

L-Laktat und H₂O₂-Bestimmungen im Atemkondensat unter Ruhebedingungen sowie unter leichter bis mittelgradiger Belastung von jungen gesunden Probanden

Measurements of L-Lactate and H₂O₂ in Exhaled Breath Condensate at Rest and Mild to Moderate Exercise in Young and Healthy Subjects

Autoren

E. Marek¹, K. Mückenhoff², H. J. Streckert³, G. Becher⁴, W. Marek¹

Institute

¹ Institut für Arbeitsphysiologie an der Augusta-Kranken-Anstalt (Leiter PD Dr. W. Marek), Bochum

² Institut für Physiologie, Ruhr-Universität Bochum, Bochum

³ dsdiagnostics GmbH, Witten

⁴ FILT GmbH, Berlin

eingereicht 8.1.2008

akzeptiert nach Revision
10.3.2008

Bibliografie

DOI 10.1055/s-2008-1038170
Online-Publikation: 10.6.2008
Pneumologie 2008; 62: 541–547
© Georg Thieme Verlag KG
Stuttgart · New York
ISSN 0934-8387

Korrespondenzadresse

PD Dr. Wolfgang Marek
Institut für Arbeitsphysiologie
an der Augusta-Kranken-Anstalt
Bergstr. 26
44791 Bochum
Wolfgang.Marek@
ruhr-uni-bochum.de

Zusammenfassung



Hintergrund: Die Messung von Entzündungsmarkern, H₂O₂, und Stoffwechselmetaboliten, L-Laktat, im Atemkondensat hat den Vorteil einer nicht-invasiven Methode. Dieses wurde durch die neuartige Entwicklung von Enzymsensoren für L-Laktat und H₂O₂ möglich. In einem ersten Schritt überprüften wir experimentell bei jungen gesunden Versuchspersonen, ob ein Nachweis dieser Substanzen im Atemkondensat unter der Bedingung der Ruhe und der submaximalen Belastung möglich ist.

Methoden: Bei Ruhebedingungen und bei körperlicher Belastung von 60 und 120 Watt auf dem Fahrradergometer im steady state wurde bei 19 Probanden bei jeder Belastungsstufe Atemkondensat aus 100 l ausgeatmeter Luft hergestellt, in dem mithilfe der Enzymsensoren (Eco-Check, Viasys Health Care) Wasserstoffperoxid, H₂O₂, amperometrisch nach Peroxidase vermittelter Reduktion zu Wasser, H⁺-Ionen und L-Laktat durch Oxidation zu Pyruvat und H₂O₂, gemessen wurde. Die Ausscheidungsraten wurden aus den Konzentrationen im Atemkondensat und der Sammelzeit berechnet und in den Einheiten nmol/min für L-Laktat und pmol/min für H₂O₂ angegeben.

Ergebnisse: In Ruhe wurden 100 l Ausatemluft in 10,6 ± 5,1 min gesammelt und im Mittel 0,99 ± 0,3 ml EBC gewonnen, auf der 60-Watt-Stufe in 6,7 ± 1,8 min 1,23 ± 0,47 ml EBC und auf der 120-Watt-Stufe in 4,8 ± 0,8 min 1,09 ± 0,38 ml. In Ruhe fanden wir eine mittlere L-Laktat-Abgabe von 3,3 ± 3,1 nmol/min, die auf der 60 Watt-Stufe auf 8,4 ± 5,1 nmol/min anstieg (p < 0,05) und bei 120 Watt einen Wert von 15,0 ± 12,6 nmol/min (p < 0,02) erreichte. Die Laktat-Abgabe war proportional zum Energieumsatz (r = 0,99). Die H₂O₂-Abgabe in Ruhe betrug 49,1 ± 37,9 pmol/min und stieg bei 60 Watt zunächst auf

Abstract



Background: The recently developed microenzyme detectors make a non-invasive measurement of inflammatory markers and L-lactate in exhaled breath condensate (EBC) possible. In a group of young and healthy subjects, we examined whether L-lactate and H₂O₂ can be detected in EBC.

Methods: During resting conditions as well as at 60 and 120 Watt external load on a cycle ergospirometer 100 l exhaled air were collected under stationary load conditions from 19 healthy subjects. Exhaled breath condensate (EBC) was obtained by cooling the expired air volume. The analysis was performed within 90 min using an Eco-Check amperometer (Viasys Health Care). The H₂O₂ measurement was performed amperometrically by means of a biosensor after chemical reaction catalysed by peroxidase. Lactate measurements were performed using a bienzyme sensor after lactate oxidase-induced oxidation of L-lactate to pyruvate and H₂O₂. The rates of release of L-lactate in nmol/min und H₂O₂ in pmol/min were calculated from the concentrations of L-lactate and H₂O₂ in the EBC and the time of collection.

Results: At rest 100 l exhaled air were collected in 10.6 ± 5.1 min, and 0.99 ± 0.3 ml EBC were obtained, at the 60 Watt step 1.23 ± 0.47 ml EBC were collected in 6.7 ± 1.8 min, and at 120 Watt 1.09 ± 0.38 ml EBC in 4.8 ± 0.8 min. At rest, there was a mean rate of L-lactate release of 3.3 ± 3.1 nmol/min, which increased at the 60 Watt step to 8.4 ± 5.1 nmol/min (p < 0.05), and at 120 Watt to 15.0 ± 12.6 nmol/min (p < 0.02). The rate of L-lactate was proportional to the metabolic rate (r = 0.99). The rate of H₂O₂ release at rest was 49.1 ± 37.9 pmol/min, it increased at 60 Watt to 159 ± 113 pmol/min (p < 0.05) and decreased at 120 Watt to 96.5 ± 49.5 pmol/min (p < 0.05).

159 ± 113 pmol/min ($p < 0,05$) und fiel auf der 120 Watt-Stufe auf 96,5 ± 49,5 pmol/min ($p < 0,05$) ab.

