufwendig und zu teuer. Die Identifikation möglicher krebsspezifischer volatiler organischer Verbindungen in der Atemluft von Patienten bleibt für die Forschung weiterhin eine offene und vielversprechende Thematik.

6 Literaturverzeichnis

- 1 Robert Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland GEKID, Hrsg .Krebs in Deutschland 2009/2010. 9. Ausgabe Berlin: Robert-Koch-Institut,2013.
- 2 Interdisziplinäre S3-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin und der Deutschen Krebsgesellschaft: Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms. 2010; Pneumologie 64: Supplement 2: 1-164.
- 3 Gesundheitsberichterstattung des Bundes. In: Gesundheit in Deutschland. 2006; Online im Internet:URL: https://www.gbe-bund.de/gbe10/owards.prc_show_pdf?p_id=9965&p_sprache=d&p_uid=gast&p_aid=93156261&p_lfd_nr=1. (letzter Zugriff: 11.09.2014)
- 4 Statistisches Bundesamt Deutschland. Lungenkrebs ist die vierthäufigste Todesursache. Wiesbaden:2007.Online im Internet: URL: <http://www.presseportal.de/pm/32102/991739/lungenkrebs-ist-die-vierthaeufigste-todesursache.Stand: 18.11.2007>. (Letzter Zugriff: 11.09.2014)
- 5 Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. PloS Med 2006; 3: 442.
- 6 Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ. Cancer statistics, 2008. Cancer J Clin 2008; 58: 71-96.
- 7 Horváth I, Lazar Z, Gyulai N, Kollai M, Losonczy G. Exhaled biomarkers in lung cancer. Eur Respir J. 2009; 34: 261-275.
- 8 Huber RM, Tumorzentrum München. Tumoren der Lunge und des Mediastinums, Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. 9. Auflage 2011;1-31.
- 9 Mountain C. Revisions in the international system for staging lung cancer. Chest 1997;111:1710-1717.
- 10 Hammerschmidt S, Wirtz H. Lung cancer: Current diagnosis and Treatment. Dtsch Ärztebl Int 2009; 106: 809-820.

- 11 Simonato L, Agudo A, Ahrens W et al. Lung cancer and cigarette smoking in Europe: an update of risk estimates and an assessment of inter-country heterogeneity. *Int J Cancer* 2001; 91: 876–887.
- 12 Seifart C. Lungenkrebs: Oft spät erkannt und kaum behandelbar. *Pharmazeutische Zeitung online*. 2006; 30. Online im Internet: URL: <http://www.pharmazeutische-zeitung.de/index.php?id=1589>. (Letzter Zugriff: 11.09.2014)
- 13 Chan HP, Lewis C, Thomas PS, Lung Cancer, Exhaled breath analysis: Novel approach for early detection of lung cancer. *Lung Cancer* 2009; 63: 164-168.
- 14 Goldstraw P. IASLC Staging Manual in Thoracic Oncology, International Association for the Study of Lung Cancer. Editorial Rx 2009, ISBN 978-0-9799274-4-7.
- 15 Henschke CI, Yankelevitz DF, Libby DM, Pasmantier MW, Smith JP, Miettinen OS. Survival of patients with stage I lung cancer detected on CT screening. International Early Lung Cancer Action Program Investigators. *New Engl J Med*. 2006; 355: 1763-1771.
- 16 Billé A, Pelosi E, Skanjeti A, Arena V, Errico L, Borasio P, Mancini M, Ardisson F. Preoperative intrathoracic lymph node staging in patients with non-small-cell lung cancer: accuracy of integrated positron emission tomography and computed tomography. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2009; 36: 440-445.
- 17 Kubota K. From tumor biology to clinical Pet: a review of positron emission tomography (PET) in oncology. *Ann Nucl Med*. 2001; 15: 471-486.
- 18 Al-Sarraf N, Gately K, Lucey J, Wilson L, Mc Govern E, Young V. Lymph node staging by means of positron emissions tomography is less accurate in non-small-cell lung cancer patients with enlarged lymph nodes: Analysis of 1145 lymph nodes. *Lung Cancer* 2008; 60: 62-8.
- 19 Sarraf N, Gately K, Lucey J, Wilson L, Mc Govern E, Young V. Mediastinal lymph node staging by means of positron emissions tomography is less sensitive in elderly patients with non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Canc*. 2008; 9: 39-43.
- 20 Church J, Williams H. Another sniffer dog for the clinic? *Lancet* 2001; 358: 930.
- 21 McCulloch M, Jezierski T, Broffman M, Hubbard A, Turner K, Janecki T. Diagnostic accuracy of canine scent detection in early- and late-stage lung and breast cancers. *Interact Canc Ther*. 2006; 5: 30-9.

