Aus der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Universitätsmedizin Rostock

(Direktor: Prof. Dr. J. Däbritz)

Analyse flüchtiger organischer Substanzen in der Ausatemluft von Kindern mit Typ 1 Diabetes mellitus und gesunden Kontrollen

Inauguraldissertation zur Erlangung des Akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Universitätsmedizin Rostock

Vorgelegt von Ruth Elisabeth Lehbrink,

geboren am 17.10.1980 in Lingen

Rostock, im Juni 2020

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00003013

Dekan: Prof. Dr. med. Emil C. Reisinger, MBA

Gutachter:

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Dagmar.-C. Fischer
   Klinik für Kinder- und Jugendmedizin,
   Universitätsmedizin Rostock
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Dipl. chem. Jochen K. Schubert
   Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie,
   Universitätsmedizin Rostock
3. Gutachter: Prof. Dr. med. Reinhard Holl
   Institut für Epidemiologie und med. Biometrie,
   Universität Ulm

Tag der Einreichung: 12.06.2020

Tag der Verteidigung: 31.03.2021

Inhaltsverzeichnis

I	Abkürzungsverzeichnis	I
II	Verzeichnis der Abbildungen	II
III	Verzeichnis der Tabellen	III
1	**Einleitung**	**1**
1.1	Ätiologie, Diagnose und Epidemiologie des Diabetes mellitus	2
1.2	Akute Komplikationen des T1DM	4
1.3	Langzeitkomplikationen des T1DM	6
1.5	Atemgasanalytik	8
2	**Ziel der Arbeit**	**12**
3	**Material und Methoden**	**13**
3.1	Patientenkollektiv	13
3.2	Studiendesign	14
3.3	Methoden	14
3.3.1	Anamnese und Erhebung der biometrischen Daten	14
3.3.2	Laboruntersuchungen	14
3.3.3	Atemgasanalytik	15
3.3.3.1	Allgemeine Durchführung	15
3.3.3.2	Ablauf der Studienuntersuchung	15
3.3.3.3	Kalibrierung und Testvoraussetzung	16
3.3.4	Statistik und grafische Darstellung	17
4	**Ergebnisse**	**18**
4.1	Charakterisierung des Probandenkollektivs	18
4.2	Ergebnisse der Atemgasanalyse	18
4.2.1	Vergleich zwischen Patienten und Kontrollen	18
4.2.2	Zusammenhänge zwischen anthropometrischen Daten und der Konzentration der VOCs	26
4.2.3	Zusammenhänge zwischen der Erkrankungsdauer, HbA_{1c}, Blutfetten und VOCs	26
4.2.4	Zusammenhänge zwischen den Konzentrationen der VOCs	26

5	**Diskussion**	**30**
5.1	Probandenkollektiv	31
5.2	Interpretation der Befunde der Atemgasanalyse	32
5.3	Betrachtungen zu den ausgewählten VOC	34
5.3.1	Limonen	34
5.3.2	Isopren	34
5.3.3	Pentanal	35
5.3.4	Dimethylsulfid	36
5.3.5	Ethanol	36
5.3.6	Aceton und Isopropanol	37
5.4	Mögliche pathophysiologische Einflussfaktoren	38
5.5	Limitationen der Studie und Ausblick	39
6	**Zusammenfassung**	**42**
7	**Thesen**	**44**
8	**Literaturverzeichnis**	**45**
9	**Danksagung**	**60**
10	**Curriculum vitae**	**61**
11	**Eigenständigkeitserklärung**	**64**

I Abkürzungsverzeichnis

AGE	advanced glycation endproducts
ARDS	acute respiratory distress syndrome
BMI	body mass index
CGM	continuous glucose monitoring
CSII	continuous subcutaneous insulin injection
CYP	Cytochrom P
DDG	Deutsche Diabetes Gesellschaft
DMS	Dimethylsulfid
FTI	fat tissue index
HDL	high density lipoprotein
HLA	human leukocyte antigen
IMS	Ion mobility spectrometry
KiGGS	Kinder- und Jugend-Gesundheits-Survey
LAS	laser absorption spectroscopy
LDL	low densitiy lipoprotein
LTI	lean tissue index
MDI	multiple daily injections
MODY	maturity onset Diabetes of the Young
ppbV	parts per billion volume
pptV	parts per trillion volume
PTR-ToF-MS	Protonen-Transfer-Reaction Time-of-Flight Massenspektrometer
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SIFT-MS	selected-ion-flow-tube Massenspektrometer
T1DM	Typ 1 Diabetes mellitus
T2DM	Typ 2 Diabetes mellitus
VOC	volatile organic compound

II Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1	Inzidenz der Typ-1-Diabetes-Neuerkrankungen in Deutschland	3
Abb. 2	Schematische Darstellung der Hyperglycämie-aktivierten Stoffwechselwege	5
Abb. 3	Schematische Darstellung der Mechanismen, die zu einer diabetischen Mikroangiopathie führen	7
Abb. 4	Schematische Darstellung der Atemgasanalyse	16
Abb. 5	Heat-Map zum Vergleich der VOC zwischen Patienten mit T1DM und gesunden Kontrollen	20
Abb. 6	Die Konzentration der exhalierten VOC (Ethanol, Isopropanol, DMS, Isopren, Pentanal) bei Patienten (P) und Kontrollen (K)	21
Abb. 7	Die Konzentration ausgewählter VOC in Abhängigkeit vom mittleren HbA_{1c}	24
Abb. 8	Die Konzentration ausgewählter VOC in Abhängigkeit von der Erkrankungsdauer	25
Abb. 9	Die Konzentration von Isopren in Relation zu Alter (A), Gewicht (B), Länge (C) und BMI (D)	27
Abb. 10	Assoziation zwischen der Isopren Konzentration und dem mitteren HbA_{1c}-Spiegel (A) und dem Gesamtcholesterin (B)	28
Abb. 11	Assoziation zwischen der Konzentration ausgewählter VOC im Vergleich bei Patienten (rot) und Kontrollen	29

III Verzeichnis der Tabellen

Tab. 1	Verfahren zur Quantifizierung volatiler Substanzen	10
Tab. 2	Anthropometrische und klinische Charakteristika der Patienten und Kontrollen	19
Tab. 3	Konzentration von Aceton und Limonen in der Atemluft von Patienten und Kontrollen	21
Tab. 4	Konzentration der VOC in der Ausatemluft bei gesunden Kontrollen und bei T1DM-Patienten in Relation zur Art der Insulinapplikation (MDI, CSII)	22

1 Einleitung

Bereits im Altertum bekannt, stellt die Diabeteserkrankung nach mehr als zweitausendjähriger Geschichte die Menschheit noch immer vor medizinische und, aufgrund steigender Inzidenzen, auch vor volkswirtschaftliche Herausforderungen.

Erstmals um 1500 vor Christus auf ägyptischem Papyrus als übermäßige Urinausscheidung benannt und 230 vor Christus von Apollonius von Memphis unter dem Begriff Diabetes beschrieben, standen über Jahrtausende Klinik und Diagnosestellung im Vordergrund. In einer Zeit ohne technische Hilfsmittel gelang eine sichere Diagnose bei fortgeschrittener Symptomatik anhand der Anamnese, aber auch durch Riech- und Geschmacksproben des honigsüßen Urins. Ab der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts wurde zwischen einer frühen, tödlichen Verlaufsform und einem erst im späteren Lebensalter und bevorzugt bei übergewichtigen Personen auftretenden Krankheitsbild unterschieden (Klachko, 1979).

Über Jahrhunderte stand den betroffenen Patienten keine adäquate Therapie zur Verfügung. Dieses änderte sich erst mit der im späten 18. Jahrhundert einsetzenden Entdeckung grundlegender pathophysiologischer Zusammenhänge zwischen Pankreasfunktion und Blutzuckerspiegel. Hier seien stellvertretend die Arbeiten von Matthew Dobson (1732-1784), John Peter Frank (1745-1821) und Paul Langerhans (1847-1888) genannt, die wesentlich zum Verständnis der Pankreasfunktion und seiner Bedeutung für die Glucosehomöostase beigetragen und schließlich zur Einführung der Insulinbehandlung durch Banting und Best geführt haben (Banting et al., 1922). Mit optimierten Verfahren zur Isolierung von Insulin aus den Bauchspeicheldrüsen von Kälbern und Rindern in der ersten Hälfte und der Einführung rekombinanter Insuline in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts konnte der wachsenden Gruppe insulinabhängiger Patienten gerecht werden (Poretsky, 2010).

Insulin ist ein aus zwei Untereinheiten bestehendes Proteohormon, das mit dem Gegenspieler Glucagon die Glucosehomöostase reguliert. Während neben Glucagon auch Adrenalin, Kortisol und Schilddrüsenhormone den Glucosespiegel steigern können, ist nur Insulin in der Lage, den Blutzuckerspiegel zu senken, indem es die zelluläre Glucoseaufnahme und intrazelluläre Glycogensynthese und -speicherung in Leber und Muskel stimuliert und gleichzeitig die hepatische Gluconeogenese hemmt. In der Leber, dem Fettgewebe und der Muskulatur wird die Lipolyse durch Insulin gehemmt während es die Triglyceridsynthese in Leber und Fettgewebe sowie die Speicherung von Aminosäuren in der Muskulatur

stimuliert. Weiterhin ist Insulin über die Aktivierung von Rezeptor-Tyrosinkaskaden ein wichtiger Regulator von Zellwachstum und Proliferation (Heinrich et al., 2014).
Neben der Erfassung pathogenetischer Zusammenhänge und der Bedeutung sozioökologischer Faktoren für die Entwicklung eines Diabetes sind die Optimierung der Insulintherapie und der diagnostischen Verfahren zur Früherkennung metabolischer Veränderungen Gegenstand aktueller Forschung.

1.1 Ätiologie, Diagnose und Epidemiologie des Diabetes mellitus

Beim Diabetes mellitus handelt es sich um eine Regulationsstörung des Glucosestoffwechsels mit dem Leitsymptom einer chronischen Hyperglycämie. Anhand der Pathogenese, des Ausmaßes der Insulinabhängigkeit und des klinischen Verlaufs lassen sich verschiedene Formen unterscheiden. Der T1DM manifestiert sich fast ausschließlich im Kindesalter und betrifft aktuell in Deutschland etwa 32.000 Kinder und Jugendliche im Alter zwischen 0 und 18 Jahren (Deutsche Diabetesgesellschaft, 2019), mit Manifestationspeaks rund um das 5. bis 7. Lebensjahr und die Pubertät (Harjutsalo et al., 2008). Die durch Autoantikörper-vermittelte progrediente Zerstörung der Insulin-produzierenden β-Zellen und der damit einhergehende absolute Insulinmangel macht eine lebenslange Insulinsubstitution notwendig. Als Auslöser der Autoimmunerkrankung werden neben einer genetischen Disposition mit Polymorphismen in den für Antigenpräsentation, T-Zell-Aktivierung und/oder Immunregulation beteiligten HLA-Genen auch Virusinfektionen, die Exposition gegenüber Nahrungsantigenen, die Stilldauer, sowie ein Vitamin D-Mangel diskutiert (Rewers et al., 2016).
Der T2DM ist durch eine periphere Insulinresistenz charakterisiert, wird ganz wesentlich durch Adipositas und einen insgesamt ungesunden Lebensstil gefördert und betrifft (noch) überwiegend Erwachsene. Daneben sind weitere Diabetesformen wie z.B. der durch einen genetisch vermittelte Defekt der ß-Zell-Funktion ausgelöste Diabetes (MODY Diabetes = maturity onset diabetes of the young), der mit der cystischen Fibrose assoziierte Diabetes (CFRD), der Gestationsdiabetes oder die sekundär durch entzündliche, medikamentös-toxische oder degenerative Pankreasveränderungen hervorgerufene Formen zu nennen (Deutsche Diabetesgesellschaft, 2018; Hürter et al., 2005).
Weitere Autoimmunerkrankungen, wie z.B. eine Zöliakie, eine Hashimoto-Thyreoiditis oder eine rheumatoide Arthritis, treten bei Patienten mit einem T1DM

etwa 15 Mal häufiger als in der gesunden Bevölkerung auf, so dass Screening-untersuchungen zum Nachweis spezifischer Antikörper im Abstand von 1 bis 2 Jahren Bestandteil einer leitliniengerechten Versorgung der Patienten sind (Deutsche Diabetesgesellschaft, 2018; Frohlich-Reiterer et al., 2008).
Basierend auf langfristigen epidemiologischen Beobachtungen wird eine Verdopplung der bisherigen Inzidenz innerhalb einer Dekade vermutet (Patterson et al., 2009), wobei die Anzahl der Neuerkrankungen einen zyklischen Verlauf mit ungefähr vierjährlichen Perioden zeigt (Abb. 1). Gleichzeitig verlagert sich der Erkrankungsbeginn zunehmend in das Alter unter 5 Jahren (DIAMOND Project Group, 2006; Harjutsalo et al., 2008). Eine auf die Lebenszeit bezogene, längere Krankheitsdauer ist die Folge, zudem wirken metabolische Veränderungen nun auf einen sich entwickelnden, präpubertären Organismus ein. Das Risiko für die typischen Spätfolgen eines T1DM verlagert sich in jüngeres Lebensalter und kann die Funktion der Organsysteme und Lebensqualität in Zeiten, in denen berufliche Karriere und Familienplanung im Vordergrund stehen, beeinträchtigen.

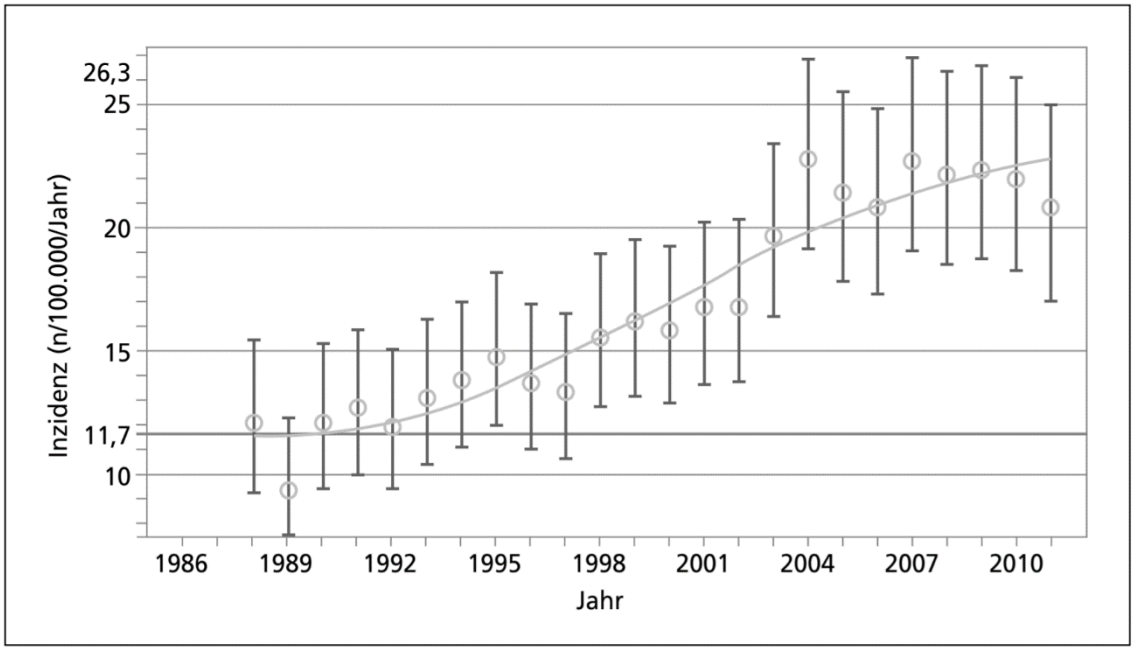

Abb. 1: Inzidenz der Typ-1-Diabetes-Neuerkrankungen in Deutschland*. Darstellung der Gesamtzunahme sowie des zyklischen Verlaufs mit steigenden Inzidenzen alle 3-6 Jahre (Neu et al in Deutsche Diabetesgesellschaft, 2019)*

1.2 Akute Komplikationen des T1DM

Im Laufe der Erkrankung treten, unabhängig von der Qualität der Insulintherapie, akute Stoffwechselentgleisungen und über die Jahre sich verstärkende, chronische und meist lebenslimitierende Langzeitfolgen auf. Ziel der Therapie ist daher durch eine engmaschige Anpassung der exogenen Insulinzufuhr an den aktuellen Bedarf den euglycämischen Zustand zu erhalten. Dieses impliziert zugleich die regelmäßige (Selbst-)Kontrolle des Blutzuckers sowie die regelmäßige Bestimmung des HbA_{1c}-Spiegels als einen Marker der langfristigen Therapiegüte. Die deutsche Gesellschaft für Diabetologie empfiehlt 3 bis 4 Blutzuckerbestimmungen pro Tag. Diese sollten in jedem Fall vor Mahlzeiten und vor, eventuell auch während und nach, intensiver körperlicher Betätigung zur Vermeidung von Hypoglycämien erfolgen. In der Langzeitkontrolle wird ein HbA_{1c} Spiegel von <7,5% empfohlen (Deutsche Diabetesgesellschaft, 2018). Für die (Selbst)-Kontrolle des Blutzuckers wird in der Regel Kapillarblut aus der Fingerbeere verwendet.