Schlussfolgerungen: Bereits in Ruhe werden deutlich bestimmbare Ausscheidungsraten für L-Laktat und H_2O_2 im Atemkondensat gefunden. Unter externer Belastung wird ein Anstieg der L-Laktat-Abgabe gemessen, der mit dem biologischen Energieumsatz korreliert. Inwieweit dieser mit der belastungsabhängigen Laktatkonzentration im arteriellen Blut korreliert, soll in weiterführenden Untersuchungen ermittelt werden.

Einleitung

Die Entwicklung spezifischer und hochempfindlicher miniaturisierter Enzymsensoren ermöglicht eine nicht-invasive quantitative Bestimmung von Entzündungsmarkern und Stoffwechselmetaboliten im Atemkondensat (EBC) und könnte in Zukunft blutige Messungen molekularer Marker ersetzen [1]. Wir überprüften daher an jungen gesunden Probanden, ob ein Nachweis von L-Laktat und H_2O_2 im EBC mit dieser Methode bereits unter Ruhedingungen möglich ist und ob bei leichter bis mittlerer aerober Belastung ein stoffwechselabhängiger Anstieg in der L-Laktat- bzw. H_2O_2 -Abgabe über die Ausatemluft nachweisbar ist.

Unter Sauerstoffmangel entstehen intermediäre Metabolite wie L-Laktat. Die Milchsäure wird auch unter Ruhedingungen in geringen Mengen als Stoffwechselprodukt gebildet. Erst unter stärkerer körperlicher Belastung bei mehr als 50% der maximalen Sauerstoffaufnahmekapazität wird es in größeren Mengen gebildet und trägt wesentlich zur Ansäuerung und Funktionseinschränkung der arbeitenden Muskulatur bei. Nicht nur bei körperlichen Belastungen, auch bei akuten Lungenschädigungen finden sich erhöhte Laktat-Werte als Folge einer Gewebshypoxie im Blut. Erste Untersuchungen konnten Laktat auch bei Patienten im Atemexhalat wieder finden [2].

Die Halbwertszeit für den Laktatabbau beträgt 10–15 min. Ein Teil des Laktats wird in der Erholungsphase oxidativ zu CO_2 und Wasser abgebaut, der größere Anteil wird in der Leber wieder zu Glykogen resynthetisiert [3].

Die quantitative Erfassung der Laktatproduktion in Ruhe sowie unter externer Belastung ist mit den zur Verfügung stehenden Mitteln zurzeit nicht möglich. Weitgehend unbekannt ist der Zusammenhang zwischen der Laktatabgabe über die Atmung und der körperlichen Belastung.

H_2O_2 wird als einer der wesentlichen Entzündungsmarker angesehen. Es wird von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten sowie von Makrophagen und Epithelzellen freigesetzt [1]. H_2O_2 -Anstieg im Atemkondensat soll Exazerbationen chronisch obstruktiver Lungenerkrankungen vorausgehen und einen Therapieerfolg anzeigen. In der vorliegenden Untersuchung wurden L-Laktat und H_2O_2 im EBC von lungengesunden, nichtrauchenden jungen Probanden unter Ruhedingungen und unter leichter bis mittlerer aerober Belastung bestimmt und mit der metabolischen Leistung korreliert.

Methoden

Probanden

Eingeschlossen in die Untersuchung wurden 19 gesunde junge Nichtraucher (13 m, 6 w) in einem mittleren Alter von 22,7 ± 2,9 Jahren (20–30 Jahre), mit einer Körpergröße von 174 ± 9,0 cm

Conclusions: Significant measurable concentrations of L-lactate and H_2O_2 in the exhaled breath condensate were found already under resting conditions. During external load, an increase in the L-lactate concentration was found, correlating with the metabolic rate. H_2O_2 is an inflammatory marker, its concentration in the EBC was markedly increased during the first step of applied external load, but less during the second. A probable correlation between L-lactate concentration in EBC and arterialised blood will be studied in future investigations.

(162–186 cm), einem Gewicht von 69,5 ± 11,1 kg (57–88 kg) und einem BMI im Normbereich von 22,7 ± 2,1 (20,3–26,3). Atemkondensat wurde unter Ruhedingungen und im leichten bis mittleren Belastungsbereich (< 2,0 Watt/kg) am Fahrradergometer gewonnen. Auf Ausbelastungen und Blutentnahmen zur Laktatbestimmungen wird dabei verzichtet. Die Probanden schätzten ihre körperliche Fitness als mittelgradig bis gut ein [4]. Es wurde darauf geachtet, dass keine akuten Infektionen und keine respiratorischen und kardiovaskulären Vorerkrankungen bestanden.

Untersuchungsablauf

In Ruhe wurden Blutdruck und Herzfrequenz gemessen, dann erfolgte die Sammlung 100 l Ausatemluft im Douglassack. Dabei wurde die Sammeldauer gemessen. Aus der Ausatemluft wurde das Atemkondensat mittels Ecoscreen I (Viasys Health Care, Höchberg) gewonnen. Die Probanden wurden angehalten, ruhig und gleichmäßig über eine Atemmaske Raumluft einzuatmen und, gesteuert durch ein Ausatemventil, über einen angeschlossenen Druckschlauch in das Kühlgerät auszuatmen.

Es folgte eine 5-min-Belastung am Fahrradergometer (Ergoline 900) mit 30 Watt. Unter steady-state-Bedingungen wurden in der 4. und 5. Minute das Ausatemgas gesammelt und zum Ende der Belastung wurde der arterielle Blutdruck nach Riva-Rocci mit der Manschette am Oberarm gemessen und die Herzfrequenz am Pulsoximeter abgelesen.

Auf der 60-Watt-Stufe wurde das EBC im steady state aus 100 l Ausatemluft gewonnen. Die Belastung wurde solange beibehalten, bis 100 l Ausatemluft gesammelt wurde.