- 22 Boedeker E, Friedel G, Walles T. Sniffer dogs as part of a bimodal bionic research approach to develop a lung cancer screening. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2012; 14: 511-5.
- 23 Ehmann R, Boedeker E, Friedrich U, Sagert J, Dippon J, Friedel G, Walles T. Canine scent detection in the diagnosis of lung cancer: Revisiting a puzzling phenomenon. *Eur Respir J*. 2012; 39: 669-76.
- 24 Dweik RA, Amann A. Exhaled breath analysis: the new frontier in medical testing [editorial]. *J Breath Res*. 2008; 2: 1-3. Doi: 10.1088/1752-7155/2/3/030301.
- 25 Phillips M, Herrera J, Krishnan S, Zain M, Greenberg J, Cataneo RN. Variation in volatile organic compounds in the breath of normal humans. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 1999; 729: 75-88.
- 26 Phillips M, Cataneo RN, Cummin AR, et al. Detection of lung cancer with volatile markers in the breath. *Chest* 2003; 123 (6): 2115-23.
- 27 Kharitonov SA, Yates D, Robbins RA, Logan-Sinclair R, Shinebourne EA, Barnes PJ. Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Lancet* 1994; 343: 25-39.
- 28 Dent AG, Sutedja TG, Zimmerman PV. Exhaled breath analysis for lung cancer. *J Thorac Dis* 2013; 5: 540-550.
- 29 Machado RF, Laskowski D, Deffenderfer O, et al. Detection of lung cancer by sensor array analyses of exhaled breath. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171: 1286-1291.
- 30 Poli D, Carbognani P, Corradi M, et al. Exhaled volatile organic compounds in patients with non-small cell lung cancer: cross sectional and nested short term follow-up study. *Respir Res* 2005; 6: 71.
- 31 Barker M, Hengst M, Schmid J, et al. Volatile organic compounds in the exhaled breath of young patients with cystic fibrosis. *Eur Respir J* 2006; 27: 929-36.
- 32 Dragonieri S, Schot R, Mertens BJ, et al. An electronic nose in the discrimination of patients with asthma and controls. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120: 856-62.
- 33 Chen X, Xu F, Wang Y, et al. A study of the volatile organic compounds exhaled by lung cancer cells in vitro for breath diagnosis. *Cancer* 2007; 110: 835-44.
- 34 Peng G, Hakim M, Broza YY, et al. Detection of lung, breast, colorectal and prostate cancers from exhaled breath using a single array of nanosensors. *Br J Cancer* 2010; 103: 542-51.

- 35 Fuchs P, Loeseken C, Schubert JK, et al. Breath gas aldehydes as biomarkers of lung cancer. *Int J Cancer* 2010; 126: 2663-70.
- 36 Wang Y, Hu Y, Wang D, et al. The analysis of volatile organic compounds-biomarkers for lung cancer in exhaled breath; tissues and cell-lines. *Cancer Biomark* 2012; 11: 129-37.
- 37 Zeeck A, Grond S, Papastravrou I, Zeeck S.C. *Chemie für Mediziner*. 6. überarbeitete Auflage 2005.
- 38 Al-Detterbeck FC, Gibson CJ. Turning gray: The natural history of lung cancer over time. *J Thorac Oncol*. 2008; 3: 781-792.
- 39 Dominioni L, Imperatori A, Rovera F, Ochetti A, Torrigiotti G, Paolucci M. Stage I nonsmall cell lung carcinoma: analysis of survival and implications for screening. *Cancer* 2000; 89: 2334-44.
- 40 National Lung Screening Trial Research Team, Aberle DR, Adams AM, Berg CD, Black WC, Clapp JD, Fagerstrom RM, Gareen IF, Gatsonis C, Marcus PM, Sicks JD. Reduced lung-cancer mortality with low dose computed tomographic screening. *N Engl J Med*. 2011; 365: 395-409.
- 41 Pauling L, Robinson AB, Teranishi R, et al. Quantitative analysis of urine vapor and breath by gas-liquid partition chromatography. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971; 68: 2374-6.
- 42 Phillips M, Cataneo RN, Greenberg J, et al. Effect of oxygen on breath markers of oxidative stress. *Eur Respir J* 2003; 21: 48-51.
- 43 Mitsui T, Kondo T. Inadequacy of theoretical basis of breath methylated alkane contour for assessing oxidative stress. *Clin Chim Acta* 2003; 333: 93-94.
- 44 Pitkanen OM, Hallman M, Andersson SM. Determination of ethane and penthane in free oxygen radical-induced lipid peroxidation. *Lipids* 1989; 24: 157-159.
- 45 Phillips M, Gleeson K, Hughes JM, Greenberg J, Cataneo RN, Baker L, et al. Volatile organic compounds in breath as markers of lung cancer: a cross-sectional study. *Lancet* 1999; 353: 1930-3.
- 46 Clini E, Bianchi L, Pagani M, Ambrosino N. Endogenous nitric oxide in patients with stable COPD: correlates with severity of disease. *Thorax* 1998; 53: 881-3.

- 47 Liu J, Sandrini A, Thurston MC, Yates DH, Thomas PS. Nitric oxide and exhaled breath nitrite/nitrates in chronic obstructive pulmonary disease patients. *Respiration* 2007; 74: 617-23.
- 48 Liu CY, Wang CH, Chen TC, Lin HC, Yu CT, Kuo HP. Increased level of exhaled nitric oxide and up-regulation of inducible nitric oxide synthase in patients with primary lung cancer. *Br J Cancer* 1998; 78: 534-41.
- 49 Paredi P, Kharitonov SA, Barnes PJ. Analysis of expired air for oxidation products. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: 31-7.
- 50 Miekisch W, Schubert JK, Noeldge-Schomburg GF. Diagnostic potential of breath analysis-focus on volatile organic compounds. *Clin Chim Acta* 2004; 347: 25-39.
- 51 Di Natale C, Macagnano A, Martinelli E, et al. Lung cancer identification by the analysis of breath by means of an array of non-selective gas sensors. *Biosens Bioelectron* 2003; 18: 1209-1218.
- 52 Dragonieri S, Annema JT, Schot R, et al. An electronic nose in the discrimination of patients with non-small cell lung cancer and COPD. *Lung Cancer* 2009; 64: 166-170.
- 53 Mazzone P, Hammel J, Dweik R, Na J, Czich C, Laskowski D, et al. Diagnosis of lung cancer by the analysis of exhaled breath with a colorimetric sensor array. *Thorax* 2007; 62: 565–568.
- 54 Barash O, Peled N, Hirsch FR, Haick H. Sniffing the unique “odor print” of non-small-cell lung cancer with gold nanoparticles. *Small* 2009; 5:2618–2624.
- 55 Peng G, Tisch U, Adams O, Hakim M, Shehada N, Broza YY, et al. Diagnosing lung cancer in exhaled breath using gold nanoparticles. *Nat Nanotechnol* 2009; 4: 669–673.
- 56 Koczulla R, Hattesoehl A, Biller H, Hofbauer J, Hohlfeld J, Oeser C, Wirtz H, Jörres RA. Comparison of four identical electronic noses and three measurement set-ups. *Pneumologie* 2011; 65: 465-70.