Auch einige der kontinuierlichen Messverfahren (CGM), die mit Sensoren die Glucosekonzentration im Unterhautfettgewebe erfassen, erfordern kapilläre Blutzuckerwerte zur Kalibration.Akute Hypo- und Hyperglycämien können durch endogene (beispielsweise Infekte, Operationen) und exogene (unter anderem Alkohol, Medikamente) Faktoren sowie durch inadäquate Insulindosierung hervorgerufen werden und machen sich durch charakteristische Symptome bemerkbar. Im Falle einer Hypoglycämie sind dies autonome, adrenerge Beschwerden wie Zittern, Schwitzen und/oder Hunger. Neuroglycopenische Zeichen wie Benommenheit, Verwirrtheit, Sprach- und Sehstörungen und schließlich Krampfanfälle und Bewusstlosigkeit sind bei weiterer Verschlechterung möglich. In Abhängigkeit von der durchschnittlichen Stoffwechsellage ist der Organismus an unterschiedliche Blutzuckerlevel adaptiert, so dass die Hypoglycämieschwelle interindividuell schwankt (Cryer et al., 2003; Oyer, 2013). Hyperglycämien führen häufig erst nach längerer Persistenz zu den typischen Symptomen wie Durst, Polydipsie, Polyurie, Schwäche, Schwindel und Sehstörungen (Häring et al., 2011). Als unmittelbare Komplikation kann eine persistierende Hyperglycämie beim T1DM in eine diabetische Ketoazidose münden, die durch die oben genannten Symptome und pseudoperitonitische Bauchschmerzen bis hin zu Benommenheit und Koma gekennzeichnet ist.

Neben der Hyperglycämie stimuliert der Insulinmangel die Lipo- und Proteolyse mit konsekutiver Bildung von Ketonkörpern (Aceton, Acetacetat, ß-

Hydroxybuttersäure), die wiederum die Entwicklung einer metabolischen Azidose fördern. Die übermäßige Freisetzung von Aceton ist häufig durch den charakteristisch süßlich-obstartigen Geruch der Atemluft zu erkennen. Zusätzlich werden durch eine Hyperglycämie immer auch alternative Stoffwechselwege aktiviert, die maßgeblich für die Entwicklung der Langzeitkomplikationen sind. Zu diesen Nebenwegen zählen der Polyol-Weg, der Hexosamin-Weg, die Aktivierung der Proteinkinase C und die Bildung von advanced glycation endproducts (AGE) (Abb. 2).

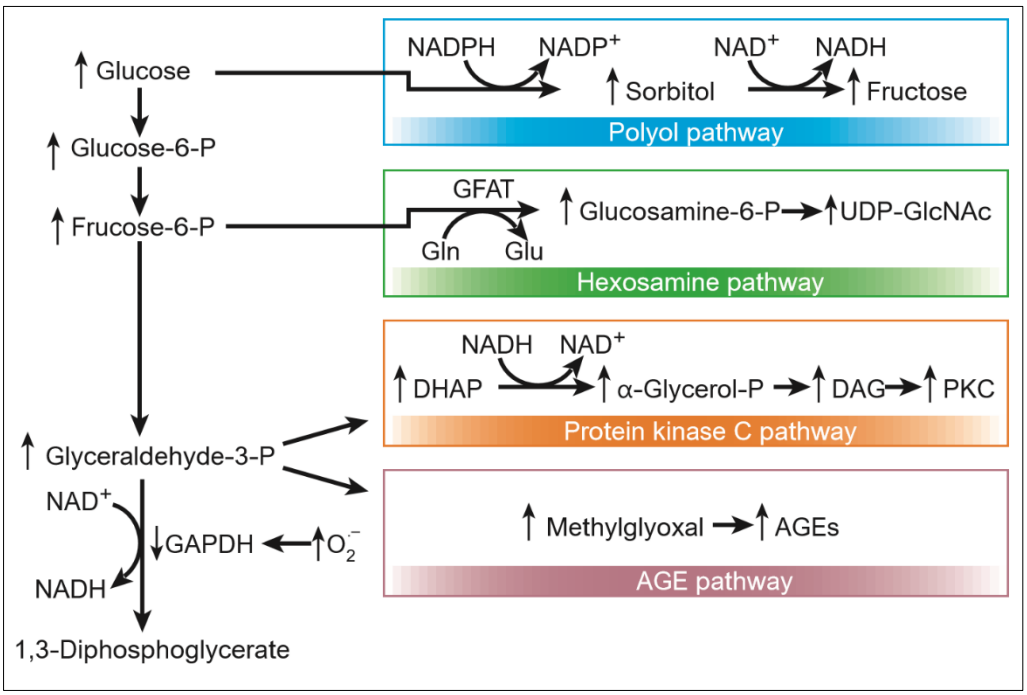

Abb. 2: Schematische Darstellung der Hyperglycämie-aktivierten Stoffwechselwege*. Die im Überschuss vorliegende Glucose wird intrazellulär vermehrt über vier alternative Stoffwechselwege abgebaut, denen die Anhäufung oxidativer Substanzen und damit die Erhöhung von oxidativen Stress gemein ist.. Im Polyol-Weg wird unter Abbau der Glucose zu Fructose NADPH verbraucht, das als Cofactor in der Regeneration des antioxidativ wirksamen Glutathions benötigt wird. Vermehrter Fluss über den Hexosamin-Stoffwechselweg kann zu veränderter Genexpression und Proteinfunktion führen. Die Aktivierung der Proteinkinase C bedingt sowohl veränderte Blutfüsse in Retina und Niere als auch eine vermehrte Ausschüttung von VEGF und anderen proliferativen Faktoren. Via nicht enzymatischer Glykierung entstandene AGEs führen zu strukturellen Veränderungen in Gefäßen und Geweben, zudem können frei zirkulierende AGEs über Bindung an den Rezeptor für AGE (RAGE) zur Aktivierung von ROS führen (Brownlee, 2001).*

Während der pathophysiologische Zusammenhang zwischen persistierender Hyperglycämie und Langzeitkomplikationen eines Diabetes unstrittig ist, wird die Bedeutung der glycämischen Variabilität, also Dauer und Frequenz hypo- und hyperglycämischer Episoden, insbesondere beim T1DM kontrovers diskutiert (Smith-Palmer et al., 2014).

1.3 Langzeitkomplikationen des T1DM

Im Laufe ihres Lebens entwickeln Diabetespatienten in Abhängigkeit vom Ausmaß der glycämischen Kontrolle und individuellen prädisponierenden Faktoren behindernde bis schließlich tödliche Komplikationen, die sowohl auf vaskuläre als auch auf neuronale Veränderungen zurückzuführen sind. Die diabetische Makroangiopathie ist durch eine Atherosklerose der Leitungsgefäße mit dem inhärenten Risiko für die Entwicklung von koronarer Herzkrankheit, peripherer arterieller Verschlusskrankheit oder Apoplex gekennzeichnet. Neben den "klassischen", mit biologischer Alterung und/oder dem Lebensstil-assoziierten Faktoren sind insbesondere die Dyslipidämie und die im Rahmen rezidivierender Hyperglycämien induzierten Überlaufreaktionen mit Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) als wesentlicher Risikofaktor für die Entwicklung der diabetischen Makroangiopathie zu nennen.

Die diabetische Mikroangiopathie geht mit funktionellen und strukturellen Aberrationen der subendothelialen Basalmembran im Bereich der terminalen Strombahnen einher und manifestiert sich insbesondere in der Retina (diabetische Retinopathie), den peripheren Nerven (diabetische Neuropathie) und in der Niere (diabetische Nephropathie) (Hürter et al., 2005). Zu den Ursachen der diabetischen Mikroangiopathie zählen die höhere Permeabilität der subendothelialen Basalmembran, die wiederum auf die nicht-enzymatische Glykierung der Extrazellulärmatrix zurückzuführen ist (Abb. 3).

In letzter Konsequenz können die physiologischen Funktionen des Kapillarbettes nicht aufrecht erhalten werden (Yazdanpanah et al.), es resultieren Gewebshypoxie und Nährstoffmangel (Häring et al., 2011).

Diabetische Spätfolgen werden intensiv untersucht, es mangelt jedoch an sensitiven und für den Einsatz in der klinischen Routine tauglichen Verfahren, um Komplikationen früh zu erkennen und den Patienten langfristig zu einer konsequenten Einhaltung der Therapie incl. regelmäßiger (Selbst-)Kontrolle des

Blutzuckers zu motivieren. Das CGM als ein wenig invasives Monitoring-Verfahren kann in dieser Hinsicht den Patienten von der Notwendigkeit häufiger Blutzuckerbestimmungen entlasten und ihm zugleich ein Gefühl für die glycämische Variabilität vermittelt.

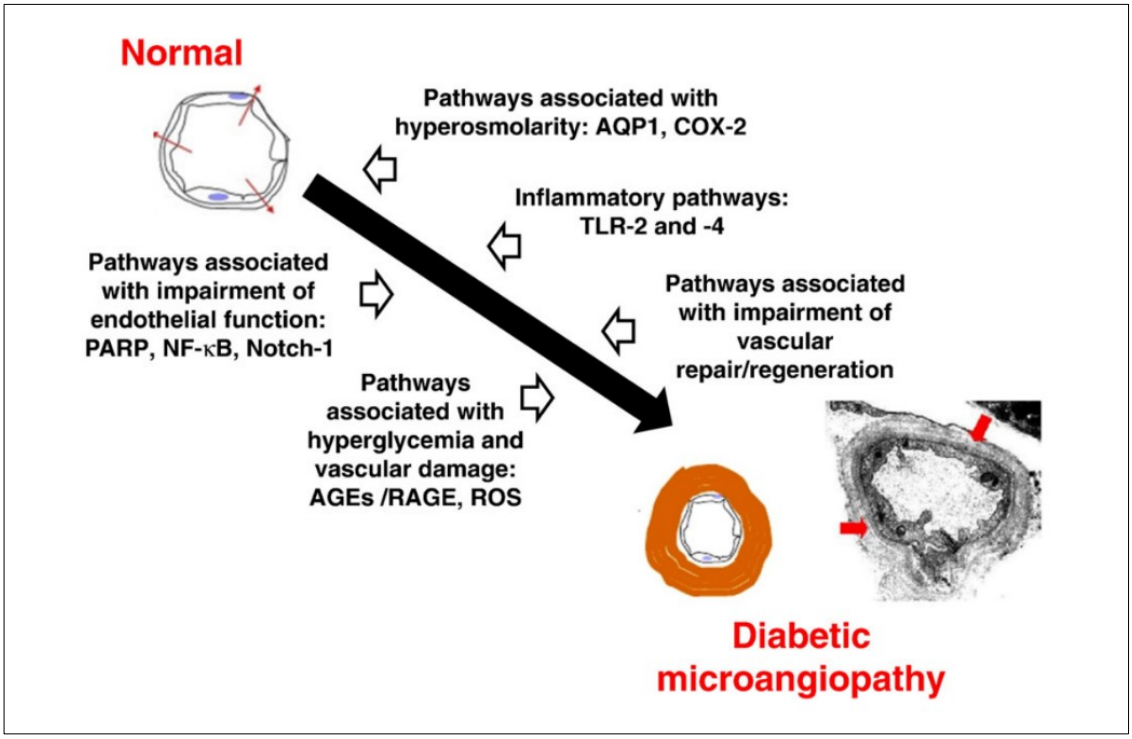

Abb. 3: **Schematische Darstellung der Mechanismen, die zur Entstehung einer diabetischen Mikroangiopathie führen.** Im Rahmen pathologischer Hyperglycämien bewirken Hyperosmolarität, oxidativer Stress und Mikroinflammation über die aufgeführten Mediatoren eine dauerhafte Schädigung des Gefäßendothels *(Madonna et al., 2017).*

Allerdings sind die metabolischen Prozesse, die mit einer transienten und klinisch inapparenten Hypo- oder Hyperglycämie einhergehen, in-vivo schwer zu fassen. Dieses ist vermutlich nicht nur Folge einer kurzen biologischen Halbwertszeit mit unzureichender Akkumulation der Metabolite in Serum oder Urin, sondern möglicherweise auch der Flüchtigkeit der Metabolite mit konsekutiver Ausscheidung über die Atemwege geschuldet. Ein prominentes Beispiel ist die alveolare Elimination von Aceton bei entgleistem Diabetes (Musa-Veloso et al., 2002; Wang et al., 2013). Mehr und mehr sind daher in den letzten Jahrzehnten

Atemgasuntersuchungen durch die einfache und nicht-invasive Probengewinnung einerseits und die verbesserten analytischen Verfahren andererseits in den Fokus gerückt.

1.5 Atemgasanalytik

Unsere Atmung dient nicht allein dem Austausch von Sauerstoff und Kohlendioxid, sondern auch zur Eliminierung flüchtiger Metabolite. Unter körperlichen Extrembedingungen und bei vielen Krankheitszuständen können sich die alveolären Ausscheidungsprofile ändern, teilweise lassen sich charakteristische Atemgerüche wahrnehmen. Bereits Hippokrates beschrieb den seltsamen Geruch kranker Menschen, unter anderem von Diabetikern. Im 20. Jahrhundert hat Linus Pauling als einer der ersten die Gaschromatographie für die Atemgasanalyse eingesetzt und dank der Entwicklung moderner Trenn- und Detektionsverfahren lassen sich heute nicht mehr nur Sauerstoff, Stickstoff und Kohlendioxid, sondern auch mehr als 800 flüchtige organische Verbindungen (VOC) im Spuren- und Ultraspurenbereich (nmol/l - pmol/l bzw. pptV-ppbV) nachweisen (Amann et al., 2014; de Lacy Costello et al., 2014; Teranishi et al., 1972). VOC können mit der Atmung aus der Umgebung aufgenommen (z.B. Tabakrauch, Benzindämpfe) bzw. durch Metabolisierung aus diesen erzeugt werden oder endogen entstehen und sind nach dem Übertritt aus dem Blut in die Lunge in der Ausatemluft nachweisbar. Letzteres kann zur Identifikation von Biomarkern für systemische Prozesse genutzt werden (Miekisch et al., 2004; Smith et al., 2007).

Endogene VOC werden, unabhängig von ihrer Herkunft, im Allgemeinen als Metabolite und Ausscheidungsprodukte ohne genuine Funktion angesehen, obwohl keineswegs ausgeschlossen ist, dass VOC ähnlich dem NO auch als interzelluläre Signalüberträger und Botenstoffe wirken könnten. Die Bestimmung der NO-Konzentration in der Atemluft ist mittlerweile in die Betreuung von Asthmapatienten integriert (Petsky et al., 2018). In mehreren Pilotstudien wurden Korrelationen zwischen VOC und entweder Tumorerkrankungen, Infektionen oder neurodegenerativen Erkrankungen beschrieben und Aceton als ein metabolischer Marker bei Patienten mit Diabetes beschrieben (Fuchs et al., 2010; Greiter et al., 2010; Phillips et al., 2003; Smith et al., 2011).

Die durch oxidativen Stress induzierte Peroxidation von Lipiden, insbesondere von den in Zellmembranen vorkommenden ω-3/ω-6-Fettsäuren, führt zur Bildung und alveolären Eliminierung von Ethan und Pentan, aber auch von Aldehyden

wie Malondialdehyd, Heptanal oder Pentanal (Li et al., 2009; Paredi et al., 2000; Scholpp et al., 2002). Nierenschäden gehen mit einer gesteigerten alveolären Eliminierung von Aminen einher (Davies et al., 1997; Obermeier et al., 2017), während organische Sulfide mit Leberschäden in Verbindung gebracht wurden (Sehnert et al., 2002). Isopren entsteht in geringen Mengen während der Biosynthese von Cholesterol, ist in der Atemluft eines der häufigsten VOC und wird bei körperlicher Anstrengung vermehrt abgeatmet (Gelmont et al., 1981; Karl et al., 2001; King et al., 2009; Kushch et al., 2008). Oxygenierte Substanzen wie z.B. Aceton und Acetaldehyd entstehen als Nebenprodukte des Glucosemetabolismus und der Lipolyse (Miekisch et al., 2004).

Bei der Beurteilung der Ergebnisse sind neben den physikochemischen Eigenschaften der VOC (Verteilungskoeffizienten, Exhalationskinetik) auch anthropometrische Faktoren (Alter, Geschlecht, Größe und Gewicht) insbesondere bei inter-individuellen Vergleichen zu berücksichtigen (Enderby et al., 2009).

Die Ergebnisse der Atemgasanalyse in der klinisch-experimentellen Forschung sind ganz wesentlich durch die gewählten Methoden zur Probengewinnung, die (Vor)-auswahl potentiell relevanter VOC und gewählten Detektionsverfahren geprägt. Zu Letzteren zählen eher unspezifische Sensor-Arrays (elektronische Nasen), aber auch ausgefeilte Verfahren wie die Selected Ion Flow Tube Mass Spectrometry (SIFT-MS) und die Protonen-Transfer-Reaktion-Massen Spekroskopie (PTR-MS) (Amann et al., 2014; Beale et al., 2016; Oakley-Girvan et al., 2017; Wallace et al., 2018) (Übersicht Tab.1). Beide Verfahren erlauben eine quantitative und außerordentlich sensitive online- und Echtzeit Messung, und sind daher für die Erfassung rascher und transienter metabolischer Reaktionen aufgrund der nicht-invasiven und beliebig oft wiederholbaren Probengewinnung attraktiv. Die PTR-ToF MS bietet zudem eine sehr gute Massenauflösung (>5000m/Δm) und erlaubt die genaue Erfassung geringster Konzentrationen (Ultraspurenanalytik). Eine Präkonzentration der Proben ist nicht erforderlich. Allerdings ist der Einsatz kombinierter Trenn- und Identifizierungstechniken zur eindeutigen Identifizierung der VOC unumgänglich und in vielen Fällen mit einer Asservierung der Atemgasproben verbunden (Amann et al., 2014; Beale et al., 2016; Wallace et al., 2018; Oakley-Girvan et al., 2017).