Es folgte eine Belastung mit 90 Watt über 5 Minuten ohne Sammlung von EBC, jedoch mit Messung des Blutdruckes, der Herzfrequenz und der Ventilation.

Die 120-Watt-Stufe wurde solange beibehalten, bis wiederum 100 l Ausatemluft gesammelt wurden und das EBC aufgefangen wurde. Abschließend erfolgte eine Belastung mit 150 Watt über 5 Minuten.

Atemgasanalyse

Das ausgeatmete Gas wurde in einem ca. 100 l fassenden Douglassack aufgefangen und unter ATPS-Bedingungen mit einer Gasuhr (Max Planck Institut für Arbeitsphysiologie, Göttingen) nachgemessen und die Ventilation ($\dot{V}_E$) unter BTPS-Bedingungen berechnet. Die Fraktionen des abgeatmeten Kohlendioxids (F_{ECO_2}) und des Sauerstoffs (F_{EO_2}) wurden mit der Ultrarot-Absorptionsmethode (Hartmann und Braun) bzw. mit einem paramagnetischen Verfahren (Hartmann und Braun) gemessen. Unter Berücksichtigung der Sammelzeit wurden aus dem Gasvolumen (BTPS) und den Fraktionen der Sauerstoffverbrauch und die Kohlendioxidproduktion unter STPD-Bedingungen berechnet.

Respiratorische und kardiovaskuläre Parameter

Neben der Ventilation wurde aus dem O_2 -Verbrauch und der CO_2 -Abatmung der respiratorische Quotient (RQ) berechnet und das kalorische Äquivalent aus der Tabelle von Lusk [5] entnommen. Aus dem kalorischen Äquivalent und der Sauerstoffaufnahme wurde der Energieumsatz (E) berechnet.

Die Blutdruckmessung erfolgte im steady state am Ende der Belastung nach Riva-Rocci am Oberarm. Die Herzfrequenz (fC) wurde am Pulsoximeter abgelesen. Aus der Sauerstoffaufnahme und der Herzfrequenz wurde der O_2 -Puls berechnet.

Atemkondensatgewinnung

Atemkondensat entsteht zu mehr als 99% aus kondensiertem Wasserdampf, nur ein kleiner Teil stammt von Aerosolen; diese enthalten nicht flüchtige zum Teil makromolekulare Substanzen [1]. In einem ml Ausatemluft wurden bis zu 4 Aerosoltröpfchen mit einem mittleren Durchmesser von $0,3\ \mu m$ gefunden [6, 7]. Wasserlösliche flüchtige Substanzen lösen sich im kondensierenden Wasserdampf und werden mit dem Atemkondensat aufgefangen.

Das Atemkondensat wurde mittels Ecoscreen I gewonnen. Die Probanden atmeten über eine Maske mit Atemventilen. Einatmung und Ausatmung erfolgten über getrennte Wege. Sie wurden angehalten, ruhig und gleichmäßig zu atmen, um Kontaminationen mit dem Speichel zu vermeiden. Die Ausatemluft wurde über einen Schlauch zu einem 10 cm langen, mit Teflon beschichteten doppelwandigen Sammelrohr geleitet, das durch ein umgebendes Kühlsystem bis auf $-20^\circ C$ abgekühlt war. Am Ende des Rohres war ein Kunststoffsammlgefäß angebracht. Durch das innere Rohr strömte die Ausatemluft und wurde am Ende in das äußere Rohr umgeleitet und gelangte ins Freie. In dem Kunststoffgefäß aufgefangen, wurde es verschlossen in einer Kühlbox auf Eis gelagert und innerhalb von 2 Stunden auf den L-Laktat und H_2O_2 -Gehalt untersucht. Die Bestimmung der Exhalatmenge erfolgte durch Wiegen auf einer Feinwaage.

L-Laktat und H_2O_2 -Analyse

Die Analyse der eisgekühlten Proben erfolgte innerhalb von 90 min nach der Spiroergometrie mittels ECo-Check (Viasys). Die H_2O_2 -Messung erfolgte amperometrisch mittels Enzymsensor nach Umsetzung durch Peroxidase. $H_2O_2 \rightarrow 2H^+ + O_2 + 2e^-$. Zur Laktatbestimmung diente ein Bi-Enzym-Sensor, bei dem eine Laktatoxidase vermittelte Oxidation von L-Laktat zu Pyruvat und H_2O_2 vorgeschaltet ist. $L\text{-Laktat} + O_2 \rightarrow \text{Pyruvat} + H_2O_2$. Das freigesetzte H_2O_2 oxidiert an der Platinelektrode und erzeugt einen Strom, der proportional zur Laktatkonzentration ist. Der Sensor ist hochspezifisch für H_2O_2 und um einen Faktor von 2–3 empfindlicher als Bestimmungen mittels Chemolumineszenz oder Fluoreszenzfotometrie. Eine Störung der Laktatmessung durch das natürlicherweise schon in der Probe vorhandene H_2O_2 konnte insofern vernachlässigt werden, da der jeweilige Konzentrationsbereich von H_2O_2 um den Faktor 100–1000 unter dem vom Laktat induzierten Messwert liegt. Am Messverstärker erfolgt programmgesteuert eine Herabsetzung der Empfindlichkeit. Der Messbereich liegt für H_2O_2 im Bereich von 30–3000 nmol/l und für L-Laktat im Bereich von 5–150 $\mu mol/l$. Arterielle Laktatkonzentrationen gesunder Probanden unter Ruhebedingungen liegen im Bereich von 0,36–1,25 mmol/l oder 3,2–11,3 mg/dl.

Aus der Sammelzeit und der Kondensatmenge wurden zunächst die Konzentrationen von L-Laktat und H_2O_2 im EBC gemessen. Anschließend wurden die Stoffmengen in 100 l Ausatemluft be-

rechnet. Schließlich wurde in Analogie zur Messung der CO_2 -Abgabe oder der O_2 -Aufnahme berechnet, wieviel L-Laktat (nmol) und H_2O_2 in (pmol) pro Minute über die Atmung abgegeben wurden.