Anhänge

I **Vorstudie: Atemgasanalyse bei einem Raucher und einem Patienten mit Lungenkrebs**

Um die Geräte für die GC-MS-Messung vor der Studie zu evaluieren, wurden unter Laborbedingungen einige Tests durchgeführt. Das Ziel dabei war zu ermitteln, ob mit dem von uns verwendeten Verfahren volatile organische Verbindungen in der Atemluft von Probanden nachgewiesen werden können und ob es Übereinstimmungen der identifizierten Substanzen zwischen einem Raucher und einem Lungenkrebs-Patienten gibt. Dabei stellte sich ein Mitarbeiter der Firma Sony als Proband zur Verfügung. Der Proband gab jeweils eine Atemspende bevor und nachdem er eine Zigarette geraucht hatte, in ein Probenröhrchen ab. Die Atemluft in diesen Röhrchen wurde analysiert und mit der Atemluft eines Patienten mit einer gesicherten Lungenkrebsdiagnose, der seit mehreren Jahren Nichtraucher war, verglichen. Es wurden nur diejenigen Substanzen als positiv in der Atemprobe vorhanden gewertet, die mit der Datenbank WILEY 6N-L eine Übereinstimmung von über 70% aufwiesen. Insgesamt konnten in der Atemprobe eines gesunden Probanden vor Zigaretten-Konsum 14 verschiedene Substanzen, nach Zigaretten-Konsum 46 verschiedene Substanzen und bei einem Lungenkrebs-Patienten 78 verschiedenen Substanzen identifiziert werden.

Wie in folgender Tabelle (Tab. 16) gezeigt, gibt es einige Übereinstimmungen zwischen den drei getesteten Probenröhrchen. Dabei lassen sich Übereinstimmungen der Substanzen zwischen einem gesunden Probanden nach Zigaretten-Konsum und einem ehemals rauchenden Lungenkrebs-Patienten feststellen.

Tab. 16: Vergleich Raucher/Lungenkrebspatient.