Tab. 1: Verfahren zur Quantifizierung volatiler Substanzen

Methode	Modus	LoD	Sensitivität/Spezifität	Kommentar
SIFT MS	Direct / Real time	ppbV	hoch/hoch	keine chemische Identifikation
PTR-MS	Direct / Real time	pptV	hoch/ mittelhoch	keine chemische Identifikation Online Monitoring
IMS	Real Time	ppbV	mittel/mittel	geringe Kosten keine chemische Identifikation
LAS	Real time	ppbV	hoch/hoch	
GC-MS	Pre-Concentration	pptV-ppbV	sehr hoch/ sehr hoch	Identifikation unbekannter VOC kostenintensiv
Sensor Arrays	Reference to Database	ppbV	mittel/mittel	mobile Messung Geräte schlecht vergleichbar

Erläuterung: IMS = Ion mobility spectrometry; LAS = Laser absorption spectroscopy; LoD = Limit of detection

Für diese Zwecke werden je nach Fragestellung spezielle Kanister, Atemgasbeutel, gasdichte Spritzen oder, wenn die selektive Anreicherung einzelner Substanzen bzw. Substanzgruppen angestrebt wird, auch beschichtete Röhrchen (needle-trap) verwendet (Buszewski et al., 2007; Miekisch et al., 2004). Weitere Bedingungen für aussagekräftige Analysen sind eine kontrollierte alveoläre Probennahme sowie definierte Transport- bzw. Lagerbedingungen der Probenbehälter, um die Zusammensetzung der Probe nicht zu beeinflussen.
Die alveolare Konzentration der VOC wird von Atemmuster, Ventilations-Perfusions-Verhältnis, Blutzusammensetzung, biochemischen Eigenschaften der VOC selbst und anderen, noch unbekannten Faktoren beeinflusst. Dennoch werden Atemgasanalysen zunehmend als Erweiterung oder Ergänzung zu "klassischen"

biochemischen Analysen angesehen. So wurden Aceton, aber auch andere Ketone im Atemgas zwar als metabolische Marker in Zusammenhang mit Diabetes bzw. diabetischer Ketose beschrieben (Minh et al., 2011; Wang et al., 2010; Greiter et al., 2010; Smith et al., 2011; Qiao et al., 2014; Tanda et al., 2014), aber die Ergebnisse der Atemgasanalyse bei Diabetes-Patienten sind uneinheitlich (Minh et al., 2012; Smith et al., 2011). Dies ist sowohl auf Unterschiede im Design der Studien als auch auf unterschiedliche Analyseverfahren zurückzuführen.

2 Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, frühe metabolische Veränderungen bei Kindern mit Diabetes mellitus Typ 1 zu erfassen. Diabetes mellitus ist die häufigste Stoffwechselstörung des Menschen und betrifft in zunehmendem Maße junge Kinder, die – in Abhängigkeit der glycämischen Variabilität – in unterschiedlichem Ausmaß mit behindernden und schließlich potentiell tödlichen Langzeitfolgen leben müssen. Blutzuckerschwankungen und metabolische Störungen gelten als wichtige Risikofaktoren für die Entwicklung diabetischer Folgeerkrankungen. Während die aktuelle Beurteilung der metabolischen Situation auf Untersuchungen in Blut und teilweise Urin beruhen, bietet die Atemgasanalyse die Möglichkeit, metabolische Anpassungsreaktionen zu monitoren. Darüber hinaus steht mit dem Atemgas ein leicht zugängliches, noninvasiv und schmerzfrei zu gewinnendes Medium zur Verfügung, welches daher insbesondere für Untersuchungen im Kindesalter attraktiv ist.

Moderne Analyseverfahren können in Echtzeit und mit hoher Auflösung niedrigste Konzentrationen volatiler Substanzen detektieren und identifizieren. In dieser Fallkontroll-Studie wurde das mithilfe der Protonen-Transfer-Reaktion Massenspektroskopie ermittelte Atemgasprofil von Kindern mit Typ 1 Diabetes mellitus und gesunden Kontrollen verglichen und auf Zusammenhänge zum Krankheitsverlauf untersucht.

Im Einzelnen sollte anhand der Studie geklärt werden:

- Eignet sich das Verfahren der PTR-ToF-MS als noninvasive Messmethode zum Einsatz bei Kindern und Jugendlichen?
- Lassen sich Unterschiede in den Atemgasprofilen Diabetes-kranker Kinder und gesunder Kontrollen erfassen?
- Unterscheiden sich die Atemgasprofile in Relation zur Art der Insulinapplikation (kontinuierliche subcutane Insulin-Infusion (Pumpe) vs. tägliche multiple Insulineinzelinjektionen)?
- Bestehen Zusammenhänge zwischen bestimmten Atemgasparametern und metabolischer Stoffwechsellage, körperlicher Konstitution und Krankheitsverlauf?

3 Material und Methoden

Die dieser Studie zugrunde liegenden Daten wurden in Kooperation zwischen der AG RoMBAT (Rostock Medical Breath Research Analytics and Technologies) der Klinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie und der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Universitätsmedizin Rostock im Zeitraum von November 2012 bis Januar 2014 erhoben und für die Auswertung zur Verfügung gestellt.

3.1 Patientenkollektiv

Die Fall-Kontroll-Studie wurde der Ethikkommission der Universität Rostock (Geschäftszeichen A 2012-0103) angezeigt. Alle Probanden und ihre Eltern wurden ausführlich über die Studie und ihre Ziele informiert und stimmten der Teilnahme schriftlich zu. Alle Probanden erhielten als Aufwandsentschädigung für die Teilnahme an der Studie einen Büchergutschein im Wert von 15 Euro.
Die Patienten wurden in der Endokrinologischen Ambulanz der Kinder- und Jugendklinik der UMR rekrutiert. Gesunde Geschwister, Freunde der Patienten sowie Kinder von Angehörigen der UMR wurden als gesunde Kontrollen zur Teilnahme eingeladen. Die Ein- und Ausschlusskriterien sind wie folgt festgelegt:

Einschlusskriterien:
- Alter 6 – 18 Jahre
- Diabetes mellitus Typ 1
- Insulintherapie (MDI oder CSII)
- Erkrankungsdauer > 6 Monate

Ausschlusskriterien:
- Akute oder chronisch entzündliche Erkrankung
- Hepatitis, HIV oder andere chronisch infektiöse Erkrankung
- Tumorerkrankung in den letzten 5 Jahren
- Leber- oder Herzinsuffizienz
- Angeborene Störung des Stoffwechsels
- Schwangerschaft
- Eingeschränkte Einsichtsfähigkeit

3.2 Studiendesign

Die Patienten nahmen im Rahmen der regulären Vorstellung in der Ambulanz an den Studienuntersuchungen teil. Die Analyse der volatilen Substanzen in der Ausatemluft erfolgte im Anschluss an den Termin der endokrinologischen Ambulanz, bei gesunden Probanden nach individueller Absprache. Während der Routineuntersuchungen wurden Laboruntersuchungen durchgeführt und die Befunde für diese Studie aus der Akte übernommen. Bei gesunden Kontrollen erfolgte keine Blutuntersuchung. Für alle Probanden wurden grundlegende Daten (Komorbiditäten, Ernährungsgewohnheiten, Erkrankungsdauer, Insulintherapie, Insulinmenge) und anthropometrische Parameter ermittelt.

3.3 Methoden

3.3.1 Anamnese und Erhebung der biometrischen Daten

Die Probanden wurden offen zu Erkrankungen, Ernährungsgewohnheiten, Freizeitaktivitäten, Rauchgewohnheiten und Medikamenteneinnahme befragt. Bei Patienten wurde das Datum der Manifestation (mindestens Monat und Jahr) und damit die Erkrankungsdauer sowie die Insulintherapie (MDI vs. CSII) und die aktuelle Insulin-Tagesdosis dokumentiert.
Im Rahmen der klinischen Untersuchung wurden Blutdruck, Körperlänge und -Gewicht einschließlich BMI ermittelt und zur besseren Vergleichbarkeit auf Grundlage der Daten von Kromeyer-Hauschild (Kromeyer-Hauschild, 2001) bzw. KiGGS-Datensätzen (Robert Koch Institut, 2013) in Standard Deviation Scores (z-scores) umgerechnet.
Die Körperzusammensetzung wurde mit dem Body Composition Monitor (Fresenius medical care, Bad Homburg) bestimmt und ist als FTI (fat tissue index) und LTI (lean tissue index) angegeben.

3.3.2 Laboruntersuchungen

Die routinemäßigen Laboruntersuchungen im Zentrallabor der Universitätsmedizin Rostock umfassten die quantitative Bestimmung von HbA_{1c}, Glucose, Gesamtcholesterin, HDL, LDL, Triglyceride, Kreatinin und Harnstoff im Serum und die von Albumin im Urin.

3.3.3 Atemgasanalytik

3.3.3.1 Allgemeine Durchführung

Die Atemgasanalyse erfolgte mit einem Protonen-Transfer-Reaction-Time of Flight- Massenspektrometer (PTR-ToF-MS) 8000 (Ionicon Analytik GmbH, Innsbruck, Österreich), das ein Detektionslimit im unteren pptV-Bereich und ein stabiles Massenauflösungsvermögen von 5000m/Δm bei einer Zeitauflösung von durchschnittlich 100ms ermöglicht.
Nach Ionisierung durch Protonen-Transfer wurden die VOC anhand des Masse zu Ladungsverhältnisses im ToF-Massenspektrometer detektiert. Aus der Intensität der gemessenen Signale (counts per second (cps)) wurden die Konzentrationen durch Kalibration errechnet und in parts per billion by volume (ppbV) angegeben.

3.3.3.2 Ablauf der Studienuntersuchung

Alle Messungen wurden in einem geschlossenem, klimatisierten Raum bei Raumtemperatur durchgeführt. Während der Datenerfassung wurden dem Probanden kurze Videosequenzen zur Ablenkung und Entspannung angeboten, um eine physiologische Atmung zu gewährleisten und Hypo- bzw. Hyperventilation zu vermeiden.
Der sitzende Proband wurde gebeten, ruhig durch ein mit dem PTR-ToF-MS verbundenes, sterilisiertes Mehrweg-Mundstück ein- und auszuatmen. War dem Kind eine reine Mundatmung nicht spontan möglich, konnte eine Nasenklammer benutzt werden (Abb. 4).
Der Atemfluss wurde in In- und Exspiration über fünf Minuten kontinuierlich gemessen und in Form einer Fluss-Volumen-Kurve vom zugehörigen Software-Programm (TofDaq Viewer, Tofwerk, Thun, Schweiz) dargestellt.
Das Atemgas wurde bei einem Probendurchsatz von 20ml/min über eine auf 75°C beheizte Silcosteel-Leitung (ID 0,75mm, Restek, Bellafonte, USA), die über eine T-Verbindung an das Mundstück angeschlossen war, zum Massenspektrometer tranferiert. Die Ionen-Quelle wurde bei einer Stromstärke von 4-5 mA und einem Wasserfluss von 6-7 ml/min gehalten. An der Drift-Tube lag eine Spannung von 610 V bei einem Druck von 2,3 mbar an, so dass ein E/N von durchschnittlich 138 Td erzeugt wurde (E = electric field strength, N = gas number density, 1Td = 10^{-17} Vcm^2).

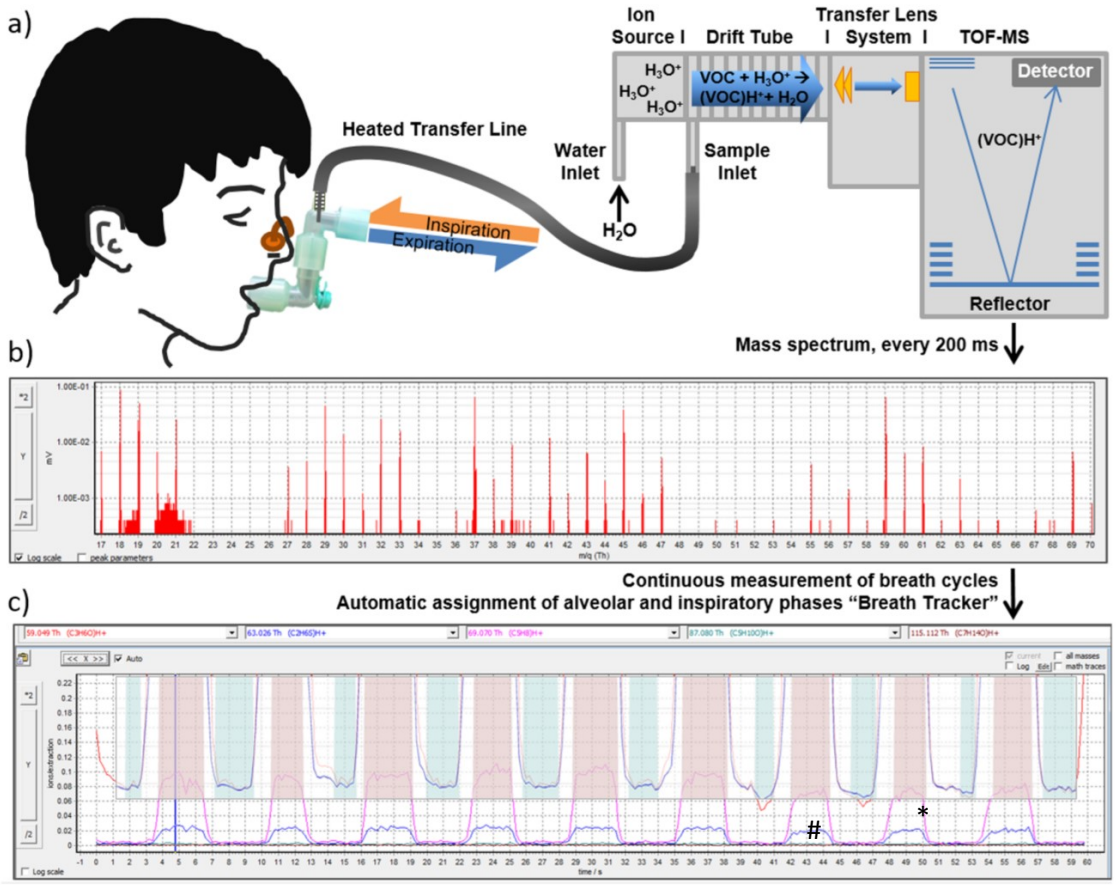

Abb. 4: Schematische Darstellung der Atemgasanalyse und PTR-ToF-MS. *a) Der Proband atmet regelmäßig über das Mundstück ein und aus und ein Aliquot der Atemluft wird über die Transferline in die Drift Tube geleitet, wo es zur weichen Oxidierung kommt. b) Detektion eines Massenspektrums alle 200ms. c) Kontinuierliche Messung des Atemzyklus, Separation der Atemphasen durch den Breathtracker (Aceton: rote Kurve) in alveolare Phase (rote Flächen) und Inhalation (blaue Flächen). Exemplarische Darstellung der Atemgaskurven für Isopren (*, pinke Kurve) und DMS (#, blaue Kurve) (Obermeier et al., 2017).*

3.3.3.3 Kalibrierung und Testvoraussetzungen

Obwohl das Verfahren der PTR-TOF-MS als pseudo-absolute Methode auch ohne Kalibration zur direkten Berechnung von Substanzkonzentrationen eingesetzt werden kann, wurden für die Kalibration relevanter VOC Liquid calibration units (LCU, Ionicon Analytic GmbH, Innsbruck, Österreich) eingesetzt, um die Wasserdampfs-Sättigung des Atemgases zu berücksichtigen.

Die Messung erfolgte kontinuierlich und in Echtzeit, die Konzentrationen der VOC wurden in der alveolären Exspirations-Phase erfasst. Um eine sichere Zuordnung zur alveolären Phase zu gewährleisten, wurde Aceton als Tracker-Substanz verwendet, da es in der Exspiration in deutlich höherer Konzentration als in der Inspiration vorliegt. Für die automatische Phasenseparierung wurde ein programmierter Algorithmus ("breath tracker", Matlab version 7.12.0.635, R2011a) (Trefz et al., 2013);(Sukul et al., 2016) eingesetzt.
Die Aufarbeitung der Atemgasprofile (Separation von Inspiration und Exspiration, Eliminierung von Kontaminationen etc.) erfolgte ebenso wie die Aufzeichnung der Atemgasprofile durch die AG Atemgasanalyse.

3.3.4 Statistik und grafische Darstellung

Die Speicherung der Daten erfolgte in einer Excel-Tabelle. Die statistischen Berechnungen wurden mit dem Softwareprogramm SPSS Version 23.0 (IBM, Chicago, USA) durchgeführt, die graphischen Darstellungen sind mit Hilfe von Sigma-Plot Version 12.5 (Systat Software, San Jose, USA) angefertigt worden.
Die Daten wurden mit dem Kolmogorov Smirnow Test zunächst auf Normalverteilung untersucht und die Ergebnisse sind in Abhängigkeit vom Testergebnis als Mittelwert ± Standardabweichung oder Median und Range angegeben. Der Gruppenvergleich bei nicht normalverteilten Daten wurde mit dem Mann-Whitney-U Test durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde auf $p \leq 0,05$ festgelegt. Anschließende Korrelationsanalysen erfolgten mit dem Spearman-Rank-Test für nicht normal verteilte Daten.

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung des Probandenkollektives

Im Rahmen dieser Studie wurden Atemgasanalysen bei 56 Patienten und 60 Kontrollen im Alter zwischen 6 und 18 Jahren durchgeführt. Die Daten von sechs Patienten wurden von der Auswertung ausgeschlossen, da die Dokumentation der klinischen Daten unvollständig (n=3) oder sich retrospektiv herausstellte, dass die Einschlusskriterien verletzt waren (n=3). Die anthropometrischen Charakteristika der Probanden sowie die klinischen Daten der in die Auswertung aufgenommenen Patienten zum Zeitpunkt der Untersuchung sind in Tab. 2 wiedergegeben. Patienten waren signifikant jünger und auch bei Verwendung altersnormierter Körpergrößen deutlich kleiner als die gesunden Probanden während der altersnormierte mediane systolische und diastolische Blutdruck signifikant höher ist. Die Insulinapplikation erfolgte bei 21 Patienten (9f/12m) als intensivierte konventionelle Insulintherapie mit mehrmaliger täglicher Insulinapplikationen (MDI). Die übrigen Patienten (11f/18m) waren mit einer Insulinpumpe versorgt. Die Qualität der langfristigen Stoffwechselkontrolle war bei 22 Patienten zufriedenstellend (HbA_{1c} < 8%).