Das H_2O_2 -Messsystem war so stabil, dass auf eine tägliche Eichung verzichtet werden konnte. Bei den Laktatmessungen wurden bei allen Proben eine Eichlösung vorausgeschickt und die Messwerte auf den Wert der Eichlösung bezogen.

Zur Analyse wurden jeweils 300 μl EBC entnommen und mit 300 μl Pufferlösung verdünnt. Die Proben und die Standardlösungen wurden luftblasenfrei mit einer 1 ml-Spritze in die vorgeesehenen Kammern eingebracht. Vor und nach jeder Messung erfolgte eine Spülung des Systems mit einer Pufferlösung.

Für jeden Probanden wurde ein neuer Sensor benutzt und die Messungen für Ruhebedingungen, sowie 60 Watt und 120 Watt durchgeführt.

Die Auswertesoftware wählte die Messpunkte automatisch und berechnete die Konzentrationen an H_2O_2 und Laktat. Der Untersucher hatte die Möglichkeit, die Messpunkte zu editieren, um von der Software nicht erkannte Artefakte zu eliminieren.

Statistik

L-Laktat- und H_2O_2 -Konzentrationen im EBC und ihre Ausscheidungsraten über die Atemluft in Ruhe sowie unter 60 und 120 Watt Belastung wurden mittels Student's t-Test auf ihre Signifikanz getestet [8]. Als Wahrscheinlichkeit für die Null-Hypothese wurde ein Wert von $p < 0,05$ angenommen.

Ergebnisse



Atemkondensatgewinnung

Unter Ruhebedingungen betrug die Sammeldauer für $96,5 \pm 3,4$ l Ausatemluft $10,6 \pm 4,5$ min. Dabei wurden im Mittel $0,99 \pm 0,26$ ml Atemkondensat gewonnen. Auf der 60-Watt-Stufe verkürzte sich die Sammeldauer für $93,7 \pm 5,2$ l Ausatemluft auf $6,7 \pm 1,7$ min, wobei $1,23 \pm 0,45$ ml Kondensat gewonnen wurden. Auf der 120-Watt-Stufe reichten im Mittel $4,8 \pm 0,65$ min um $1,09 \pm 0,32$ ml Kondensat in $97,2 \pm 4,8$ l Ausatemluft zu sammeln. Damit verkürzte sich die Sammelzeit auf der 120-Watt-Stufe auf weniger als 50% des Ruhewertes ohne signifikante Änderungen der gewonnenen Kondensatmenge.

Verhalten von Blutdruck und Kreislauf

Ausgehend von einer mittleren Ruheherzfrequenz von $74,0 \pm 13,5$ Schläge/min, stieg die Herzfrequenz mit steigender Belastung linear bei 60 Watt auf $107 \pm 17,4$ und bei 120 Watt auf $130 \pm 16,0$ Schläge/min an (● Tab. 1). Gleichzeitig stieg der systolische Blutdruck ausgehend von $119 \pm 9,6$ mm Hg auf $152 \pm 13,7$ mm Hg bzw. auf $165 \pm 17,6$ mm Hg an. Der diastolische Blutdruck änderte sich nicht signifikant gegenüber seinem Ausgangswert von $73,0 \pm 6,4$ mm Hg.

Ventilation und Gasaustausch

Unter Ruhebedingungen betrug die mittlere Ventilation $10,3 \pm 0,2$ l/min und steigerte sich bei 60 Watt auf $28 \pm 6,4$ l/min und bei 120 Watt auf $42 \pm 13,1$ l/min. In Ruhe wurden im Mittel $0,39 \pm 0,11$ l O_2 /min aufgenommen und $0,28 \pm 0,07$ l CO_2 /min abgegeben. Proportional zur Ventilation erhöhten sich die Sauerstoffaufnahme und die Kohlendioxidabgabe. Auf der 120-Watt-Stufe wurde für beide Parameter etwa das 4fache des Ruhewer-

Tab. 1 Verhalten respiratorischer und kardiovaskulärer Parameter in Ruhe und bei leichter bis mittlerer Belastung

	Ruhe	60 Watt	120 Watt	Lin. Regr.	Reg. Koeff.
Pa,syst (mm Hg)	119 ± 9,6	152 ± 13,7***	165 ± 17,6***	$y = 0,32x + 125$	$r = 0,96$
Pa,diast (mm Hg)	73,0 ± 6,4	77,7 ± 5,8	77,2 ± 10,0	$y = -0,11x + 76$	$r = 0,22$
fC (1/min)	74,0 ± 13,5	107 ± 17,4***	130 ± 16,0***	$y = 0,44x + 79$	$r = 0,99$
VE (l/min)	10,3 ± 0,2	28,0 ± 6,4***	42,0 ± 13,1***	$y = 0,21x + 11,7$	$r = 0,94$
VO ₂ (l/min)	0,39 ± 0,11	0,89 ± 0,29***	1,57 ± 0,63***	$y = 0,10x + 0,43$	$r = 0,98$
VCO ₂ (l/min)	0,28 ± 0,07	0,63 ± 0,20***	1,16 ± 0,48***	$y = 0,08x + 0,27$	$r = 0,97$
RQ	0,74 ± 0,09	0,73 ± 0,14	0,74 ± 0,11	$y = 0,00x + 72$	$r = 0,30$
ÄÄqu.O ₂	26,2 ± 10,3	26,9 ± 9,8	26,8 ± 8,9	$y = 0,28\ln x + 27$	$r = 0,92$
E (Watt)	125 ± 38	325 ± 85***	552 ± 173***	$y = 4,03x + 106$	$r = 0,99$
O ₂ -Puls (ml/HS)	5,2 ± 1,7	8,4 ± 2,0***	12,4 ± 5,4***	$y = 0,05x + 6,8$	$r = 0,96$