smoker before (healthy volunteer from MSL)			smoker after (healthy volunteer from MSL)			LC-patient			
S.	substance	ml	S.L.	substance	ml	S.L.	substance	ml	
							3,472	Decane	72
							4,13	N-methyl-Methanamine	90
				4,178	Methanamin	86			
							4,537	carbon-dioxide	34
							4,772	1-Propanol	87
5,647	Triglycerin	93	5,537	Triglycerin	93	5,540/762	Triglycerin	93	
							7,661	Propanolure	93
							7,882	1,2-Ethandiol (Glycol)	86
							9,393	Propylenglycol	83
							10,304	Acetamid	90
							10,954	Butanoic-acid	90
							11,068	N,N-dimethylformamide	91
11,086	Dimethylformamide	83	11,155	Dimethylformamide	83		11,734	Pivalinsäure	87
							12,849	N-ethyl-5,3-dimethylindoline	80
12,849	Decamethyltetraoxan	78							
				12,868	N-ethyl-5,3-dimethylindoline	83			
15,167	Dimethylacetamid	91	15,177	Acetamid	91		15,047	Dimethylacetamid	86
							15,309	Acetamid	83
							16,138	1-[3-cyclohexyl-1-yl]-ethanone	84
							18,748	Alpha-Finone	85
18,962	Diethylenglycol	83					19,097	N-Ethyl-N-Methyl-Butanamine	73
							19,927	Diethylenglycol	90
							20,058	Benzaldehyd	93
20,077	Benzaldehyd	96	20,077	Benzaldehyd	96				
				20,542	Ethylalcol	93			
				20,238	Benzene	76			
				20,511	1,2,3-Trimethylbenzol	91			
							20,897	Anilin	95
				20,973	Phenol	93			
				21,095	C3-Benzene	70			
				21,171	n-Methylstyrol	91			
				21,387	Tetramethylurea	91	21,378	Tetramethylurea	91
				21,695	Cyclohexanone	94	21,678	Cyclohexanone, acetamethyl	90
				21,736	1,3,5-Trimethylbenzol	94			
							21,877	n-Decane	83
22,92	1,3-dichlorbenzol	96	22,93	1,3-dichlorbenzol	96	22,92	1,4-dichlorbenzol	97	
				22,949	Benzol	87	22,937	2-Cyanol	90
							22,957	Benzoesäure	81
							22,959	3-Methyl-2-(1-methyl-2-phenyl-ethyl)-benzol	85
23,178	3-Ethyl-1-Hexanol	64	23,189	3-Ethyl-1-Hexanol	89				
23,357	4-Limonen	93	23,357	4-Limonen	98	23,348	4-Limonen	94	
						23,451	Benzylalkohol	92	
				23,790	20H-Furan	93	23,79	20H-Furanone	74
				24,543	2-Pyrrolidinone	83	24,542	2-Pyrrolidinone	83
						24,931	1-phenyl-ethanone	93	
				24,931	Methylphenylketon	93			
				26,359	Nonadecan	93	26,359	Nonadecan	90
27,403	N-Ethylamine	97	27,351	N-Ethylamine	97	27,051/27,351	N-Ethylamine	87/92	
				27,954	Cyclopentylloxane	83	27,984	Cyclopentylloxane	90
				28,248	Benzocyclohexan	90	28,251	Benzocyclohexan	97
						29,36	Diethylenglycolmonobutylether	86	
				29,37	2-(2-butoxyethoxy)ethanol	90			
29,483	2,5-Dimethylbenzaldehyd	76	29,483	2,5-Dimethylbenzaldehyd	97	29,483	2,5-Dimethylbenzaldehyd	95	
				29,709	1,3-Dimethyl-2-methoxyethyl-benzene	72			
				30,604	Thiourea	6	30,576	acetamethyl-Thiourea	93
							30,887	3-Fluorindole	72
32,253	1-Dodecan	99	31,57	Benzeneethanol	90	31,16	2,5-dimethyl-Benzeneethanol	93	
						32,269	n-Pentacosan	86	
						32,117	Pentadecane	71	
						32,687	Hexane	81	
				32,85	n-Tridecan	96	32,85	n-Tridecan	96
						32,912	Octane	72	
				33,46	Cyclohexadecanone	93	33,45	Cyclohexadecanone	81
						33,592/34,035	Octadecane	72	
						33,931	N-ethyl-N-phenyl-formamide	91	
						34,525	Acetamid	72	
				34,949	N,N-dimethyl-Benzamide	93	34,958	N,N-dimethyl-Benzamide	91
						35,269/36,866	1,2,4-Methoxybenzol	99/78	
						35,364	Pentadecane	83	
						35,684	Hexylfolsäure	95	
						35,19	cis-(1-2,4,5,6,9e-Hexahydro-3,3,5,5-tetramethyl-1H-benzocycloheptanone)	93	
						35,936	Strenophilsäure	89	
						36,07	Longfolsäure	89	
						36,641	2-Ethyl-1-dodecanol	74	
						36,792	1-Dodecanol	72	
						36,975	2,6-di-(1-butyl-4-hydroxy-4-methyl-2,5-cyclohexadien-1-one)	96	
						36,975	2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol	89	
						37,041	2,5-Cyclohexadione-1,4-dione	96	
						37,219	2,6-di-tert-butyl-4-methyl-2,5-cyclohexadien-1-one	96	
						37,434	Hexane	91	
						37,597	n-Nonadecan	80	
						37,71	n-Octadecan	96	
37,804	2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol	97	37,795	2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol	96	37,798	2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol BIT	96	
						37,908	Tricosane	76	
						38,087/41,122	Dodecane	87	
				38,21	Phenyl Maleic-Anhydride	87			
						38,428	3,8-Dimethyl-Decane	89	
				38,53	ethyl-2-(1,4-dimethyl-2-methylcyclopentanyloxy)acetate	72	38,53	ethyl-2-(1,4-dimethyl-2-methylcyclopentanyloxy)acetate	72
						38,756	n-Hexacosan	80	
						38,841	Nonadecane	86	
						38,964	Tricosane	76	
						40,426	(R-phenylmethyl)-Benzoesäure	90	
				41,131	Pentadecane	91			
				41,554	BIT-Aldehyd	93	41,545	BIT-Aldehyd	95
				42,394	3,3,6,9,9-Pentamethyl-2,10-dioxacyclo[4,4,0]-1-benzocyclohexan-2-one	90			
				46,548	2,5-Cyclohexadione-1,4-dione	93	46,529	2,5-Cyclohexadione-1,4-dione	70
						51,46	3-phenyl-5-(p-tolyl)-lambda-3-phosphorin	78	
51,46	1,3-Benzoxazin	96	51,461	(2H)-1,3-Benzoxazin	96				

In unserer Vorstudie konnten 17 Substanzen (in der Tabelle rot hinterlegt) gleichermaßen beim Lungenkrebs-Patienten wie bei einem gesunden Probanden nach Zigarettenkonsum festgestellt werden.

In allen drei Untersuchungen konnten 6 Substanzen (in der Tabelle gelb hinterlegt) identifiziert werden, die in allen drei Atemproben vorhanden waren.

Die Ergebnisse dieser Vorstudie lassen die Hypothese zu, dass auch nach langer Zeit der Nikotinkarenz im Körper noch Substanzen nachzuweisen sind, die auf das aktive Zigarettenrauchen zurückzuführen sind.

II Medikamenteneinnahme der Studienteilnehmer

Unter allen Studienteilnehmern wurden insgesamt 100 Wirkstoffe identifiziert, die von Patienten bzw. Probanden zum Untersuchungszeitpunkt eingenommen wurden und somit einen potentiellen Störfaktor bei der Analyse der Atemproben darstellen.