4.2 Ergebnisse der Atemgasanalyse

4.2.1 Vergleich zwischen Patienten und Kontrollen

Von mehr als 300 im Atemgas gemessenen VOC wurden die individuellen Konzentrationen von 33 Substanzen der Ausatemphase zwischen T1DM Patienten und Kontrollen verglichen und in einer Heatmap visualisiert (Abb. 5). Auf der Basis dieser Darstellung wurde der Fokus zunächst auf sieben Substanzen gerichtet. Diese sind im Zusammenhang mit metabolischen Prozessen bereits in verschiedenen Studien untersucht worden (Ethanol, m/z = 47,049; Aceton, m/z = 59,049; Isopropanol, m/z = 61,064; Dimethylsulfid, m/z = 63,026; Isopren, m/z = 69,069; Pentanal, m/z = 87,08 und Limonen, m/z = 137,132). Die Konzentration von Aceton in der Atemluft der Patienten war nur geringfügig höher als bei Kontrollen und auch die alveolären Konzentrationen von Limonen waren bei Patienten und Kontrollen ähnlich (Tab. 3). Die übrigen Substanzen wurden von den Patienten in deutlich höheren Konzentrationen ausgeatmet, als dies bei den Kontrollen der Fall war (Tab. 4; Abb. 6).

Tab. 2: Anthropometrische und klinische Charakteristika der Patienten und Kontrollen

	Patienten (20w/30m)	Kontrollen (32w / 28m)	p
Alter [J]	12,6 (6,25 - 18,3)	14,0; (7,25 - 18,2)	0,027
Körperlänge [SDS]	0,10 (-2,0 - 1,75)	0,60 (-1,35 - 2,93)	0,005
Körpergewicht [SDS]	0,16 (-1,41 - 1,99)	0,35 (-1,98 - 2,20)	0,513
BMI [SDS]	0,33 (-1,54 - 1,92)	0,17 (-1,95 - 1,96)	0,061
Blutdruck			
RR_{sys} [SDS]	1,81 (-0,54 - 4,32)	1,14 (-1,42 - 3,35)	0,004
RR_{dias} [SD]S	1,28 (-1,58 - 3,52)	0,03 (-2,37 - 4,17)	≤ 0,001
Erkrankungsdauer [J]	4,17 (0,58 - 15,25)		
Glucose [mmol/l]	10,55 (2,14 - 20,8)		
HbA_{1c} [%]			
bei Untersuchung	8,50 (6,30 - 13,0)		
Durchschnitt der letzten 12 Monate	8,48 (6,14 - 13,0)		
Cholesterin [mmol/l]	4,35 (2,80 - 7,20)		
LDL-Chol [mmol/l]	2,38 (0,71 - 4,77)		
HDL-Chol [mmol/l]	1,65 (1,04 - 2,60)		
Triglyceride	0,81 (024 - 6,24)		
Insulindosis [IE/kg*d]	0,37 (0,19 - 1,05)		

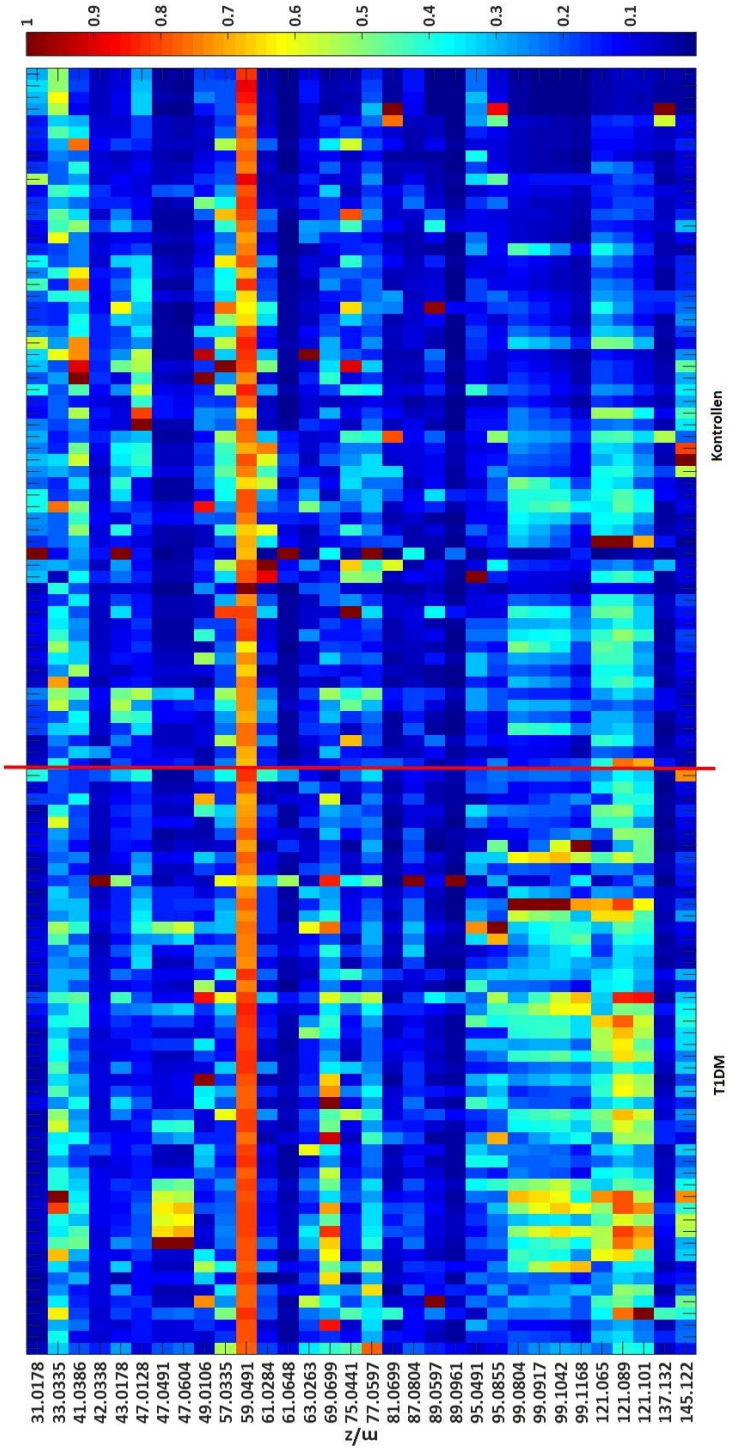

Abb.5 Heat-Map zum Vergleich der VOC zwischen Patienten mit T1DM und gesunden Kontrollen. *Darstellung von 32 verschiedenen Massenspuren zwischen 31 und 145m/z einschließlich der näher untersuchten VOC (Ethanol m/z = 47,049; Aceton, m/z = 59,049; Isopropanol, m/z = 61,064; Dimethylsulfid, m/z = 63,026; Isopren, m/z = 69,069; Pentanal, m/z = 87,08 und Limonen, m/z = 137,132). Hohe Konzentrationen werden in roter Farbe, niedrige Konzentrationen in blauer Farbe wiedergegeben.*

Tab. 3: Konzentration von Aceton und Limonen in der ausgeatmeten Luft von Patienten und Kontrollen

	Kontrollen (n = 60)	**Patienten (n = 50)**
Aceton [ppbV]	232 (186 - 306)	238 (204 - 255)
Limonen [ppbV]	51,8 (4,81 - 1.192)	67,9 (13,9 - 513)

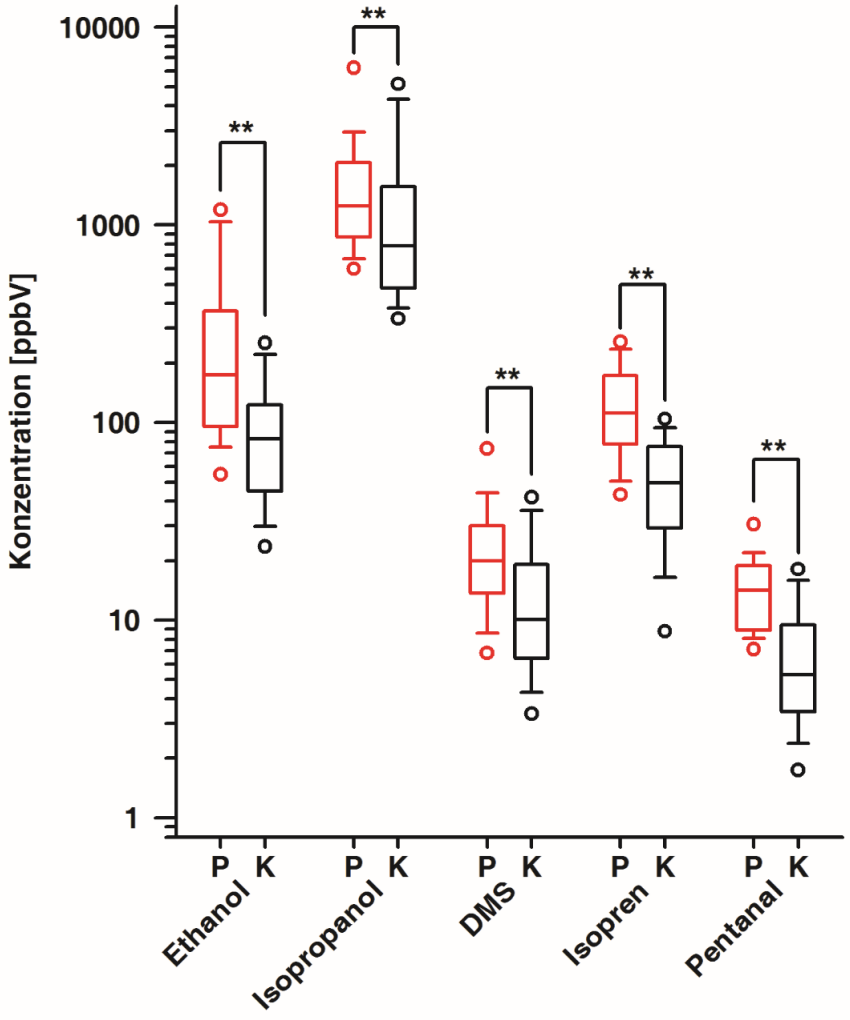

Abb. 6: Exhalation von Ethanol, Isopropanol, DMS, Isopren und Pentanal bei Patienten (P) und Kontrollen (K).

*Darstellung des Median mit 5.-und 95. Percentile, ** p< 0.001*

Für weitere Analysen wurden die Patienten entweder hinsichtlich der Art der Insulintherapie (MDII vs. CSII; 21 vs. 29 Patienten), der Qualität der langfristigen Stoffwechselkontrolle (der über die letzten 12 Monate vor Untersuchung gemittelte HbA_{1c}-Spiegel größer oder kleiner als 8%; 22 vs. 28 Patienten) oder der Dauer der Erkrankung (weniger oder länger als 5 Jahre; 30 vs. 20 Patienten), kategorisiert. In allen Fällen waren die Subgruppen hinsichtlich der klinischen und anthropometrischen Charakteristika ähnlich.

Tab. 4: Konzentration der exhalierten VOC bei gesunden Kontrollen und bei T1DM-Patienten in Relation zur Art der Insulinapplikation (MDI , CSII)

	Kontrollen	**MDI**	**CSII**
	(n=60)	(n = 21)	(n = 29)
Aceton [ppbV]	232	237	239
	(186 - 305)	(204 – 252)	(211 – 255)
Ethanol [ppbV]	82,4$^{*, \#}$	164$^{\#}$	221*
	(20,7 - 554)	(45 – 946)	(48,7 – 1856)
DMS [ppbV]	10,0$^{*, \#}$	19,5$^{\#}$	20,4*
	(1,00 - 151)	(6,70 – 77,2)	(6,49 – 65,8)
Isopren [ppbV]	49,6$^{*, \#}$	99,6$^{\#}$	119*
	(7,44 - 152)	(8,367 – 245)	(45,4 – 291)
Isopropanol [ppbV]	784$^{\#}$	1185$^{\#}$	1394
	(287 - 28.962)	(733,0 – 15011)	(480,8 – 4778)
Limonen [ppbV]	51,8	53,3	76,2
	(4,81 - 1.192)	(14,8 – 124)*	(13,9 – 513)*
Pentanal [ppbV]	5,30$^{*, \#}$	14,8$^{\#}$	13,6*
	(1,36 - 36,9)	(7,45 – 101)	(6,11 – 22,5)

$^{\#}$ MDI vs Kontrolle; jeweils p<0,0001 (Korrektur nach Bonferoni)

* CSII vs Kontrolle; jeweils p<0,0001 (Korrektur nach Bonferoni)

In der exhalierten Luft der Patienten mit CSII ließen sich tendenziell höhere Konzentrationen von Limonen nachweisen. Dieser Unterschied ist allerdings bei Korrektur des Signifikanzniveaus nach Bonferoni nicht mehr signifikant.
Mit Ausnahme von Limonen sind die Konzentrationen der VOC bei Patienten mit MDI und CSII vergleichbar. Sie werden weder durch die Güte der langfristigen Stoffwechselkontrolle noch durch die Erkrankungsdauer beeinflusst (Abb. 7 und 8).

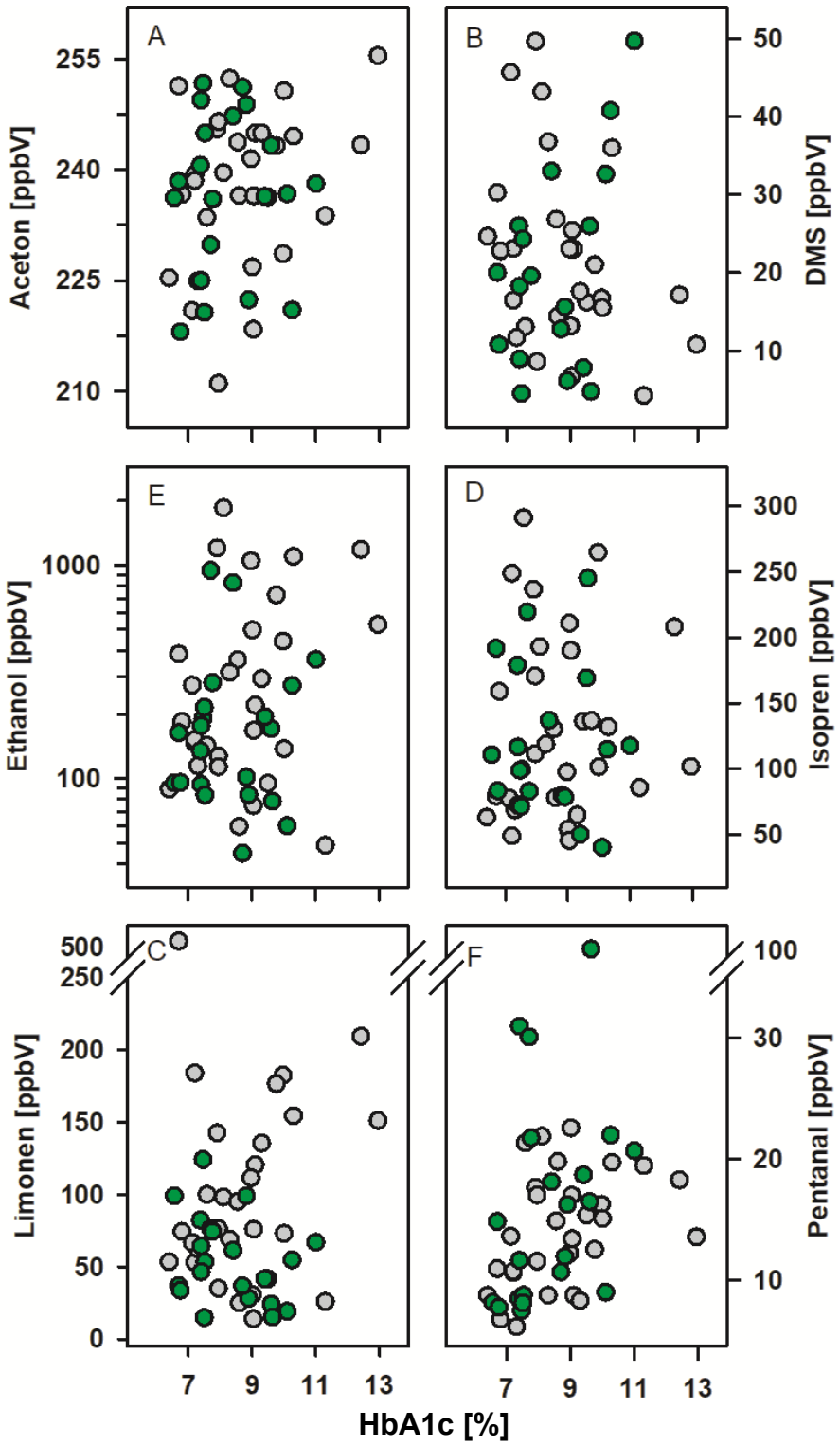

Abb. 7: Konzentration ausgewählter VOC in Abhängigkeit von der über 12 Monate gemittelten HbA_{1c} Konzentration im Blut.