* p < 0,05, ** p < 0,005, *** p < 0,0005

Tab. 2 Verhalten der H₂O₂- und L-Laktat-Abgabe im Atemkondensat in Ruhe und unter leichter bis mittlerer Belastung

	Ruhe	60 Watt	120 Watt
EBC (ml)	0,99 ± 0,23	1,23 ± 0,45	1,09 ± 0,32
Sammeldauer (min)	10,6 ± 4,5	6,7 ± 1,5**	4,8 ± 0,7***
Sammelvolumen (l)	96,5 ± 3,4	93,7 ± 5,2	97,2 ± 4,8
H ₂ O ₂ (nmol/L EBC)	547 ± 368	1028 ± 903	483 ± 262
H ₂ O ₂ (pmol/100 l VE)	492 ± 317	1124 ± 762	482 ± 252
H ₂ O ₂ (pmol/min)	49,1 ± 37,9	159 ± 113*	96,5 ± 49,5*
L-Laktat (μmol/L EBC)	30,1 ± 16,5	42,4 ± 24,2	51,2 ± 33,8
L-Laktat (nmol/100 l VE)	27,2 ± 19,6	59,5 ± 46,0	58,3 ± 52,0
L-Laktat (nmol/min)	3,31 ± 3,09	8,43 ± 5,05*	15,2 ± 12,1**

* p < 0,05, ** p < 0,005, *** p < 0,0005

tes gemessen. Dabei blieb auch der Respiratorische Quotient unverändert.

Verhalten von H₂O₂- und L-Laktat im Atemkondensat

Unter Ruhebedingungen wurde eine mittlere H₂O₂-Konzentration im Atemkondensat von 547 ± 368 nmol/l gemessen, die auf der 60-Watt-Stufe auf 1028 ± 903 nmol/l anstieg und auf der 120-Watt-Stufe auf 483 ± 262 nmol/l abfiel. Die Änderungen erreichten nicht das Signifikanzniveau von p < 0,05 (● Tab. 2). Berechnet man die Menge H₂O₂, die in der Sammelzeit in 100 l Ausatemluft bzw. in einer Minute abgegeben wurden, so ergibt sich in Ruhe eine H₂O₂-Abgabe von 49,1 ± 37,9 pmol/min auf der 60-Watt-Stufe ein signifikanter Anstieg auf 159 ± 113 pmol/min (p < 0,005) und auf der 120-Watt-Stufe ein Abfall auf 96,5 ± 49,5 pmol/min (p < 0,05) (● Abb. 1a).

Unter Ruhebedingungen betrug die mittlere Laktatkonzentration im EBC 30,1 ± 16,5 μmol/l und stieg bei 60 Watt auf 42,4 ± 24,2 μmol/l und bei 120 Watt auf 51,2 ± 33,8 μmol/l, ohne die Signifikanzschwelle von p < 0,05 zu erreichen.

Unter Ruhebedingungen wurden im Mittel 3,3 ± 3,1 nmol Laktat pro Minute mit der ausatemten Luft abgegeben (● Abb. 1b). Die Ausscheidung erhöhte sich bei 60 Watt auf 8,4 ± 5,05 nmol/min (p < 0,05) und auf 15,2 ± 12,1 nmol/min auf der 120-Watt-Stufe (p < 0,005).

Korrelation von Energieumsatz und H₂O₂ bzw. L-Laktat-Abgabe

Die L-Laktat-Abgabe/min über die Ausatemluft korreliert bereits im aeroben Stoffwechselbereich eng mit der Sauerstoffaufnahme und dem Energieumsatz (● Abb. 2). Bei einem mittleren Energieumsatz in Ruhe von 125 ± 38 Watt wurden pro Minute

3,3 ± 3,1 nmol L-Laktat über der Atemluft abgegeben. Der Zusammenhang zwischen L-Laktat-Abgabe und dem Energieumsatz kann mit einer linearen Funktion beschrieben werden ($y = 35,9x + 11,4$, $r = 0,99$).

Zwischen dem Energieumsatz und der H₂O₂-Abgabe über die Atemluft konnte keine Korrelation gefunden werden. Auf der 60-Watt-Stufe kam es zwar zu einem signifikanten Anstieg der H₂O₂-Abgabe auf das Dreifache des Ruhewertes (p > 0,005). Auf der 120-Watt-Stufe war die H₂O₂-Abgabe jedoch auf das Doppelte des Ausgangswertes vermindert.

Diskussion

L-Laktat und H₂O₂ werden bereits in Ruhe von gesunden Probanden über die Ausatemluft abgegeben und können im Atemkondensat gemessen werden. Allerdings bestehen insbesondere für das H₂O₂ große intraindividuelle Unterschiede. Darüber hinaus fanden wir einen signifikanten belastungsabhängigen Anstieg der Laktatabgabe über das EBC, der bereits im aeroben Stoffwechselbereich mit dem Energieumsatz korreliert.

Die Ergebnisse ermutigen zu weiterführenden Untersuchungen, die klären sollen, ob eine Korrelation zwischen der Laktatkonzentration im arterialisierten Ohrläppchenblut und der Laktat-abgabe über die Ausatemluft bei Belastungsuntersuchungen besteht. Möglicherweise können nicht-invasive EBC-Bestimmungen in Zukunft die bisher notwendigen blutigen L-Laktat-Messungen am arterialisierten Ohrläppchenblut ersetzen.