Folgende Wirkstoffe wurden identifiziert:

Acetylcystein	Etericoxib	Naproxen
Acetylsalicylsäure	Ezetimib	Olmesartan Medoxomil
Agomelatin	Fenoterol hydrobromid	Omeprazol
Alendronsäure	Fluticason	Oxazepam
Allopurinol	Fluvastatin	Pantoprazol
Amiodaron	Formoterol	Paracetamol
Amitriptylin	Furosemid	Phenprocoumon
Amlodipin	Gingko biloba	Prednisolon
Atorvastatin	Hydrochlorothiazid	Pregabalin
Atrovent	Hydromorphon	Ramipril
Beclometason	Ibuprofen	Risedronat
Benserazid	Insulin	Roflumilast
Bisoprolol	Ipratropiumbromid	Salbutamol
Budesonid	Irbesartan	Salmeterol
Calciumcarbonat	Ivabradin	Simvastatin
Candesartan	Kaliumhydrogencarbonat	Sitagliptin
Carbimazol	Kaliumcitrat	Solum
Carvedilol	Kontrazeptiva	Sotalol

Ceftazidim	Leflunomid	Spironolacton
Cefuroxim	Levodopa	Tamoxifen
Cephalosporine	Levofloxacin	Tamsulosin
Cetirizin HCL	Levothyroxin	Tetrazepam
Citalopram	Liothyronin	Tilidin
Clarithromycin	Lisinopril	Timolol
Clopidogrel	Loperamid	Tiotropiumbromid
Colecalciferol	Lorazepam	Torasemid
Colistin	Losartan Kalium	Tramadol
Deferasirox	Metamizol	Trimipramin
Digitoxin	Metformin	Verapamil
Dihydrocodein	Methotrexat	Vildagliptin
Enalapril	Metoprolol	Xipamid
Enoxaparin	Nadroparin	Zitronensäure
Estradiol	Naftidrofuryl	Zopiclon
	Naloxon	

In den nachfolgenden Abbildungen (Abb. 28-31) wurden alle Medikamente, die von den jeweiligen Probanden bzw. Patienten (linke Spalte) eingenommen wurden, markiert. Hierdurch entsteht eine graphische Darstellung der in den vier Untersuchungsarmen eingenommenen Medikamente.

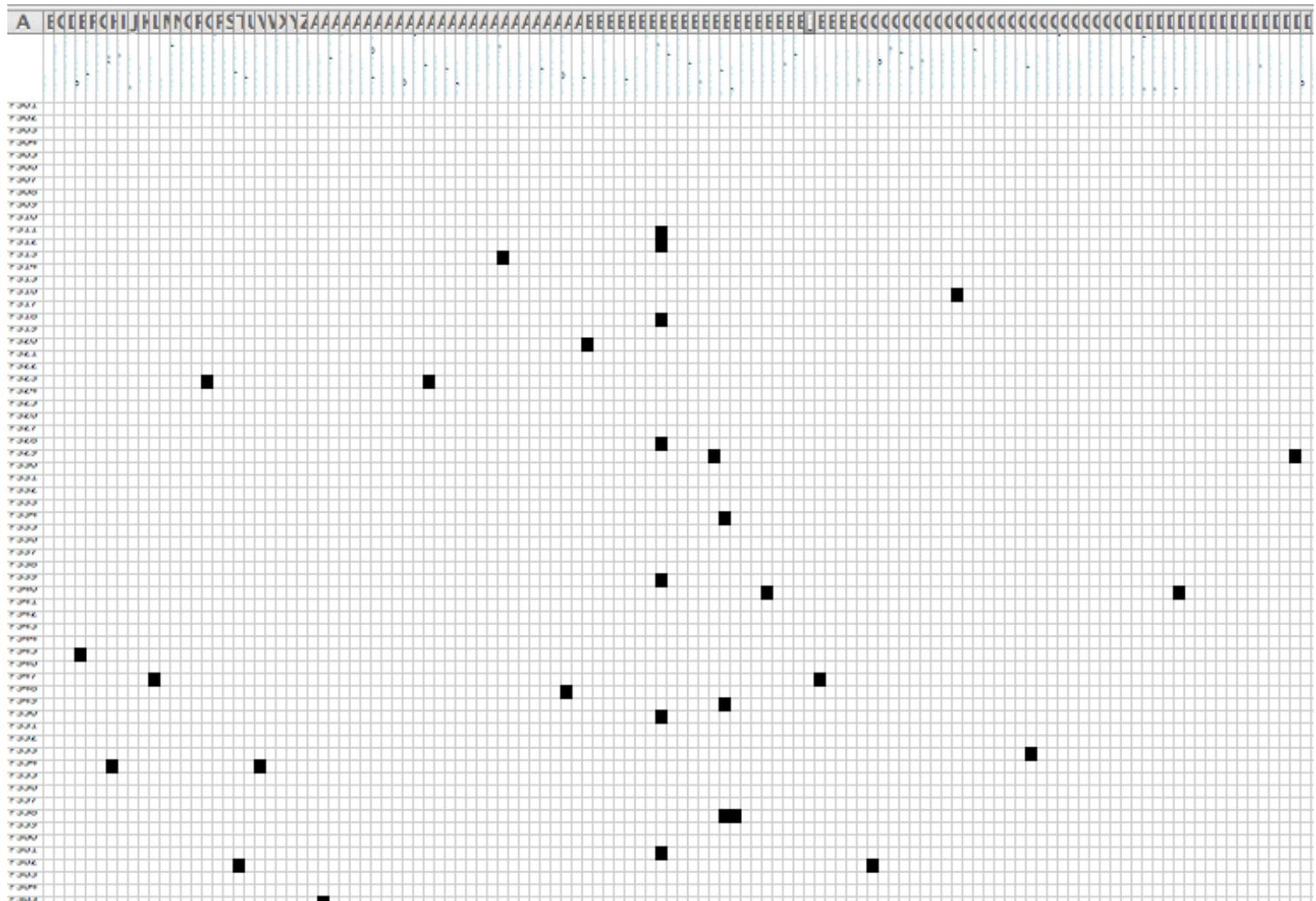


Abb. 28: Medikamenteneinnahme der gesunden Probanden.