Zwischen der Konzentration der VOC und mittlerem HbA_{1c} besteht kein Zusammenhang. CSII Therapie grau, MDI Therapie grün

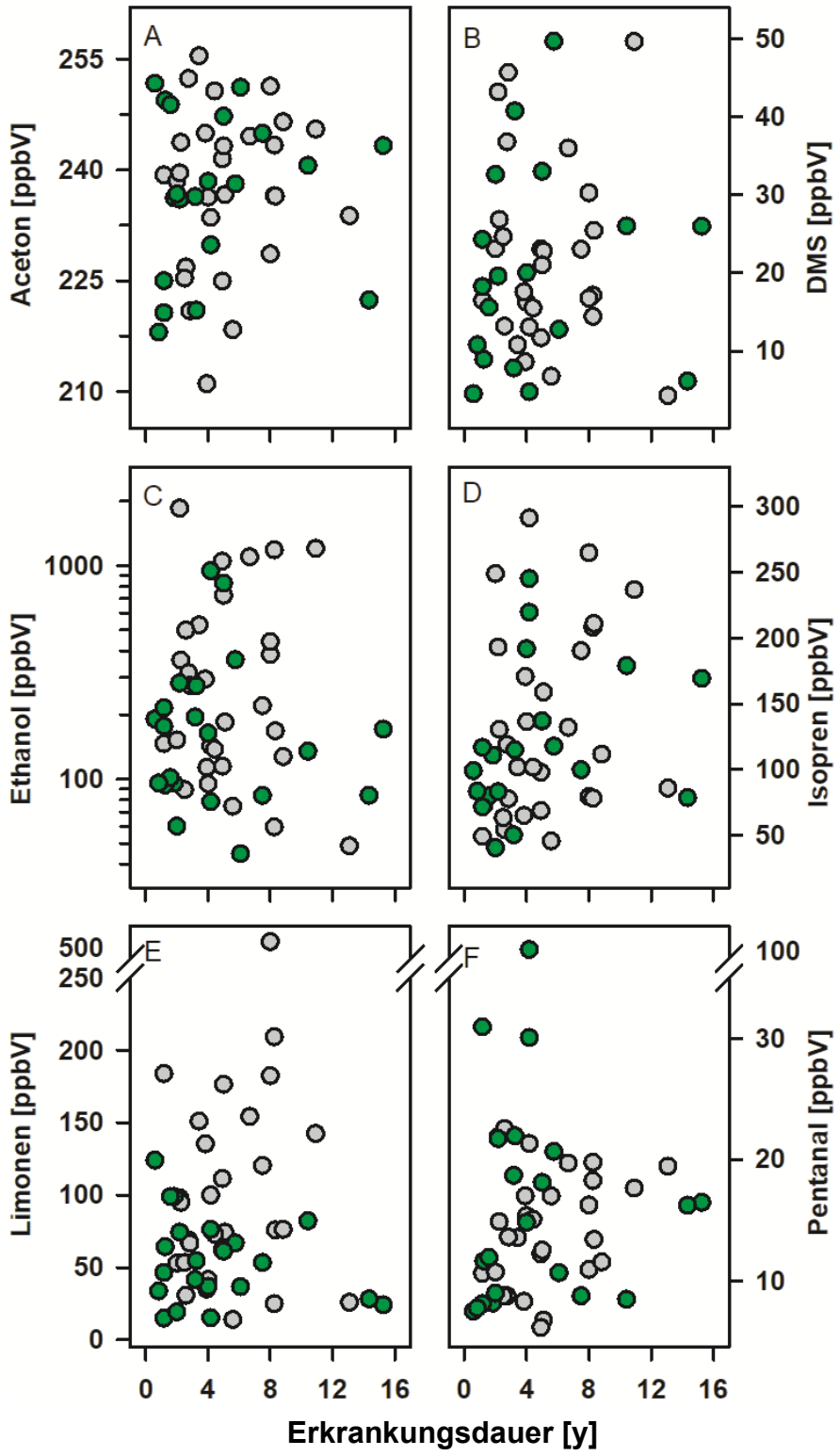

Abb. 8: Konzentration ausgewählter VOC in Abhängigkeit von der Erkrankungsdauer.

CSII Therapie grau, MDI grün.

4.2.2 Zusammenhänge zwischen anthropometrischen Daten und der Konzentration der VOCs

Mit zunehmendem Alter nimmt die Konzentration von Isopren in der Ausatemluft geringfügig zu, eine Korrelationen zum Körpergewicht, zur Körperlänge oder zum BMI besteht in den untersuchten Gruppen jedoch nicht. Der Zusammenhang war in der Gruppe der Kontrollen etwas stärker ausgeprägt als bei den Patienten (Abb. 9). Für die anderen VOCs konnte ein derartiger Zusammenhang nicht nachgewiesen werden.

4.2.3 Zusammenhänge zwischen Erkrankungsdauer, HbA_{1c}, Blutfetten und VOCs

Die Erkrankungsdauer korrelierte unabhängig von der Art der Insulinapplikation nicht mit den Konzentrationen der VOC. Wie erwartet, besteht zwischen dem HbA_{1c} -Spiegel und der Cholesterin- bzw. Triglyceridkonzentration eine mäßig ausgeprägte Assoziation ($r = 0,58$ bzw. $r = 0,57$, jeweils $p < 0,001$).
In der Gruppe der Patienten mit einer CSII ist die Erkrankungsdauer mit *i)* der relativen Insulinmenge ($r = 0,432$ $p = 0,019$), *ii)* dem Cholesterinspiegel ($r = 0,378$, $p = 0,043$), und *iii)* der Konzentration der Triglyceride ($r = 0,451$, $p = 0,014$) jeweils schwach assoziiert. Darüber hinaus ist Isopropanol mit dem HbA_{1c} bzw. Cholesterin-Spiegel assoziiert (Abb. 10).

4.2.4 Zusammenhänge zwischen der Konzentration der VOCs

Die Korrelationsanalyse zwischen den einzelnen VOC zeigt in der Gruppe der Patienten für Aceton - Limonen, Ethanol - Limonen und Isopropanol - Pentanal Assoziationen (vgl. Abb. 12). Diese sind jeweils für die Therapieform CSII mit $r = 0,58$ für Aceton - Limonen, $r = 0,7$ für Ethanol - Limonen und $r = 0,73$ für Pentanal - Isopropanol etwas stärker ausgeprägt. In der Gruppe der Kontrollen konnten keine relevanten Korrelationen zwischen verschiedenen VOC nachgewiesen werden.

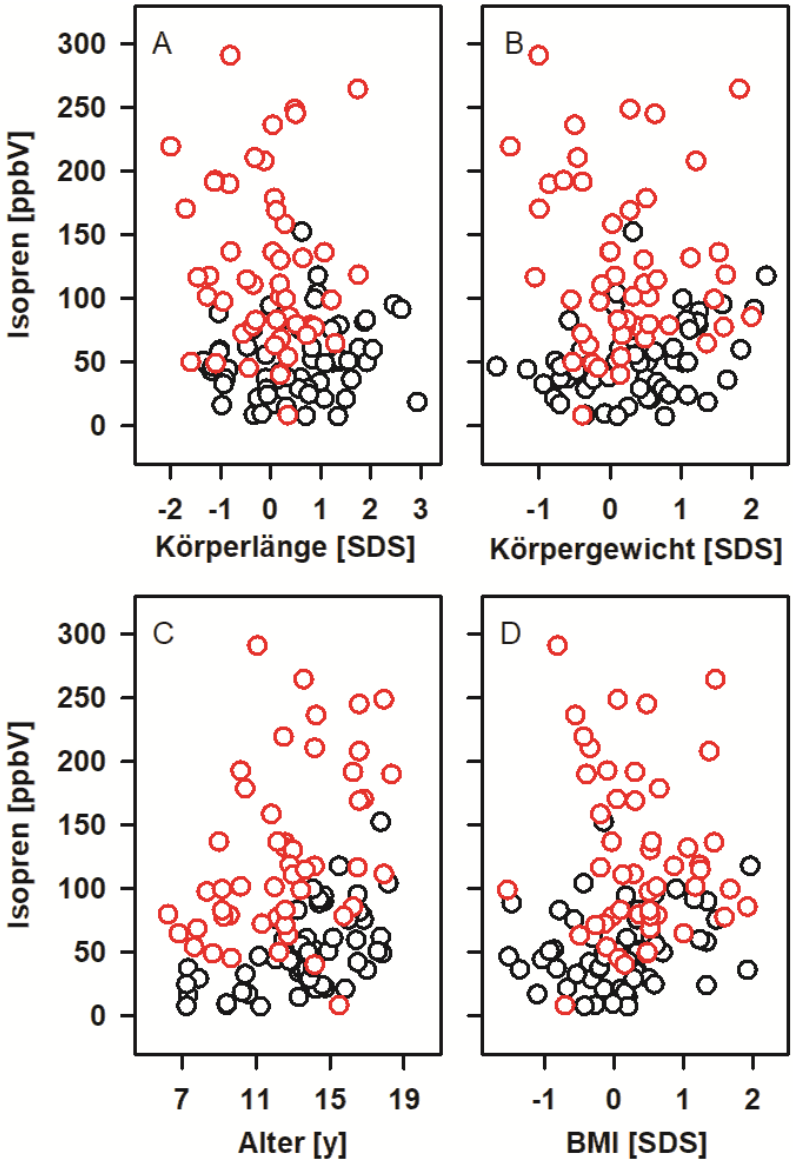

Abb. 9: Isopren als Funktion von Länge (A), Gewicht (B), Alter (C) und BMI (D).

Zwischen Isopren und Alter (C) ist für Patienten ($r = 0,43$, $p < 0,005$) und Kontrollen ($r = 0,58$, $p < 0,001$) eine schwache Korrelation vorhanden.

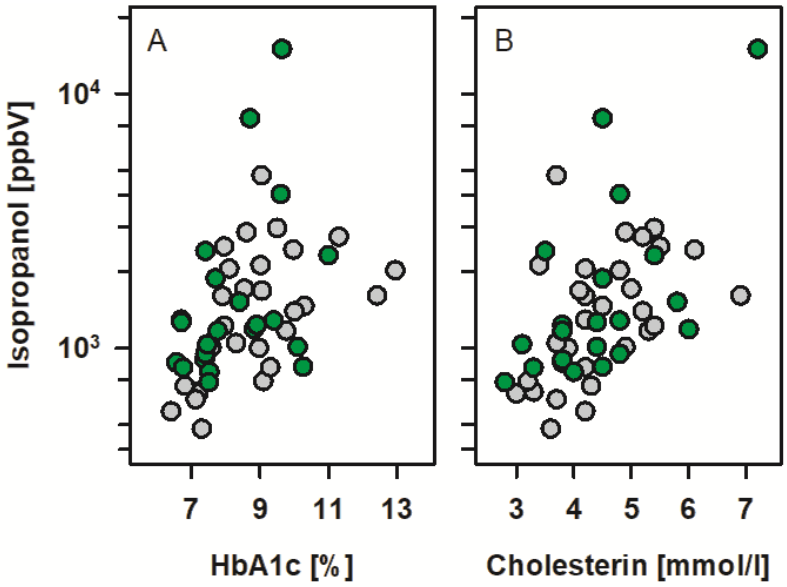

Abb. 10: Assoziation zwischen Isopropanol und dem mittleren HbA_{1c}-Spiegel bzw. Gesamt-Cholesterin. *Isopropanol und HbA1c (A, r = 0,53, p < 0,001) bzw. Cholesterin (B, r = 0,54, p < 0,001).*

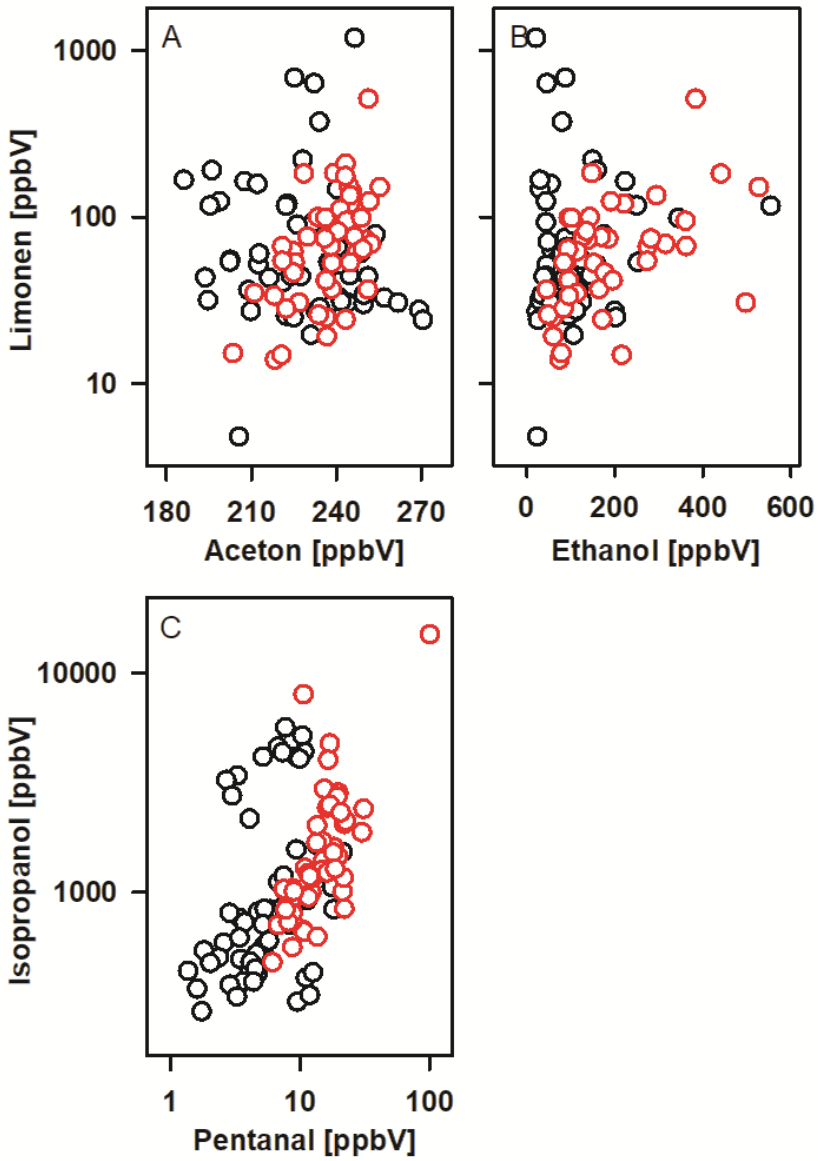

Abb. 11: Assoziation zwischen einzelnen VOC im Vergleich zwischen Patienten (rot) und Kontrollen (schwarz).

(A) Aceton und Limonen: Patienten r = 0,52, p < 0,001; (B) Ethanol und Limonen: Patienten r = 0,62, p < 0,001; (C) Pentanal und Isopropanol: Patienten r = 0,67, p < 0,001.

5 Diskussion

Als häufigste Stoffwechselerkrankung im Kindesalter bedroht der Diabetes mellitus Lebensqualität und Lebenszeit der Betroffenen. Auftreten und Ausmaß der Langzeitfolgen hängen insbesondere von der Güte der Stoffwechselhomöostase ab, so dass die frühzeitige Erfassung relevanter Stoffwechselparameter und Einschätzung der metabolischen Situation entscheidend zur Begrenzung späterer Schäden beiträgt (Trefz et al., 2019).

Die Analyse abgeatmeter flüchtiger organischer Verbindungen ist ein relativ neuer Ansatz und kann auf veränderte Stoffwechselprozesse hinweisen. Dieser Ansatz ist insbesondere im Kindesalter aufgrund der noninvasiven und damit für den Untersuchten risikofreien Probengewinnung attraktiv.

Anhand der hier dargestellten Fallkontrollstudie wurden erstmals bei Kindern und Jugendlichen mit einem Diabetes mellitus Typ 1 Echtzeit-Atemgasanalysen mit PTR-ToF-MS durchgeführt. Von mehr als 300 im Atemgas gemessenen VOC wurde der weitere Fokus auf sieben Substanzen gelegt, die in vorausgehenden Studien Zusammenhänge mit metabolischen Erkrankungen gezeigt hatten (Righettoni et al., 2013; Turner et al., 2009; Novak et al., 2007; Smith et al., 2011; Blaikie et al., 2014; O'Hara et al., 2016; Fernandez del Rio et al., 2015; Galassetti et al., 2005; Li et al., 2017; Salerno-Kennedy et al., 2005). Bei sechs von diesen sieben VOC konnten signifikant höhere Atemgaskonzentrationen im Vergleich zu Gesunden nachgewiesen werden (Aceton, DMS, Ethanol, Isopren, Isopropanol, Pentanal). Dieser Effekt war insbesondere bei schlechterer Stoffwechsellage bei Patienten mit einem HbA_{1c} > 8% vorhanden. Aceton wurde von der Gruppe der Patienten in nur geringfügig höherer Konzentration als von den Kontrollen abgeatmet. Hinsichtlich der Insulintherapie (MDI vs. CSII) konnten keine signifikanten Unterschiede in den Atemgasprofilen nachgewiesen werden.

Diabetestypische Charakteristika wie Erkrankungsdauer, die auf das Körpergewicht normierte Gesamt-Insulindosis oder der aktuelle Blutzucker hatten keinen Einfluss auf die untersuchten VOC. Allerdings konnten zwischen den Parametern des Fettstoffwechsels und Isopropanol, Isopren sowie Pentanal Assoziationen nachgewiesen werden.

In Abhängigkeit vom Alter, jedoch nicht von Körpergewicht, Körperlänge und BMI, fanden sich lediglich für Isopren höhere Atemgaskonzentrationen. Dieser Effekt war in der Gruppe der Patienten geringfügig stärker ausgeprägt.

Zwischen den einzelnen VOC fanden sich schwache Korrelationen zwischen Pentanal und Isopropranol, zwischen Aceton und Limonen sowie zwischen Ethanol und Limonen.