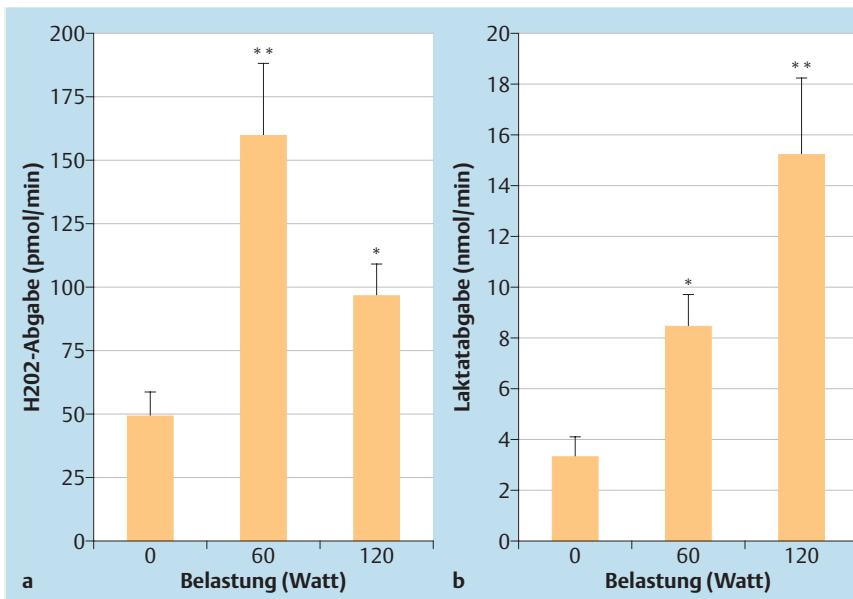


Abb. 1a und 1b Verhalten der H₂O₂-Abgabe (links) in pmol/min und der Laktatabgabe (rechts) in nmol/min in Ruhe (O) und im steady state bei 60 Watt und 120 Watt externer Belastung. Die Säulen sind Mittelwerte mit Angabe des SEM (standard error of the means).

Atemkondensatgewinnung

In Ruhe sowie auf der 60-Watt- und der 120-Watt-Stufe wurde die Ausatemluft im steady state in einem 100 l fassenden Douglassack aufgefangen. Dabei verkürzte sich die Sammelzeit auf der 120-Watt-Stufe um mehr als 50% und die Sammeldauer variierte deutlich weniger als unter Ruhebedingungen. Das gewonnene Volumen des Atemkondensats korrelierte mit dem ausgeatmeten Volumen und war bei 120 Watt nicht signifikant gegenüber der Ruhesammlung verändert (0,99 ml zu 1,09 ml). Der methodisch erhöhte Ausatemwiderstand durch das Kühlelement wurde von den Probanden auch unter der externen Belastung toleriert. Die Ergebnisse sind vergleichbar mit denen von Gessner [9], der bei gesunden 22 Kontrollprobanden $0,95 \pm 0,24$ ml und bei 23 COPD-Patienten $1,02 \pm 0,39$ ml Atemkondensat in 100 l Ausatemluft mit dem EcoScreen I gewann. Nach Berechnungen von Gessner entspricht das Kondensatvolumen nahezu 50% des gesamten Wassergehaltes von 100 l Ausatemluft, berechnet unter Berücksichtigung von Temperatur und Wasserdampf-sättigung.

H₂O₂-Konzentrationen

Unter Ruhebedingungen wurde eine mittlere H₂O₂-Konzentration im EBC von rund 550 nmol/l Kondensat gemessen. Dabei streuten die Werte zwischen 80 und 1330 nmol/l. Es bleibt ungeklärt, ob der Proband mit den höchsten H₂O₂-Werten eine beginnende, zum Zeitpunkt der Untersuchung noch symptomfreie Infektion entwickelte oder ob eine Kontamination mit Speichel bestand. Ein Messfehler bei der Ruhemessung erscheint unwahrscheinlich, da dieser Proband auch unter der Belastung die höchsten Messwerte aufwies. Auf der 60-Watt-Stufe fanden wir einen signifikanten Anstieg der H₂O₂-Abgabe, der mit der folgenden Belastung mit 120 Watt jedoch wieder um ein Drittel abfiel. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die H₂O₂-Syntheserate bei den wiederholten Belastungen nicht ausreicht, um genügend H₂O₂ bereitzustellen.

H₂O₂ wird in den Atemwegen von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten freigesetzt, aber auch von Makrophagen und Epithelzellen [10]. Bei jungen gesunden Nichtraucher fanden Nowak und Mitarbeiter H₂O₂-Konzentrationen zwischen 0,0

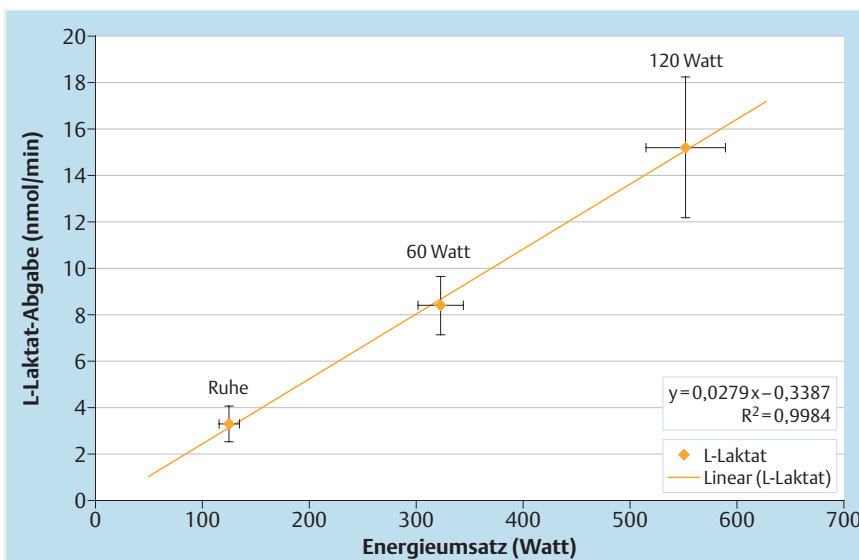


Abb. 2 Korrelation von Energieumsatz (Watt) und L-Laktat-Abgabe (nmol/min) im Atemkondensat in Ruhe sowie im steady state bei 60 Watt und 120 Watt externer Leistung. Die Werte sind Mittelwerte mit Angabe des SEM (standard error of the means).

und $0,9 \mu\text{mol/l}$. Im Vergleich waren die Werte von älteren gesunden Probanden sowie von Rauchern und Nichtrauchern erhöht [11].