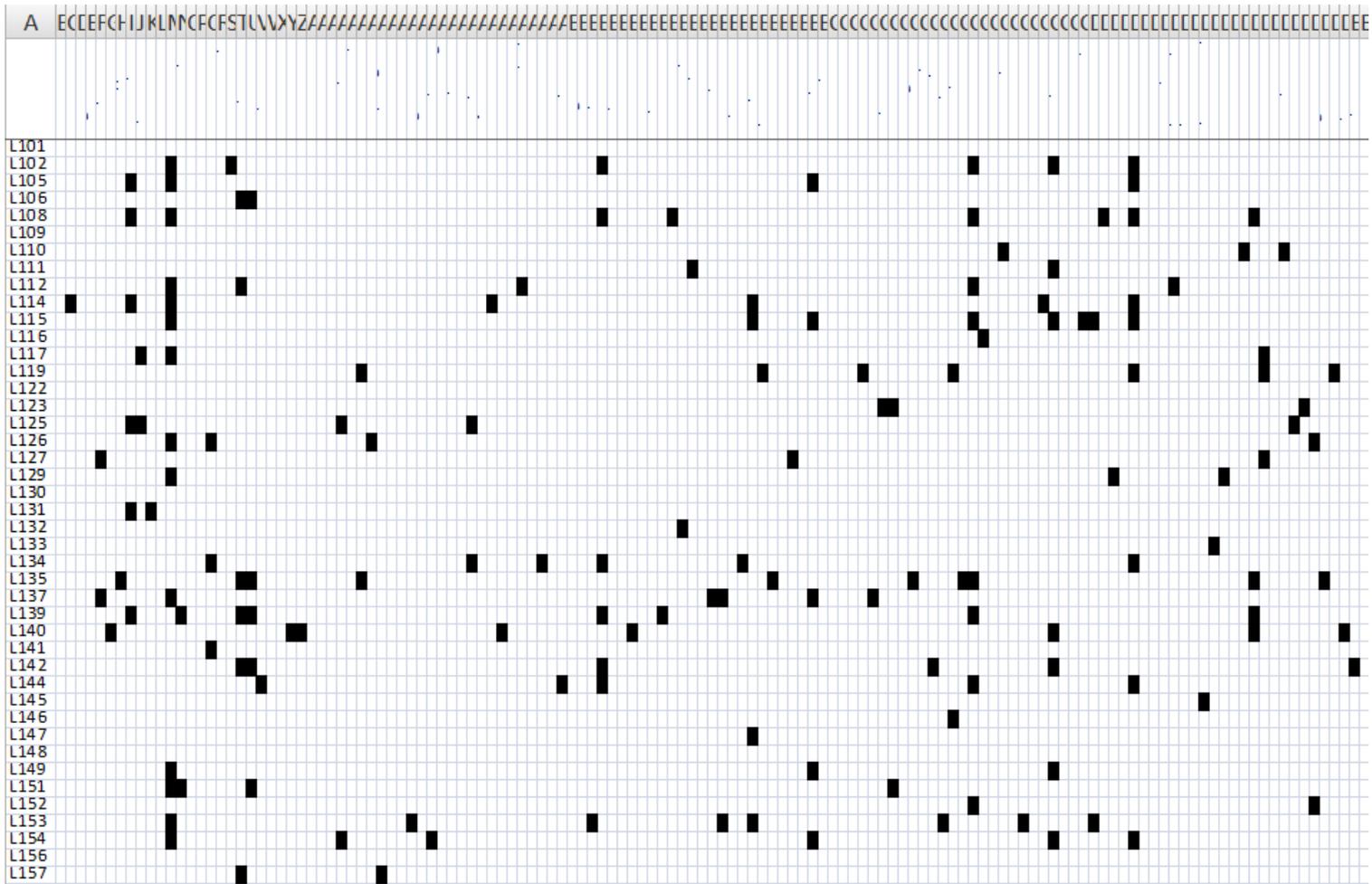


Abb. 29: Medikamenteneinnahme der Patienten mit Lungenkrebs.

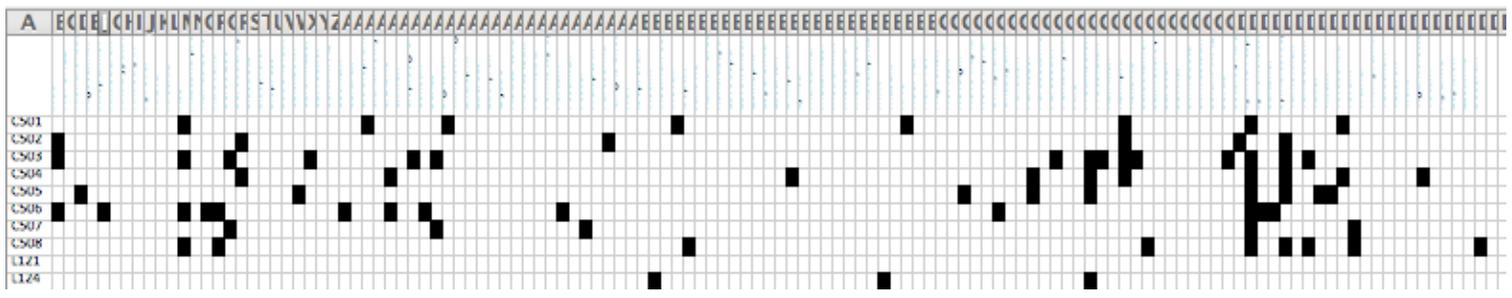


Abb. 30: Medikamenteneinnahme der Patienten mit COPD.