5.1 Probandenkollektiv

Zwei Drittel der Patienten in unserer Stichprobe wiesen entgegen der Empfehlungen der Deutschen Diabetes-Gesellschaft einen durchschnittlichen HbA_{1c}-Wert von mehr als 7,5% auf und sind mit Werten bis 13% noch nicht optimal eingestellt. Die schlechteren HbA_{1c}-Werte der Studiengruppe könnten durch geringere Adhärenz bei überwiegend pubertären Alter der Probanden, Angst vor Unterzuckerungen oder ein Informationsdefizit bedingt sein und weisen auf weiteren Schulungsbedarf hin.

Gleichzeitig setzen die Patienten verhältnismäßig niedrige Insulindosen von median 0,37IE/kg/d ein, so dass zwar das Risiko von Unterzuckerungen geringer ist, aber höhere unmittelbare und langfristige Blutzucker toleriert werden. In Abhängigkeit von individuellen somatischen Gegebenheiten und Umfeldfaktoren werden in der Regel 0,6U/kg/KG/d Insulin benötigt (Bjerg et al., 2019). Menge und Häufigkeit der Insulinboli wurden in dieser Studie nicht berücksichtigt. Während hormoneller Umstellung z.B. in der Pubertät kann der Insulinbedarf auf 1,5IE/kg/KG steigen (Hürter et al., 2005), auch Pubertätsstadien und hormonelle Einflüsse fanden in dieser Studie keine explizite Berücksichtigung. Diese Faktoren sollten in Folgestudien allerdings berücksichtigt werden.

Risikofaktoren für Langzeitkomplikationen wie die Erkrankungsdauer (median 4,17 Jahren, Range 0,58 - 15,25) und eine Dyslipidämie haben in der hier untersuchten Gruppe noch ein geringes Gewicht. Die Blutfettwerte bewegen sich überwiegend innerhalb altersentsprechender Normwerte während im Allgemeinen Typ 1 Diabetiker meist bereits in der Adoleszenz, insbesondere Mädchen und während der Pubertät, erhöhte Triglyceride und LDL bei niedrigem HDL aufweisen (Homma et al., 2015).

Ein Teil der Probanden unterlief parallel zu den hier behandelten Atemgasanalysen ausführliche opthalmologische Untersuchungen, und bei einigen der Patienten waren erste Alterationen der retinalen Nervenfaserschichten nachweisbar (Prakasam et al., 2019). Da diese Untersuchungen aber nicht bei allen Patienten erfolgten, kann keine Aussage über mikro- oder makroangiopathische Veränderungen getroffen werden und die Auswertung beschränkt sich auf den Vergleich der VOC-Konzentrationen zwischen Patienten und Kontrollen.

5.2 Interpretation der Befunde der Atemgasanalyse

Zur Interpretation der VOC Daten ist eine direkte Zuordnung der einzelnen Substanzen zu einem Ursprungsort oder -gewebe wünschenswert, ohne den Einsatz markierten Ausgangssubstanzen jedoch nicht realisierbar. In der Ausatemluft gemessene VOC werden vom Organismus direkt oder indirekt durch das individuelle Mikrobiom im Respirations- und Gastrointestinaltrakt produziert, gleiche Stoffwechselprodukte können daher aus unterschiedlichen Quellen stammen. VOC können entweder direkt im Blut aus metabolischen Prozessen hämatologischer Zellen oder durch chemische Interaktionen nonkorpuskulärer Blutbestandteile entstehen. VOC können aber auch mit dem Blut vom Ursprungsgewebe zu den Alveolen transportiert oder direkt in der Lunge gebildet werden und nach Übertritt in die Alveolen mit der Ausatemluft entweichen.

Die Konzentrationen der VOC im Atemgas liegen im picomolaren Bereich und erfordern damit sensitive Messmethoden (Wehinger et al., 2007). Daran müssen sowohl die Probengewinnung als auch die Verarbeitung angepasst sein, um valide Werte zu ermitteln.

Veränderungen der VOC-Profile im Atemgas sind für viele Erkrankungen unterschiedlicher Ätiologie nachgewiesen, unter anderem bei Herzinsuffizienz, Leber- und Lungenerkrankungen (Di Natale et al., 2003; Fens et al., 2009; Fens et al., 2011; Valera et al., 2012) Nierenversagen und Diabetes (Lebovitz, 1995). Die bisherigen Untersuchungen dienen vor allem der Differenzierung zwischen Erkrankten und Gesunden oder der Beschreibung von metabolischen Veränderungen. Allerdings sind Krankheitsnachweise mithilfe einzelner VOC als spezifischen Biomarkern bisher nicht gelungen (Sukul et al., 2016). In früheren Untersuchungen wurde von anderen Arbeitsgruppen gezeigt, dass Hyper- und Hypoglycämien anhand von Atemgasanalysen der VOC erkannt werden können (Dalton et al., 2004; Novak et al., 2007; Siegel et al., 2017). Unter den im nano- bis picomolaren Bereich vorkommenden flüchtigen Substanzen finden sich neben den häufigsten Komponenten Isopren, Aceton und Ethanol andere Alkohole sowie Alkane (Phillips et al., 1999; Dent et al., 2013,), die jedoch unspezifisch bei verschiedenen Erkrankungen erhöht sein können, so dass eine Kombination und Muster mehrerer VOC analog eines Breath-fingerprints (Lourenco et al., 2014) oder eine Kombination mit Vitalparametern erforderlich ist.

Bei pädiatrischen Patienten wurden Atemgasanalysen bisher bei pulmonalen, gastrointestinalen Erkrankungen sowie chronischen Nierenerkrankungen

untersucht (Robroeks et al., 2013; van de Kant et al., 2013; Smolinska et al., 2014; Eng et al., 2015; Buijck et al., 2016; Monasta et al., 2017; Obermeier et al., 2017).

Endogene und exogene Faktoren beeinflussen Konzentrationen der VOC in der Ausatemluft. Grundsätzlich sind die Konzentrationen exogener VOC in der Inspirationsphase höher als in der Exspirationsphase (Schubert et al., 2005; Spanel et al., 2013). Der Einsatz eines „Breath trackers“ (in der vorliegenden Studie Aceton) erlaubt die Unterscheidung zwischen exogenen und endogenen VOC. Günstige, körpernahe und damit aussagekräftige Ergebnisse erhält man durch Analyse der alveolären Fraktion (Di Francesco et al., 2008). Der alveolare Atemgasaustausch hängt von Ventilation, pulmonaler Perfusion und Blut-Luft Verteilungskoeffizienten ab (Anderson et al., 2003). Eine geschlossener Messablauf erleichtert die Aufrechterhaltung der physikalischen Messbedingungen (Gilchrist et al., 2012). Um den Einfluss physiologischer Parameter wie Blutdruck, Herzfrequenz, Atemfrequenz und davon abhängig Ventilation und Perfusion der Lunge in der vorliegenden Studie gering zu halten, wurden die Probanden angehalten, ruhig ein- und auszuatmen und konnten durch einen zeitgleich ausgestrahlten Film abgelenkt werden. Insbesondere für Isopren und Aceton konnten bisher Abhängigkeiten von Hämodynamik (King et al., 2011; Unterkofler et al., 2015) und Atemmanövern (Sukul et al., 2016) dargestellt werden (Schubert et al., 2012).

Eine der Messung vorausgehende Nahrungsaufnahme kann zu Veränderungen der VOC Profile (Filipiak et al., 2012; Fischer et al., 2015) oder auch für den Menschen wahrnehmbaren Geruchsveränderungen z.B. nach Verzehr von Zwiebel, Minze, Banane oder Kaffee führen. Dies fand in dieser Studie keine Berücksichtigung. Der Einfluss möglicherweise aus der Umgebungsluft aufgenommene VOC wie beispielsweise Alkohole aus Desinfektionsmittel-Aerosolen wurde durch standardisierte Untersuchungsabläufe in einem geschlossenen Raum reduziert.

Generell kann der Einfluss exogener und endogener Faktoren in Langzeitstudien besser beobachtet und differenziert werden (Beauchamp et al., 2013).

5.3 Betrachtungen zu den ausgewählten VOC

5.3.1 Limonen

Limonen wird nicht im menschlichen Körper gebildet, sondern als häufigstes in Pflanzen, insbesondere Zitrusfrüchten, vorkommendes Monoterpen über Nahrungsmittel aufgenommen. Es sorgt mit seinem charakteristischem Zitrusduft in vielen Raumerfrischern und Reinigungsprodukten für ein angenehmes Aroma und wird aus Holzmöbeln und –böden freigesetzt (Beauchamp, 2011). Im menschlichen Organismus wird Limonen durch die P450-Enzyme CYP2C9 und CYP2C19 metabolisiert (Miyazawa et al., 2002). Die bei Leberzirrhose eingeschränkte Enzymaktivität spiegelt sich in erhöhten Atemgaskonzentrationen von Limonen wider (Dadamio et al., 2012; Friedman et al., 1994; Morisco et al., 2013). O‘Hara et al postulieren, dass nicht metabolisiertes Limonen aufgrund seiner Lipophilie im Fettgewebe akkumuliert, da auch bei Erkrankungen fetthaltiger Gewebe wie bei Brustkrebs erhöhte Konzentrationen von Limonen im Gewebe ermittelt werden können (O'Hara et al., 2008; Miller et al., 2013).
Neben den oben genannten Charakteristika des Limonens wurde vielfach die protektive Wirkung von Limonen als Bestandteil einer gesundheitsförderlichen Ernährung untersucht. Peng et al wiesen 2009 im Rattenmodell (Sprague-Dawley- und Wistar-Ratten) nach, dass Limonen die Insulin-Sekretion steigert (Peng et al., 2009). Auch im Modell des Streptozotozin-induzierten Diabetes führt die Zufuhr von D-Limonen zu einer Reduktion der Lipidperoxidation und einem Anstieg von Glutathion-Reduktase und Superoxid-Dismutase (Murali et al., 2013; Bacanli et al., 2017). Ob Diabetiker mittel- und langfristig vom Genuss von Zitrusfrüchten profitieren könnten, ist aber noch ungeklärt. In verschiedenen Tumor-Mausmodellen konnte darüber hinaus eine chemopräventive Aktivität nachgewiesen werden (Crowell, 1999).

5.3.2 Isopren

Isopren wird als eines der häufigsten Kohlenwasserstoffe der Ausatemluft in medianen Mengen um 106ppb abgeatmet (Kushch et al., 2008). Der biogene Ursprung ist zwar noch nicht vollständig geklärt, Isopren wird als Produkt des Mevalonat-Stoffwechselweges als Marker für die Cholesterolsynthese angesehen (Conkle et al., 1975; Hyspler et al., 2000). Es entstammt vorwiegend der Leber und dem Muskel und kann in peripherem Gewebe gespeichert werden (King et

al., 2010). Bei körperlicher Aktivität steigt die Konzentration in der Ausatemluft an, dies korreliert positiv mit dem Herzzeitvolumen und negativ mit der Ventilation (Sukul et al., 2016), wobei die Werte durch zusätzliche Freisetzung aus dem peripherem Gewebe schwanken (King et al., 2010). Männer weisen bei größerer Muskelmasse höhere (Lechner et al., 2006), Kinder niedrigere Werte auf (Taucher et al., 1997).
Erhöhte Isopren-Konzentrationen finden sich bei fortgeschrittenen Nierenerkrankungen (Meinardi et al., 2013; Obermeier et al., 2017) sowie während und nach Hämodialyse (Trovarelli et al., 2001), bei Lebererkrankungen (Salerno-Kennedy et al., 2005) und nach akutem Myokardinfarkt (Mendis et al., 1995). Operationen am Herzen gehen bereits während der Sternotomie mit erhöhten Werten für Pentan und Isopren einher (Pabst et al., 2007). Auch Rauchen erhöht die Isoprenausscheidung (Senthilmohan et al., 2001) und Übergewicht führt bereits im Kindesalter zu veränderten Atemgasprofilen. Interessanterweise zeigen auch Kinder mit erhöhter Insulinresistenz höhere Werte für Isopren und Aceton (Alkhouri et al., 2015).
Niedrige Werte treten bei Herzinsuffizienz (McGrath et al., 2001), Lungenerkrankungen wie akutem Lungenversagen (Scholpp et al., 2002; Gahleitner et al., 2013), Cystischer Fibrose (McGrath et al., 2000) oder Asthma (Larstad et al., 2007) auf. Aus diesen Befunden ergibt sich, dass bei Störungen der pulmonalen Ventilation und Perfusion Isopren in geringeren Mengen abgeatmet werden kann, während die mit oxidativem Stress einhergehenden Störungen zu höheren Konzentrationen von Isopren in der Ausatemluft führen. Isopren gilt daher als Indikator für zelluläre Störung und Reparatur (Das et al., 2016) und wurde als potentieller Marker für Diabetes vorgeschlagen (Salerno-Kennedy et al., 2005). Verschiedene Studien zeigten jedoch keine offensichtliche Assoziation zwischen der Isoprenkonzentration im Atemgas und dem Glucosespiegel (O'Hara et al., 2009; Turner et al., 2006).

5.3.3 Pentanal

Pentanal entstammt als Aldehyd der Lipidperoxidation und ist Ausdruck der Peroxidation von Membranlipiden. Diese Produkte sind relativ stabil und biologisch möglicherweise als second messenger aktiv (Sousa et al., 2017). Oxidativem Stress wird wesentliche Bedeutung bei der Entwicklung und Ausprägung von Alterungserscheinungen und der damit verbundenen Erkrankungen zugeschrieben

(Ross et al., 2011). Im Rahmen der Interaktionen zwischen ROS und Proteinen und Lipiden kommt es zur Bildung von Kohlenwasserstoffen wie Ethan, Pentan oder 2-Hydroxynonenal (Calenic et al., 2015). Propanol, Butanol, Hexanal, Octanal und Nonanal sind ebenfalls Endprodukte der Lipidperoxidation. Bei Kindern mit myeloischer Leukämie ließen sich erhöhte Pentanalkonzentrationen im Serum nachweisen (Yazdanpanah et al., 1997), während Erwachsene mit Lungenkrebs signifikant höhere Konzentrationen von Pentanal als Raucher und als Gesunde abatmen (Fuchs et al., 2010). Bei Diabetes mellitus könnten erhöhte Pentanalwerte Ausdruck einer Gewebealteration im Sinne funktioneller und struktureller Zelldegeneration sein.

5.3.4 Dimethylsulfid

Schwefelhaltige VOC werden bei Lebererkrankungen vermehrt gebildet und ausgeschieden. Dimethylsulfid (DMS) wird als Transaminierungsprodukt aus Methionin und einfachster Thioether am häufigsten emittiert und trägt maßgeblich zum menschlichen Mundgeruch bei, der vorwiegend durch anaerobe Bakterien im Mund- und Zungenbereich generiert wird. Der bei fortgeschrittenen Lebererkrankungen auftretende Foetor hepaticus erhält durch Schwefelverbindungen seine süß-modrigen, leicht fäkalen Geruchsnoten (Tangerman et al., 1994; Miekisch et al., 2004). Auch bei infektiösen Lungenerkrankungen ist Dimethylsulfid erhöht (Filipiak et al., 2012). Ob und in welchem Umfang die hier beschriebene Exhalation von DMS Ausdruck einer alterierten Leberfunktion oder Aktivierung des gastrointestinalen Metaboloms ist, muss offenbleiben.

5.3.5 Ethanol

Ethanol entsteht bei der enzymatischen Gärung von Glucose durch Bakterien und Hefen (Taucher et al., 1997). Mittlere Atemgaswerte für Ethanol liegen bei jungen Erwachsenen bei 104ppb (Spanel et al., 2007). Ethanol weist eine geringe Altersabhängigkeit auf, so dass Kinder meist niedrigere Konzentrationen abatmen (Enderby et al., 2009). Sofern die Probanden vor der Atemgasanalyse keine alkoholischen Getränke zu sich genommen haben, ist der im Atem messbare Ethanol vorwiegend in der Mundhöhle entstanden und die Konzentration des Ethanols nach Zuckerkonsum erhöht (Spanel et al., 2007). Da Ethanol

überwiegend exogenen Ursprungs ist, ist es als Biomarker für diabetische Stoffwechselvorgänge trotz vergleichbarer kinetischer Serumprofile wie Glucose (Galassetti et al., 2005) nicht gut geeignet.
Die in der vorliegenden Studie erhöhten Werte entsprechen damit Erwartungen aufgrund früherer Untersuchungen, eine Korrelation zur Serum-Glucose besteht in der vorliegenden Studie allerdings nicht. Zusätzlich zur bakteriellen Produktion könnten höhere Ethanol- und Isopropanolkonzentrationen auch auf Kontamination der Umgebungsluft, zum Beispiel mit Desinfektionsmittel zurückzuführen sein.

5.3.6 Aceton und Isopropanol

Die im Zusammenhang mit Diabetes am häufigsten betrachtete flüchtige Substanz ist Aceton. Es entsteht als Produkt der Lipidperoxidation nach Decarboxylierung von Acetoacetat oder durch die Leber-Alkohol-Dehydrogenase aus Isopropanol (Turner et al., 2008). Mediane Atemgas-Konzentration liegen bei gesunden Erwachsenen bei 400ppb, die sich unter Hungerbedingungen auf bis zu 5800ppb erhöhen können (Statheropoulos et al., 2006). Lipolyse, tageszeitliche Schwankungen, körperliche Anstrengung (Ye et al., 2015), Geschlecht (Minh et al., 2012), sowie Alter und Fastenzustand (Schwarz et al., 2009) beeinflussen die Acetonkonzentration. Im Kindes- und Jungendalter stellen sich in der hier untersuchten Kohorte niedrigere Werte als für Erwachsene berichtet dar, ein Geschlechtsunterschied konnte für keines der untersuchten VOC festgestellt werden, Ernährungsfaktoren wurden nicht berücksichtigt.
Unter metabolischen Aspekten liegt der übermäßigen Bildung von Aceton ein Insulinmangel oder eine Insulinresistenz zugrunde (Ye et al., 2015). Der Einsatz als Biomarker für Diabetes und diabetische Ketoazidose wurde wiederholt untersucht und diskutiert (Musa-Veloso et al., 2002; Prabhakar et al., 2014), ebenso ein noninvasives Monitoring (Turner, 2011; Wang et al., 2013), da Atem-Aceton gut mit zirkulierenden Serum-Ketonkörper korreliert und indirekt auf die Glucose-Serumspiegel schließen lässt (Galassetti et al., 2005). Erste Sensoren im Sinne einer eletronic nose für Aceton wurden entwickelt (Deng et al., 2013; Righettoni et al., 2013; Saraoğlu et al., 2013; Worrall et al., 2013) Die Freisetzungskinetik von Aceton bleibt schwer kalkulierbar (Kalapos, 2003), inter- und intraindividuelle Schwankungen der Korrelation zwischen Aceton und Blutglucose verhindern eine sichere Interpretation der Werte (Trefz et al., 2019).