In unseren Untersuchungen konnten wir unter Ruhebedingungen H_2O_2 -Konzentrationen ($766 \pm 805 \text{ nmol/l}$) messen, die mit den Literaturangaben vergleichbar waren. In Ruhe betrug die H_2O_2 -Abgaberate $107 \pm 192 \text{ pmol H}_2\text{O}_2$ pro Minute; auf der 60-Watt-Stufe kam es nahezu zu einer Verdopplung der H_2O_2 -Abatmung, auf der 120-Watt-Stufe betrug die Abgaberate $153 \pm 194 \text{ pmol/min}$. Die Ergebnisse zeigen zwar eine gesteigerte Abatmung bei Belastung, jedoch keine Korrelation zum Energieumsatz.

L-Laktat-Konzentrationen im EBC

L-Laktat ist die nur bei Säugern vorkommende linksdrehende Form des Laktats und kann daher sicher vom rechtsdrehenden Laktat, das von Mikroorganismen gebildet wird, abgegrenzt werden. Ruhewerte für den Blutlaktatspiegel liegen bei gesunden Probanden im Bereich von $0,25 - 1,5 \text{ mmol/l}$ im arteriellen und auch im arterialisierten Ohrläppchenblut [12]. Unter externer Belastung kommt es ab ca. 65% der maximalen Sauerstoffaufnahme zu einem steileren Anstieg der Laktatkonzentration mit zunehmender Belastung. Im Bereich von $2 - 4 \text{ mmol/l}$ spricht man vom aerob-anaeroben Übergang. Weiter steigende Werte stammen von einem zunehmend anaeroben Stoffwechsel mit L-Laktat-Bildung. Die höchste in dieser Untersuchung verwendete Belastungsstufe von 120 Watt entsprechend $1,77 \text{ Watt/kg}$ sollte bei unseren Probanden noch im aeroben Stoffwechselbereich liegen. Die Sauerstoffaufnahme und die Kohlendioxidabgabe stiegen bis in diesen Belastungsbereich linear an. Damit war auch der RQ noch unverändert. Das anfallende Laktat wird zum überwiegenden Anteil der Glukoneogenese zugeführt, ein Teil wird in weiterhin aerob arbeitenden Muskelanteilen verstoffwechselt, ein geringerer Teil wird in der Niere zu H_2O und CO_2 abgebaut. Neben der Leber sind die Nieren die einzigen Organe, die L-Laktat in Glucose umwandeln und an das Blut abgeben können. Unbekannt ist bisher, wie und in welchem Umfang Laktat in den Alveolarraum diffundiert und zusammen mit dem Kohlendioxid und weiteren flüchtigen Substanzen abgeatmet wird.

Er könnte eine Folge des Gleichgewichtes der undissoziierten Milchsäure zwischen dem Gasgemisch im Respirationstrakt und dem Blut (und Geweben) des Respirationstraktes sein. Da Laktat-Anionen ($\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_6^-$) wohl nicht flüchtig sind, ist es primär die undissoziierte Milchsäure ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_6$), die sich zwischen beiden Kompartimentsystemen verteilt.

Das Laktat im Atemgas spiegelt vermutlich die Menge undissoziierter Milchsäure in den Zellen und im Blut wieder. (Nach dem Massenwirkungsgesetz ist die Konzentration der undissoziierten Milchsäure gleich der Laktatkonzentration $\cdot \text{H}^+$ -Ionen-Konzentration/Dissoziationskonstante [ganz grob 1 mmol/l]). Für eine H^+ -Ionen-Konzentration von 40 nmol/l ($\text{pH} = 7,0$) und bei einer Laktatkonzentration von 1 mmol/l wäre die Konzentration der nichtdissoziierten Milchsäure gleich der H^+ -Ionen-Konzentration von 40 nmol/l . So berechneten wir aus der Transportgleichung aufgrund unserer Messungen der Laktatabgabe von $3,31 \text{ nmol/min}$ in Ruhe (Tab. 1) und einer Ventilation von $10,31/\text{min}$ eine Laktatkonzentration in der Atemluft von $0,3 \text{ nmol/l}$. Damit wäre die gemessene Laktatkonzentration in einer größenordnungsmäßig erwarteten Relation zu der Milchsäurekonzentration im Blut.

Die Frage nach einem möglichen Zusammenhang von Abgabe und Aufnahme des Milchsäure-Laktat-Systems über die Lunge lässt sich wie folgt abschätzend beantworten: In unserer Untersuchung stieg die Laktatabgabe zusammen mit der Sauerstoffaufnahme und dem Energieumsatz im untersuchten aeroben Belastungsbereich von $3,3 \text{ nmol/min}$ in Ruhe auf $15,2 \text{ nmol/min}$ auf der 120-Watt-Stufe. Geht man bei unseren fast 70 kg schweren Probanden von einem Blutvolumen von $5,01$ (7% des Körpermasse) aus, so würde bei einer mittleren Kreislaufzeit von einer Minute und einer Laktatkonzentration von 1 mmol/l Blut die Transportrate des L-Laktats etwa 5 mmol durch das Kapillarnetz der Lunge betragen: nur etwa ein von einer Million Laktatmolekülen wird ausgeschieden ($\text{outflux/influx} = 0,6 \cdot 10^{-6}$). Berechnungen der Transportraten der Milchsäure im Lungenkompartiment ergeben: etwa ein von hundert Milchsäuremolekülen wird ausgeschieden ($\text{outflux} = 3,3 \text{ nmol/min}$, $\text{influx} = 5 \cdot 40 \text{ nmol/min}$, $\text{outflux/influx} = 10^{-1,78}$).

Auch in anderen Tierspezies ist die Laktat-Abgabe über die Ausatemluft gering. In experimentellen Untersuchungen an gesunden Kälbern waren die L-Laktat-Konzentrationen im EBC unterhalb der Nachweisgrenze des angewendeten Verfahrens von $0,5 \mu\text{mol/l}$ [13].