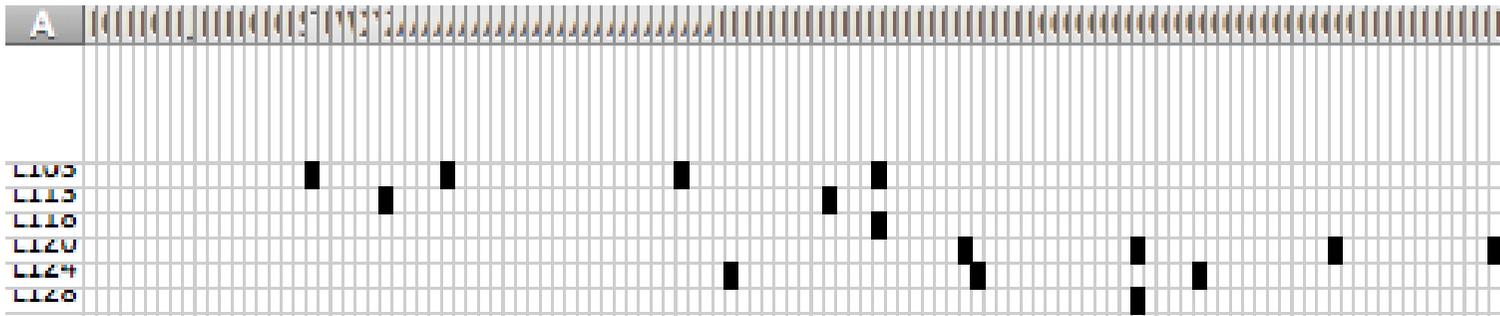


Abb. 31: Medikamenteneinnahme der Patienten mit non NSCLC RF.

III Identifizierte Substanzen durch GC-MS-Messungen

Oxiane	2 Propanol
Dimethyl alanine	N,N - dimethyl amine
N,N-dimethyl-Ethylamine	carbon-disulfide
Acetaldehyde	Trimethylamine
Diethylamine	N-methyl-ethylamine
Ethylamine	Acetic acid
Butanal	Benzene
1,3,5-Trioxane	Ethylene glycol
2,3,4-Trimethylpentane	4-Methyloctane
1-Hydroxy-2-Propanone	Methandiamine
propionic acid	Pentanal
1-Propanol	Propylene glycol
Acetamide	o-ethyltoluene
Toluene	Formamide
2,3 Butanediol	2,2-dimethyl propanoic acid
Sulfinylbis-Methane	Butanoic-acid
2 Propanone	1,3-dimethylbenzene
2-methyl-2,4-Pentanediol	N,N-diethylformamide
N,N-dimethylformamide	Hexamethylcyclotrisiloxane
Pivalinsäure	3-Methyl-pyridin
N,N-dimethylacetamide	o/m/p-Xylene
styrene	2-Heptanone
Ethylenglycolmonobutylether	2,2-Dimethyloctane
3,3-Dimethyloctane	N-ethyl-1,3-dithioisoindoline
a-Pinene	Diethylenglycol
3-Ethyltoluol	1,2,4-Trimethylbenzene

1,2,3-Trimethylbenzene	Phenol
4-Ethyltoluol	2-isopropylaminoethanol
N-ethyl-N-methyl-butylamine	n-propyl benzene
1,3,5-trimethyl benzene	6-methyl-5-Hepten-2-one
1,2-dichlorbenzene	C3 Benzene
1,4-dichlorobenzene	DELTA. 3 Carene
Glycerine, methyl ester	N,N-dimethylurea
Tetramethylurea	1,3-Dichlorbenzene
2-Ethyl-1-Hexanol	Methanethioamide
dl-Limonene	Phenylthiophene
Benzylalcohol	2(3H)-Furanone
2-Pyrrolidinone	Benzaldehyde
Cyclofenchene	Anilin
n-Decane	Benzoxazole
2-Ethyl-1,4-dimethylbenzene	6-methyl-5-Hepten-2-one
1-phenyl-Ethanone	tert-Pentylbenzene
n-Undecane	N-Ethylaniline
n-Tridecane	N-Formylmorpholine
Benzoic acid	Decamethylcyclobenzaldehyde
Tetramethylthiourea	3,4-dimethyl Benzaldehyde
2,4-dimethyl benzyl alcohol	N,N-dimethylbenzamide
1,3,5-trimethyl-Benzene	1,2,4-Triethyl benzene
Dimethylthioformamide	(+)-longicyclene
N-ethyl-N-phenyl-formamide	1-Decanol
3-Fluoroindole	n-Tetradecane
Cyperene	Junipene
(-)-isosativene	n-Pentacoban
Pentadecane	Eicosane

Octane	Octadecane
n-Tridecane	1,2,4-Methenoazulene
Dodecane	3,5-dimethyl-Undecane
1-Octen	a-copaene
1,4 methenoazulene, Junipene	a-amorphene
a-Gurjuene	Pentadecane
Pentacosane	Isolongifolene
Aromadendrene	a-longipinene
Alpha-Longifolene	n-Tridecan
Ledene	N-butyl Anilin
Eremophilene	Longifolene
2-acetyl-5-formylthiophene	Isobutylcyclopentane
Tetratetracontane	Cyclotetradecane
2-Ethyl-1-dodecanol	1-Dodecanol
2,4-Di-t-butyl phenol	2-(dodecyl)-Ethanol
n-Octacosane	n-Hexadecane
n-Heneicosane	2-Ethyl-1,4-benzodioxin
BHT	BHT-aldehyde
Eicosane	n-Nonadecane
n-Octadecane	Tricosane
Tetratricontane	Docosane
3,8-dimethyl-Decane	2-Hexyl-1-decanol
n-Tetradecane	n-Heptadecane
8-methylheptadecane	4-butyl-Benzenamine
n-Hexacosan	n-Hexadecane
n-ethyl-N-phenyl-Acetamide	n-Hexadecene
n-Nonacosane	n-Heptacosane
n-Tetracosane	N-ethyl-1,3-dithioisoindoline