Erstaunlicherweise weisen die hier untersuchten Diabetiker gegenüber den Kontrollen nur gering erhöhte Acetonwerte auf. Dem könnte eine ausgeglichene Stoffwechsellage zum Zeitpunkt der Untersuchung zugrunde liegen, zumal wir keine Korrelation zwischen der Aceton-Konzentration im Atem und der Glucose-Konzentration im Serum beobachten konnten. Darüber hinaus könnte auch die Rückreaktion der Alkohol-Dehydrogenase und Abbau von Aceton zu Isopropanol eine Rolle spielen und die deutlich erhöhten Werte für Isopropanol in der Gruppe der Diabetiker erklären. Isopropanol entsteht enzymvermittelt als Produkt der Aceton-Reduktion (Miekisch et al., 2004) und kommt daher bei hohen Aceton- und NADH/NAD+-Spiegeln vor (Lewis et al., 1984; Li et al., 2017). Erhöhte Konzentrationen von Isopropanol im Serum fanden sich bei Diabetes mellitus, Hunger, Dehydratation und bei chronischem Alkoholabusus (Dwyer et al., 2013; Lewis et al., 1984).
Mittelfristig ist Atem-Aceton insbesondere in der Untersuchung von diabetischen Folgeerkrankungen interessant, es korreliert mit der Schwere einer Herzinsuffizienz aufgrund pulmonaler Stauung und verstärkter Freisetzung infolge des veränderten kapillären Druckes (Yokokawa et al., 2017). Zudem finden sich bei Erwachsenen mit chronischer Niereninsuffizienz erhöhte Werte (Grabowska-Polanowska et al., 2013), während dieser Effekt bei Kindern noch nicht beobachtet werden konnte (Obermeier et al., 2017). Auch zur Einschätzung der Fettgewebsreduktion bei Übergewichtigen oder in der Beobachtung von Diäten kann Atem-Aceton als Verlaufsparameter eingesetzt werden (King et al., 2011). Diesbezüglich ist der noninvasive Ansatz auch für das Monitoring einer Ketogenen Diät z.B. bei therapieschwierigen Epilepsien meist mehrfach behinderter Kinder erstrebenswert (Musa-Veloso et al., 2002; Spanel et al., 2011).

5.4. Mögliche pathophysiologische Einflussfaktoren

Das pulmonale Gefäßnetz und die Lungenfunktion sind langfristig bei Patienten mit länger bestehendem Diabetes beeinträchtigt, eine milde restriktive Lungenveränderungen und mikroangiopathisch verringerte Diffusionskapazität (van den Borst et al., 2010) beeinflussen den Gasaustritt verschiedener Substanzen. Die nicht-enzymatische Glykierung der Proteine äußert sich an der Lunge in einer Verdickung und Versteifung des Lungengewebes (Minh et al., 2012; van den Borst et al., 2010) durch dickere epitheliale und endotheliale kapilläre Basallaminae mit reduzierter Diffusionskapazität (Fuso et al., 1996; Weynand et al.,

1999; Minh et al., 2012; Saler et al., 2009). Grundsätzlich haben Diabetiker ein höheres Risiko für die Produktion freier Radikale, pulmonale Hypertension und erhöhte pro-sklerotische und pro-fibrotische Wachstumsfaktoren (Lopez-Lopez et al., 2008; Minh et al., 2012; Watson et al., 2010). Die mögliche Signalfunktion einzelner VOC wird durch veränderte Zellfunktionen und Kapillarmembranen ebenfalls gestört. Darüber hinaus ist der Anteil mikrobiell produzierter VOC im Rahmen eines alterierten Darmmikrobioms bei T1DM fraglich (Zheng et al., 2018).

5.5 Limitationen der Studie und Ausblick

In der vorliegenden Studie wurde erstmalig in Echtzeit das Atemgasprofil bei Kindern mit Diabetes mellitus untersucht und mit gesunden Kontrollen verglichen. Interindividuelle Unterschiede und Schwankungen in Abhängigkeit von Ernährung, vorausgehenden Insulinboli oder Tagesaktivitäten wurden nicht berücksichtigt, das gewählte Querschnittsdesign gibt dennoch einen Überblick. Weitere Untersuchungen sollten Langzeitverläufe unter Beachtung o.g. Faktoren und weiterer Lebensumstände erfassen. So könnten Zeichen diabetischer Komplikationen frühzeitig dokumentiert werden. In dieser Arbeit wurden nur Patienten mit einer Erkrankungsdauer von mindestens 6 Monaten und unterschiedlich stark ausgeprägter Symptomatik bei Manifestation untersucht, prognostisch bedeutsam sind insbesondere das Ausmaß der metabolischen Entgleisung zum Zeitpunkt der Manifestation (Azevedo et al., 2014) und wiederholte Ketoazidosen (Brandstaetter et al., 2019), diese Parameter wurden in dieser Arbeit nicht berücksichtigt.

Der Focus auf sieben bekannte und mit diabetischen Störungen assoziierte VOC schafft ein konkretes, jedoch sehr enges Beobachtungsfeld. Insbesondere weniger häufige VOC könnten hinsichtlich Differenzierung des Diabetes und frühen metabolischen Veränderungen interessant sein. Mit korrespondierenden Analysen des Blutes lassen sich unter Umständen engere Korrelationen zu Serum-Parametern nachweisen. Der Vorteil der nichtinvasiven Messung könnte auch unter Intensivbedingungen, bei sehr jungen Kindern z.B. Neugeborene diabetischer Mütter oder unter parenteraler Ernährung genutzt werden.

Blutfettwerte sind ebenso wie Blutdrücke innerhalb der untersuchten Patientengruppe bei maximaler Krankheitsdauer von 15 Jahren überwiegend im Normbereich, der HbA_{1c} ist im Vergleich zu den Empfehlungen der DDG leicht erhöht,

insgesamt können die Patienten jedoch als repräsentativ für junge Typ1 Diabetiker betrachtet werden. Die Unterschiede in den VOC Profilen im Vergleich mit den gesunden Probanden sind bei unseren jungen Patienten allerdings weniger charakteristisch als bei länger Erkrankten zu erwarten.
Atemgasanalysen eignen sich gut zum Einsatz im Kindesalter, auch Kleinkinder können bereits die Atmung über Mundstück trainieren. Bei Säuglingen oder nicht möglicher Mundatmung (z.B. geistig oder körperlich beeinträchtigte Probanden) kann die Atemluft über eine oronasale Maske gesammelt werden.
Realtime Messungen reduzieren präanalytische Fehler und ermöglichen eine zeitnahe Auswertung, ein Monitoring ist möglich. Dies bietet sich vor allem im klinikstationären Bereich z.B. zur Überwachung unter Beatmung und Hämodialyse als invasive Verfahren, während Schlaf (Amann et al., 2005; King et al., 2012) oder Koma, aber auch unter Infusionstherapie oder parenteraler Ernährung an. Ähnlich wie endtidales CO_2 oder Sauerstoffsättigung Hinweise für Ventilations- und Oxygenierungsprozesse geben, könnten einzelne VOC oder Profile zum Monitoring von Stoffwechselvorgängen eingesetzt werden. Für Diabetes ist diesbezüglich insbesondere die Phase der Manifestation und der damit noch häufig verbundenen Ketoazidose relevant. Hierfür bedarf es umfassender Längsschnittsstudien zur Ermittlung potentieller Biomarker.
Im Alltag eines Diabetikers sind Atemgasanalysen als Ergänzung zum HbA_{1c} vor allem auch in der Früherkennung beginnender Sekundärerkrankungen denkbar. Bei gestörter Nieren- oder Lungenfunktion akkumulieren blutstämmige Metaboliten, auch wenn allgemein die Aussagen für frühe Krankheitsstadien noch begrenzt sind. Denkbar sind auch Überprüfungen der Enzymaktivität bzw. Therapieeffektivität mittels Messungen vor und nach Medikation (Amann et al., 2014). Dies käme vor allem Zusatzmedikationen bei Sekundärerkrankungen oder bei Einsatz von Metformin bei Insulinresistenz nach längerer Diabeteserkrankung zugute und trägt zu einer personalisierten Therapie bei.
Allein der gravierende Vorteil einer nicht-invasiven Messung verdient weitere Beachtung in der Einschätzung einer lebenslangen Erkrankung. Die Adhärenz der Patienten lässt sich durch noninvasive Verfahren verbessern. Analog zu Atem-Alkoholmessungen könnten Einzelparameter mit Hilfe portabler, kostengünstiger und hochselektiver Instrumente quantifiziert werden. Langfristig bieten Entwicklungen in der Sensor- und Miniaturisierungstechnik das Potential, Atemtests in tragbaren Geräten (Mobile Health), wie z.B. Mobiltelefonen, zu integrieren und auf diese Weise eine breite und kosteng nstige Anwendung zu ermöglichen. Via Telekommunikation ist eine elektronische Übermittlung der Werte an Behandler

möglich, so dass Langzeitverläufe auch über größere Distanzen z.B. in strukturschwachen Ländern beobachtet und interpretiert werden können.

6 Zusammenfassung

Diabetes mellitus Typ 1 stellt die häufigste Stoffwechselstörung im Kindesalter dar. Die autoimmunvermittelte Zerstörung der ß-Inselzellen des Pankreas führt zu Störungen der Glucose-Homöostase und abhängiger Stoffwechselvorgänge. Mittelfristig gehen mit Hypo- und Hyperglycämien akute und mitunter lebensbedrohliche Zustände einher, langfristig führen häufige Stoffwechselentgleisungen zu mikro- und makroangiopathischen Veränderungen, die ihrerseits mit einem hohen Risiko für Herzkreislauferkrankungen, Nierenversagen und retinaler Blindheit einhergehen. Aktuelle Forschungen bemühen sich neben der Optimierung der Therapie um die frühzeitige Erfassung metabolischer Veränderungen und/oder Anpassungsreaktionen.

Während Stoffwechselprodukte in Blut und Körpersekreten als Spiegel metabolischer Vorgänge im klinischen Alltag regelmäßig erfasst werden, ist die Untersuchung volatiler organischer Komponenten (VOC) in der Atemluft bisher überwiegend auf Anästhesiologie (endtidales CO_2 zur Beurteilung der Beatmungsgüte) und Toxikologie (z.B. Atemalkohol) beschränkt. Dabei können bei ausgeprägter Stoffwechselentgleisung bestimmte Substanzen qualitativ als Geruch wahrgenommen werden, so auch Aceton im Rahmen einer diabetischen Ketoazidose.

In der vorliegenden Querschnittsstudie wurden neben Aceton noch 6 VOC (Dimethlysulfid (DMS), Ethanol, Isopren, Isopropanol, Limonen, Pentanal) in der exhalierten Luft von Kindern und Jugendlichen im Altern von 6 bis 18 Jahren mit Typ 1 Diabetes mellitus (50 Patienten, Erkrankungsdauer zwischen 0,58 und 15,25 Jahren) und gesunden Kontrollen (60 Personen) mit der PTR-Tof-MS analysiert. Die Untersuchungen wurden von allen Probanden gut toleriert. Interindividuell zeigte sich eine hohe Streubreite zwischen den Gruppen und mit Ausnahme von Limonen und Aceton konnten für die oben genannten VOC signifikant höhere Konzentrationen im Atemgas der Diabetiker nachgewiesen werden. Die Konzentrationen der ausgewählten VOC korrelierten weder mit der Erkrankungsdauer oder der Insulinmenge oder dem aktuellen Blutzucker. Auch die Form der Insulintherapie (MDI vs. CSII) zeigte keinen Einfluss auf die Atemgasprofile. Zu Parametern des Fettstoffwechsels zeigte Isopropanol geringe Assoziationen, während Isopren mit dem Alter, nicht jedoch mit Körpergewicht, Körperlänge oder BMI korrelierte. Geringe Korrelationen fanden sich zwischen Pentanal und Isopropanol, Aceton und Limonen und Ethanol und Limonen. Zusammenhänge mit zuvor aufgenommener Nahrung, dem Tagesablauf oder anderen individuellen Faktoren wurden in dieser Arbeit nicht berücksichtigt.

Trotz der in dieser Arbeit nur in geringem Maße nachweisbaren Korrelationen ist die Methode gerade als noninvasives Verfahren im Kindesalter interessant und sollte in Langzeitbeobachtungen und mit größeren Stichproben im Hinblick auf die Entwicklung minimal oder noninvasiver, portabler Monitorverfahren weitere Anwendung finden.

7 Thesen

Diabetes mellitus Typ1 ist die häufigste Stoffwechselerkrankung des Kindes- und Jugendalters und erfordert neben einer lebenslangen Insulintherapie engmaschige Blutzuckerkontrollen zur Justierung der Therapie.

Die für die Erkrankung typischen mikro- und makrovaskulären Komplikationen nehmen ihren Anfang bereits im Kindes- und Jugendalter, so dass präventiven Maßnahmen große Bedeutung zu kommt.

Ausgeprägte Stoffwechselentgleisungen im Rahmen einer Hyperglycämie münden in einer Ketoazidose, Ketone sind als Metabolite der unzureichenden Stoffwechselkontrolle nicht nur im Blut und Urin, sondern auch in der Ausatemluft nachweisbar.

Die PTR-ToF-MS ist als Echtzeit-Verfahren geeignet, flüchtige organische Komponenten wie Aceton in der Ausatemluft zu erfassen und kann auch bei jungen Kindern unkompliziert und zuverlässig Anwendung finden.

Die Atemgasprofile von Gesunden und Patienten mit Diabetes mellitus Typ1 unterscheiden sich bereits nach kurzer Erkrankungsdauer.

Im Vergleich mit gleichaltrigen gesunden Kontrollen atmen Diabetiker signifikant höhere Konzentrationen von Ethanol, Dimethylsulfid, Isopropanol, Isopren und Pentanal ab.

8 Literaturverzeichnis

Alkhouri N, Eng K, Cikach F, Patel N, Yan C, Brindle A, Rome E, Hanouneh I, Grove D, Lopez R, Hazen SL and Dweik RA (2015). Breathprints of childhood obesity: changes in volatile organic compounds in obese children compared with lean controls. Pediatr Obes 10(1): 23-29.

Amann A, Costello BdL, Miekisch W, Schubert JK, Buszewski B, Pleil J, Ratcliffe N and Risby T (2014). The human volatilome: volatile organic compounds (VOCs) in exhaled breath, skin emanations, urine, feces and saliva. J Breath Res 8(034001).

Amann A, Miekisch W, Schubert J, Buszewski B, Ligor T, Jezierski T, Pleil J and Risby T (2014). Analysis of exhaled breath for disease detection. Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif) 7: 455-482.

Amann A, Telser S, Hofer L and Schmid A (2005). Exhaled Breath Gas as a Biochemical Probe During Sleep. Breath Analysis for Clinical Diagnosis and Therapeutic Monitoring. Amann A and Smith D, World Scientific Publishing**:** 305-316.

Anderson JC, Babb AL and Hlastala MP (2003). Modeling soluble gas exchange in the airways and alveoli. Ann Biomed Eng 31(11): 1402-1422.

Azevedo LC, Choi H, Simmonds K, Davidow J and Bagshaw SM (2014). Incidence and long-term outcomes of critically ill adult patients with moderate-to-severe diabetic ketoacidosis: retrospective matched cohort study. J Crit Care 29(6): 971-977.

Bacanli M, Anlar HG, Aydin S, Cal T, Ari N, Undeger Bucurgat U, Basaran AA and Basaran N (2017). d-limonene ameliorates diabetes and its complications in streptozotocin-induced diabetic rats. Food Chem Toxicol 110: 434-442.

Banting F, Best C, Collip JC, WR and Fletcher A (1922). Pancreatic extracts in the treatment of diabetes mellitus. Can Med Assoc J 12(3): 141-146.

Beale DJ, Jones OA, Karpe AV, Dayalan S, Oh DY, Kouremenos KA, Ahmed W and Palombo EA (2016). A Review of Analytical Techniques and Their Application in Disease Diagnosis in Breathomics and Salivaomics Research. Int J Mol Sci 2017(18, 24).

Beauchamp J (2011). Inhaled today, not gone tomorrow: pharmacokinetics and environmental exposure of volatiles in exhaled breath. J Breath Res 5(3): 037103.

Beauchamp JD and Pleil JD (2013). Simply breath-taking? Developing a strategy for consistent breath sampling. J Breath Res 7(4): 042001.

Bjerg L, Hulman A, Carstensen B, Charles M, Witte DR and Jorgensen ME (2019). Effect of duration and burden of microvascular complications on mortality rate in type 1 diabetes: an observational clinical cohort study. Diabetologia 62(4): 633-643.

Blaikie TP, Edge JA, Hancock G, Lunn D, Megson C, Peverall R, Richmond G, Ritchie GA and Taylor D (2014). Comparison of breath gases, including acetone, with blood glucose and blood ketones in children and adolescents with type 1 diabetes. J Breath Res 8(4): 046010.