Bei gesunden Menschen wurde Laktatkonzentration im EBC von $2,5 \pm 0,4 \mu\text{mol/l}$ gemessen [2]. Unter den Faktoren, die bei Patienten mit akuten Lungenschädigungen den pH der EBC bestimmen, korrelierten L-Laktat und NH_4^+ mit dem EBC-pH [14].

Zusammenfassung

L-Laktat und H_2O_2 konnten bei jungen gesunden Nichtrauchern im Atemkondensat bereits unter Ruhebedingungen und im aeroben Belastungsbereich nachgewiesen werden. Die Laktatabgabe über die Ausatemluft korrelierte eng mit der metabolischen Leistung. H_2O_2 wurde unter externer Belastung mit 60 Watt ebenfalls vermehrt abgegeben, jedoch reduzierte sich der H_2O_2 -Anstieg auf der nachfolgenden 120-Watt-Stufe, vermutlich kann H_2O_2 nicht so schnell nachgebildet werden. Weiterführende Untersuchungen sollen klären, ob eine Korrelation zwischen arterieller L-Laktat-Konzentration und der Laktatabgabe über das Atemkondensat unter Belastungsbedingungen besteht.

Appendix

Unter Sauerstoffmangel werden Glukose und Glykogen zu Pyruvat abgebaut. Dabei entstehen intermediäre Metabolite wie Alanin, α -Glycerol-Phosphat und hauptsächlich L-Laktat unter Bildung von 2 mol ATP pro mol Glucose [3]. Beim pH-Wert des Körpers, $\text{pH} = 7,4$, dissoziiert die Milchsäure fast vollständig in ihre konjugierte Base, Laktat und H^+ -Ionen, die Dissoziationskonstante dieser Reaktion beträgt $8,4 \cdot 10^{-4}$. Die Milchsäure wird auch unter Ruhebedingungen in geringen Mengen als Stoffwechselprodukt gebildet. Die Halbwertszeit für den Laktatabbau beträgt $10 - 15 \text{ min}$. Ein Teil des Laktats wird in der Erholungsphase oxidativ zu CO_2 und Wasser abgebaut, der größere Anteil wird in der Leber wieder zu Glycogen resynthetisiert [3].

Es bestehen Laktatströme innerhalb des Körpers von den laktatproduzierenden Zellen zu den laktatverbrauchenden Zellen. In Ruhe wäre das vornehmlich der Laktatstrom aus den mitochondrienlosen Erythrozyten, der nach grober Schätzung in der Größenordnung von $0,7 \text{ mmol/min}$ liegt. Der gesamte Energieum-

satz des Körpers entspricht ungefähr $12 \text{ mmol O}_2/\text{min} = 70 \text{ mmol ATP/min}$. Wenn der Energieverbrauch der Erythrozyten schätzungsweise 1 % des gesamten Energieverbrauchs beträgt, entspricht er $0,7 \text{ mmol ATP/min}$ und damit einer Laktatproduktion von $0,7 \text{ mmol/min}$.

Danksagung



Die Autoren möchten sich ausdrücklich bei Herrn Prof. Dr. Waldemar Moll aus Regensburg für die kritische Durchsicht der Arbeit und seine wertvollen Anregungen und Ausführungen über das Dissoziationsverhalten der Milchsäure und ihre mögliche Diffusion über die Alveolarmembran bedanken.

Literatur

- 1 Horvarth I, Hunt J, Barnes PJ. Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. *Eur Respir J* 2005; 26: 523–548
- 2 Kellum JA, Kramer DJ et al. Release of lactate by the lung in acute lung injury. *Chest* 1997; 111: 1301–1305
- 3 Shephard RJ. *Physiology and Biochemistry of exercise*. New York: Praeger Publishers, 1982: 1–672
- 4 Marek W, Marek E, Nensa F et al. Zur körperlichen Leistungsfähigkeit der Medizinstudenten im vorklinischen Studium. *Pneumologie* 2007; 61: 59
- 5 Lusk G. Analysis of the oxidation of mixtures of carbohydrate and fat. *J Biol Chem* 1924; 59: 42
- 6 Fairchild CI, Stampfer JF. Particle concentration in exhaled breath. *Am Ind Hyg Assoc* 1987; 48: 948–949
- 7 Papineni RS, Rosenthal FS. The size and distribution of droplets in the exhaled breath of healthy human subjects. *J Aerosol Med* 1997; 10: 105–116
- 8 Sachs L. *Angewandte Statistik, Planung und Auswertung, Methoden und Modelle*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag, 1992: 1–864
- 9 Geßner C. *Das Atemkondensat – nicht-invasiv gewonnene biochemische Informationen aus der Lunge*. Lengerich, Berlin, Bremen, Pabst Science Publishers, 2005: 1–132
- 10 Conner GE, Salathe M, Forteza R. Lactoperoxidase and hydrogen peroxide metabolism in the airways. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: S57–S61
- 11 Nowak D, Kalucka S, Bialasiewicz P et al. Exhalation of H_2O_2 and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in healthy subjects. *Free Radic Biol Med* 2001; 30: 178–186
- 12 De Marees H. *Sportphysiologie*. Köln: Verlag Sport und Buch, 2007: 1–800
- 13 Knobloch H. *Biologische Variabilität von ausgewählten Entzündungsmarkern (H_2O_2 , Nitrit, LTB₄, 8-iso-Prostan, pH-Wert und Laktat) in Atemkondensat und Blut beim Kalb unter Applikation neuer Messverfahren*. 2005: 1–134 Diplomarbeit, Fachhochschule Jena. Ref Type: Thesis/Dissertation
- 14 Geßner C, Hammerschmidt J, Kuhn H et al. Exhaled breath condensate acidification in acute lung injury. *Respir Med* 2003; 97: 1188–1194 Ref Type: Journal (Full)