Tetracontane	Octacosane
Pentacosane	Pentadecane
Hexacosane	N,N-Dimethylstearamide
N,N-dimethylbenzamide	n-Docosane
n-Triacontane	Nonadecane
Triacontane	benzoxazine
5-methyl-Undecane	2-methyl-1-Dodecanol
Bis-iso-butyl-phthalate DIBP	Bis-hexyl-phthalat DNHP
n-Hentriacontane	Ethylbenzene
p-diisopropyl benzene	Formamidinium acetate
1,3,6 -trioxocane	1,4 dimethyl benzene
n-propyl benzene	acetophenone
9H carbazole	methyl naphtalene
a-cubebene	3,3,6,9,9- pentamethyl... oxide
a-terpinene	Delta-cadinene
1,2,3,4- tetramethyl benzene	a-capaene
b-cadinene	Hexamethylcyclotetrasiloxane
2-b-pinene	5-ethyl-2-methyloctane
Decamethylcyclohexasiloxane	a-cedrene
hydroxymethapyrilene	2,5-dibutylthiophene
1-Methyl-2-(1-methylethyl)benzene	2,5-Dimethylbenzaldehyde
(1,1-dimethylpropyl)-Benzene	1,3-Bis(1-methylethyl) Benzene
1,4 -bis(1-methylethyl)-Benzene	CIS-.BETA.DIHYDRO TERPINEOL
TRANS-.BETA.DIHYDRO TERPINEOL	N,N-dibutyl 1-Butanamine
2(2-buthoxyethoxy)Ethanol	2,6 Dimethylbenzaldehyde
Diethylenglycolmonobutylether BDG	Benzothiazole (Vangard BT)
1,3-Dimethyl-2-(methoxymethyl)benzene	N-Ethyl-N-Methyl-Butamine
(N-phenylmethylene)-Benzeneamine	1,2,4-triethyl benzene

5H-2-Pyridine, 6,7-dihydro-4,7-dimethyl	1,2-diphenoxy-Benzene
4-Methyl-4-vinyl-1,4-butanolide	2,4-Dimethylbenzaldehyde
2,2,4,6,6-Pentamethylheptane	Octamethylcyclotetrasiloxane
Decamethylcyclopentasiloxane	1-(1-cyclohexen-1-yl)-Ethanone
Dodecamethylcyclohexasiloxane	1-Butanon, 1-(4-Pyridinyl)
2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-phenol	tetratricontane
2,2 Oxybis Ethanol (diethylene glycol)	ethyl benzaldehyde
7-ethoxy-8-methoxy-2,2-dimethyl-2H-chromene	pentylthiophene
2-hydroxyimino-N-(P-methoxyphenyl)acetamide	1-ethyl-4-methyl benzene
2-(Dimethylamino) ethanol DMEA	1-ethyl-2-methyl-benzene
N,N,N,N-tetramethyl Methandiamine	benzyl alcohol
5-(1-methylethylidene)-1,3-Cyclopentadiene	methylcyclohexane
Ethyl-N, N-dimethylcarbamate	carvomenthone
Palmitic acid, (2-thrimethylsyloxy)ethyl ester	1-methylethenyl benzene
Endo-6-cyano-2,6-Dimethyl-bicyclo(3.1.1)-2-ene	2,5-ditertbutyl phenol
6,7-dihydro-4,7-dimethyl 5H-2-Pyridine	n-Heneicosan
3-phenyl-5-(p-tolyl)-.lambda.3-phosphorine	
1-methoxy-4-(2-propenyl)-benzene	
cis-(-)-2,4a,5,6,9a-Hexahydro-3,5,5,9-tetramethyl(1H)benzocyclo-heptene	
2,6-di(t-butyl)-4-hydroxy-4-methyl-2,5-hexadiene-1-one	
2,6-di(t-butyl)-4-hydroxy-4-methyl-2,5-cyclohexadien-1-one	
2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-2,5-Cyclohexadiene-1,4-dione	
2,6-di(t-butyl)-4-methylene-2,5-cyclohexadien-1-one	
3,3,6,9,9,10-Hexamethyl-2-10-diazabicyclo-(4.4.0)-1-decene	
(+)-8,8-Dimethyl-(3ar,8bc)3,3a,4,5,6,7,8,8b-octahydro-indo[1,2-b]furan-2-one	
2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methyl phenol	
bis(2-methylpropyl)ester 1,2-Benzenedicarboxylic acid	

7 Danksagungen

Diese Studie war nur durch den Einsatz vieler engagierter Beteiligter möglich. Ausdrücklich bedanken möchte ich mich bei...

... meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Thorsten Walles, für die Unterstützung die ich zu jeder Zeit erhalten habe,

... der Studienassistentin Andrea Hofbauer in der Klinik Schillerhöhe, für die Unterstützung bei der Sammlung der Atemproben,

... Dr. Enole Boedecker in der Klinik Schillerhöhe ebenfalls für die Unterstützung bei der Sammlung der Atemproben und bürokratischer Angelegenheiten,

... dem Team der Firma Sony, Dr. Nadejda Krasteva, Dr. Isabelle Raible und Tatjana Malter, für die Auswertung der vielen Daten,

... meinem Partner, für die Unterstützung bei computertechnischen Fragen,

... meinen Eltern, die mich zu jeder Zeit unterstützt haben.

8 Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Kolmer
Vorname	Veronika