Brandstaetter E, Bartal C, Sagy I, Jotkowitz A and Barski L (2019). Recurrent diabetic ketoacidosis. Arch Endocrinol Metab 63(5): 531-535.

Brownlee M (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. Nature 414(6865): 813 - 820.

Buijck M, Berkhout DJ, de Groot EF, Benninga MA, van der Schee MP, Kneepkens CM, de Boer NK and de Meij TG (2016). Sniffing Out Paediatric Gastrointestinal Diseases: The Potential of Volatile Organic Compounds as Biomarkers for Disease. J Pediatr Gastroenterol Nutr 63(6): 585-591.

Buszewski B, Kesy M, Ligor T and Amann A (2007). Human exhaled air analytics: biomarkers of diseases. Biomed Chromatogr 21: 553 - 566.

Calenic B, Miricescu D, Greabu M and Kuznetsov AV (2015). Oxidative Stress and volatile organic compounds: interplay in pulmonary, cardio-vascular, digestive tract systems and cancer. Open Chem J 13: 1020 - 1030.

Conkle JP, Camp BJ and Welch BE (1975). Trace composition of human respiratory gas. Arch Environ Health 30(6): 290-295.

Crowell PL (1999). Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes. J Nutr 129(3): 775s-778s.

Cryer PE, Davis SN and Shamoon H (2003). Hypoglycemia in diabetes. Diabetes Care 26(6): 1902-1912.

Dadamio J, Van den Velde S, Laleman W, Van Hee P, Coucke W, Nevens F and Quirynen M (2012). Breath biomarkers of liver cirrhosis. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 905: 17-22.

Dalton P, Gelperin A and Preti G (2004). Volatile Metabolic Monitoring of Glycemic Status in Diabetes Using Electronic Olfaction. Diabetes Technol The 6(4): 534 - 544.

Das S, Pal S and Mitra M (2016). Significance of Exhaled Breath Test in Clinical Diagnosis: A Special Focus on the Detection of Diabetes Mellitus. J. Med. Biol. Eng. 36: 605 - 624.

Davies S, Spanel P and Smith D (1997). Quantitative analysis of ammonia on the breath of patients in end-stage renal failure. Kidney Int 52(1): 223-228.

de Lacy Costello B, Amann A, Al-Kateb H, Flynn C, Filipiak W, Khalid T, Osborne D and Ratcliffe NM (2014). A review of the volatiles from the healthy human body. J Breath Res 8(1): 014001.

Deng LL, Zhao CX, Ma Y, Chen SS and Xu G (2013). Low cost acetone sensors with selectivity over water vapor based on screen printed TiO2nanoparticles. Anal Methods 5(15): 3709 - 3713.

Dent AG, Sutedja TG and Zimmerman PV (2013). Exhaled breath analysis for lung cancer. J Thorac Dis 5 Suppl 5: S540-550.

Deutsche Diabetesgesellschaft D (2018). S3-Leitlinie Therapie des Typ-1-Diabetes. 2.

Deutsche Diabetesgesellschaft D and Diabetes-Hilfe d-D (2019). Deutscher Gesundheitsbericht Diabetes 2019 - Die Bestandsaufnahme, Verlag Kirchheim + Co GmbH.

Di Francesco F, Loccioni C, Fioravanti M, Russo A, Pioggia G, Ferro M, Roehrer I, Tabucchi S and Onor M (2008). Implementation of Fowler's method for end-tidal air sampling. J Breath Res 2(3): 037009.

Di Natale C, Macagnano A, Martinelli E, Paolesse R, D'Arcangelo G, Roscioni C, Finazzi-Agro A and D'Amico A (2003). Lung cancer identification by the analysis of breath by means of an array of non-selective gas sensors. Biosens Bioelectron 18(10): 1209-1218.

DIAMOND Project Group (2006). Incidence and trends of childhood Type 1 diabetes worldwide 1990-1999. Diabet Med 23(8): 857-866.

Dwyer JB and Tamama K (2013). Ketoacidosis and trace amounts of isopropanol in a chronic alcoholic patient. Clin Chim Acta 415: 245-249.

Enderby B, Lenney W, Brady M, Emmett C, Spanel P and Smith D (2009). Concentrations of some metabolites in the breath of healthy children aged 7–18 years measured using selected ion flow tube mass spectrometry (SIFT-MS). J Breath Res 3(036001).

Eng K, Alkhouri N, Cikach F, Patel N, Yan C, Grove D, Lopez R, Rome E and Dweik RA (2015). Analysis of breath volatile organic compounds in children with chronic liver disease compared to healthy controls. J Breath Res 9(2): 026002.

Fens N, Roldaan AC, van der Schee MP, Boksem RJ, Zwinderman AH, Bel EH and Sterk PJ (2011). External validation of exhaled breath profiling using an electronic nose in the discrimination of asthma with fixed airways obstruction and chronic obstructive pulmonary disease. Clin Exp Allergy 41(10): 1371-1378.

Fens N, Zwinderman AH, van der Schee MP, de Nijs SB, Dijkers E, Roldaan AC, Cheung D, Bel EH and Sterk PJ (2009). Exhaled breath profiling enables discrimination of chronic obstructive pulmonary disease and asthma. Am J Respir Crit Care Med 180(11): 1076-1082.

Fernandez del Rio R, O'Hara ME, Holt A, Pemberton P, Shah T, Whitehouse T and Mayhew CA (2015). Volatile Biomarkers in Breath associated with liver cirrhosis - comparisons of Pre- and post-liver Transplant Breath Samples. EBioMedicine 2: 1243 - 1250.

Filipiak W, Sponring A, Baur MM, Ager C, Filipiak A, Wiesenhofer H, Nagl M, Troppmair J and Amann A (2012). Characterization of volatile metabolites taken up by or released from Streptococcus pneumoniae and Haemophilus influenzae by using GC-MS. Microbiology 158(Pt 12): 3044-3053.

Fischer S, Trefz P, Bergmann A, Steffens M, Ziller M, Miekisch W, Schubert JS, Kohler H and Reinhold P (2015). Physiological variability in volatile organic compounds (VOCs) in exhaled breath and released from faeces due to nutrition and somatic growth in a standardized caprine animal model. J Breath Res 9(2): 027108.

Friedman MI, Preti G, Deems RO, Friedman LS, Munoz SJ and Maddrey WC (1994). Limonene in expired lung air of patients with liver disease. Dig Dis Sci 39(8): 1672-1676.

Frohlich-Reiterer EE, Hofer S, Kaspers S, Herbst A, Kordonouri O, Schwarz HP, Schober E, Grabert M and Holl RW (2008). Screening frequency for celiac disease and autoimmune thyroiditis in children and adolescents with type 1

diabetes mellitus--data from a German/Austrian multicentre survey. Pediatr Diabetes 9(6): 546-553.

Fuchs P, Loeseken C, Schubert JK and Miekisch W (2010). Breath gas aldehydes as biomarkers of lung cancer. IJC 126: 2663 - 2670.

Fuso L, Cotroneo P, Basso S, De Rosa M, Manto A, Ghirlanda G and Pistelli R (1996). Postural variations of pulmonary diffusing capacity in insulin-dependent diabetes mellitus. Chest 110(4): 1009-1013.

Gahleitner F, Guallar-Hoyas C, Beardsmore CS, Pandya HC and Thomas CP (2013). Metabolomics pilot study to identify volatile organic compound markers of childhood asthma in exhaled breath. Bioanalysis 5(18): 2239-2247.

Galassetti PR, Novak B, Nemet D, Rose-Grotton C, Cooper DM, Meinardi S, Newcomb R, Zaldivar F and Blake DR (2005). Breath Ethanol and Acetone as Indicators of Serum Glucose Levels: An Initial Report. Diabetes Technol The 7(1): 115 - 123.

Gelmont D, Stein RA and Mead JF (1981). Isoprene-the main hydrocarbon in human breath. Biochem Biophys Res Commun 99(4): 1456-1460.

Gilchrist FJ, Razavi C, Webb AK, Jones AM, Spanel P, Smith D and Lenney W (2012). An investigation of suitable bag materials for the collection and storage of breath samples containing hydrogen cyanide. J Breath Res 6(3): 036004.

Grabowska-Polanowska B, Faber J, Skowron M, Miarka P, Pietrzycka A, Sliwka I and Amann A (2013). Detection of potential chronic kidney disease markers in breath using gas chromatography with mass-spectral detection coupled with thermal desorption method. J Chromatogr A 1301: 179-189.

Greiter MB, Keck L, Siegmund T, Hoeschen C, Oeh U and Paretzke HG (2010). Differences in Exhaled Gas Profiles Between Patients with Type 2 Dia. Diabetes Technol The 12(6): 455 - 463.

Häring H-U, Gallwitz B, Müller-Wieland D, Usadel K-H and Mehnert H (2011). Diabetologie in Klinik und Praxis, Thieme Verlag.

Harjutsalo V, Sjöberg L and Tuomilehto J (2008). Time trends in the incidence of type 1 diabetes in Finnish children: a cohort study. Lancet May 24(371(9626)): 1777-1782.

Heinrich PC, Mueller M and Graeve L (2014). Biochemie und Pathobiochemie, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Homma TK, Endo CM, Saruhashi T, Mori ApI, de Noronha RM, Monte O and Calliari LEP (2015). Dyslipidemia in young patients with type 1 diabetes mellitus. Arch Endochrinol Metabol 59(3).

Hürter P and Danne T (2005). Diabetes bei Kindern und Jugendlichen; Grundlagen - Klinik - Therapie, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Hyspler R, Crhova S, Gasparic J, Zadak Z, Cizkova M and Balasova V (2000). Determination of isoprene in human expired breath using solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. J Chromatogr B Biomed Sci Appl 739(1): 183-190.

Kalapos MP (2003). On the mammalian acetone metabolism: from chemistry to clinical implications. Biochim Biophys Acta 1621(2): 122-139.

Karl T, Prazeller P, Mayr D, Jordan A, Rieder J, Fall R and Lindinger W (2001). Human breath isoprene and its relation to blood cholesterol levels: new measurements and modeling. J Appl Physiol (1985) 91(2): 762-770.

King J, Koc H, Unterkofler K, Mochalski P, Kupferthaler A, Teschl G, Teschl S, Hinterhuber H and Amann A (2010). Physiological modeling of isoprene dynamics in exhaled breath. J Theor Biol 267(4): 626-637.

King J, Kupferthaler A, Frauscher B, Hackner H, Unterkofler K, Teschl G, Hinterhuber H, Amann A and Hogl B (2012). Measurement of endogenous acetone and isoprene in exhaled breath during sleep. Physiol Meas 33(3): 413-428.

King J, Kupferthaler A, Unterkofler K, Koc H, Teschl S, Teschl G, Miekisch W, Schubert J, Hinterhuber H and Amann A (2009). Isoprene and acetone concentration profiles during exercise on an ergometer. J Breath Res 3(2): 027006.

King J, Unterkofler K, Teschl G, Teschl S, Koc H, Hinterhuber H and Amann A (2011). A mathematical model for breath gas analysis of volatile organic compounds with special emphasis on acetone. J Math Biol 63(5): 959-999.

Klachko DM (1979). The Endocrine Pancreas and Juvenile Diabetes, Springer US.

Kromeyer-Hauschild K (2001). Percentiles of body mass index in children and adolescents evaluated from different regional German studies. Monatsschr Kinderh 149: 807-818.

Kushch I, Arendacka B, Stolc S, Mochalski P, Filipiak W, Schwarz K, Schwentner L, Schmid A, Dzien A, Lechleitner M, Witkovsky V, Miekisch W, Schubert J, Unterkofler K and Amann A (2008). Breath isoprene--aspects of normal physiology related to age, gender and cholesterol profile as determined in a proton transfer reaction mass spectrometry study. Clin Chem Lab Med 46(7): 1011-1018.

Larstad MA, Toren K, Bake B and Olin AC (2007). Determination of ethane, pentane and isoprene in exhaled air--effects of breath-holding, flow rate and purified air. Acta Physiol (Oxf) 189(1): 87-98.

Lebovitz HE (1995). Diabetic ketoacidosis. Lancet 345(8952): 767-772.

Lechner M, Moser B, Niederseer D, Karlseder A, Holzknecht B, Fuchs M, Colvin S, Tilg H and Rieder J (2006). Gender and age specific differences in exhaled isoprene levels. Respir Physiol Neurobiol 154(3): 478-483.

Lewis GD, Laufman AK, McAnalley BH and Garriott JC (1984). Metabolism of acetone to isopropyl alcohol in rats and humans. J Forensic Sci 29(2): 541-549.

Li P, Xu G, Wang C, Gong Y and He Y (2009). Breath pentane: an indicator for early and continuous monitoring of lipid peroxidation in hepatic ischaemia-reperfusion injury. Eur J Anaesthesiol 26(6): 513-519.

Li W, Liu Y, Liu Y, Cheng S and Duan Y (2017). Exhaled isopropanol: new potential biomarker in diabetic breathomics and its metabolic correlation with acetone. R Soc Chem 7: 17480-17488.

Lopez-Lopez JG, Moral-Sanz J, Frazziano G, Gomez-Villalobos MJ, Flores-Hernandez J, Monjaraz E, Cogolludo A and Perez-Vizcaino F (2008). Diabetes induces pulmonary artery endothelial dysfunction by NADPH oxidase induction. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 295(5): L727-732.

Lourenco C and Turner C (2014). Breath Analysis in Disease Diagnosis: Methodological Considerations and Applications. Metabolites 4: 465 - 498.

Madonna R, Balistreri CR, Geng Y-J and De Caterina R (2017). Diabetic microangiopathy: pathogenetic insights and novel therapeutic approaches. Curr vasc Pharm 90: 1-7.

McGrath LT, Patrick R, Mallon P, Dowey L, Silke B, Norwood W and Elborn S (2000). Breath isoprene during acute respiratory exacerbation in cystic fibrosis. Eur Respir J 16(6): 1065-1069.

McGrath LT, Patrick R and Silke B (2001). Breath isoprene in patients with heart failure. Eur J Heart Fail 3(4): 423-427.

Meinardi S, Jin KB, Barletta B, Blake DR and Vaziri ND (2013). Exhaled breath and fecal volatile organic biomarkers of chronic kidney disease. Biochim Biophys Acta 1830(3): 2531-2537.

Mendis S, Sobotka PA and Euler DE (1995). Expired hydrocarbons in patients with acute myocardial infarction. Free Radic Res 23(2): 117-122.

Miekisch W, Schubert JK and Nöldge-Schomburg GFE (2004). Diagnostic potential of breath analysis - focus on volatile organic compounds. Clin Chim Acta 347: 25 - 39.

Miller JA, Lang JE, Ley M, Nagle R, Hsu CH, Thompson PA, Cordova C, Waer A and Chow HH (2013). Human breast tissue disposition and bioactivity of limonene in women with early-stage breast cancer. Cancer Prev Res (Phila) 6(6): 577-584.

Minh TD, Oliver SR, Ngo J, Flores R, Midyett J, Meinardi S, Carlson MK, Rowland FS, Blake DR and Galassetti PR (2011). Noninvasive measurement of plasma glucose from exhaled breath in healthy and type 1 diabetic subjects. Am J Physiol Endocrinol Metab 300(6): E1166-1175.

Minh TDC, Blake DR and Galassetti PR (2012). The clinical potential of exhaled breath analysis for diabetes mellitus. Diabetes Res Clin Pract 97(2): 195 - 205.

Minh TDC, Oliver SR, Flores RL, Ngo J, Meinardi S, Carlson MK, Midyett J, Rowland FS, Blake DR and Galassetti PR (2012). Noninvasive Measurement of Plasma Triglyceride and Free Fatty Acids from Exhaled Breath. J Diabetes Sci Technol 6(1).

Miyazawa M, Shindo M and Shimada T (2002). Metabolism of (+)- and (-)-limonenes to respective carveols and perillyl alcohols by CYP2C9 and CYP2C19 in human liver microsomes. Drug Metab Dispos 30(5): 602-607.

Monasta L, Pierobon C, Princivalle A, Martelossi S, Marcuzzi A, Pasini F and Perbellini L (2017). Inflammatory bowel disease and patterns of volatile organic compounds in the exhaled breath of children: A case-control study using Ion Molecule Reaction-Mass Spectrometry. PLOS one 12(8): e0184118.

Morisco F, Aprea E, Lembo V, Fogliano V, Vitaglione P, Mazzone G, Cappellin L, Gasperi F, Masone S, De Palma GD, Marmo R, Caporaso N and Biasioli F

(2013). Rapid "breath-print" of liver cirrhosis by proton transfer reaction time-of-flight mass spectrometry. A pilot study. PLOS one 8(4): e59658.

Murali R, Karthikeyan A and Saravanan R (2013). Protective effects of D-limonene on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats. Basic Clin Pharmacol Toxicol 112(3): 175-181.

Musa-Veloso K, Likhodii SS and Cunnane SC (2002). Breath acetone is a reliable indicator of ketosis in adults consuming ketogenic meals. Am J Clin Nutr 76(1): 65-70.

Novak BJ, Blake DR, Meinardi S, Rowland FS, Pontello A, Cooper DM and Galassetti PR (2007). Exhaled methyl nitrate as a noninvasive marker of hyperglycemia in type 1 diabetes. PNAS 104(40): 15613 - 15618.

O'Hara ME, Clutton-Brock TH, Green S and Mayhew CA (2009). Endogenous volatile organic compounds in breath and blood of healthy volunteers: examining breath analysis as a surrogate for blood measurements. J Breath Res 3(2): 027005.

O'Hara ME, Fernandez Del Rio R, Holt A, Pemberton P, Shah T, Whitehouse T and Mayhew CA (2016). Limonene in exhaled breath is elevated in hepatic encephalopathy. J Breath Res 10(4): 046010.

O'Hara ME, O'Hehir S, Green S and Mayhew CA (2008). Development of a protocol to measure volatile organic compounds in human breath: a comparison of rebreathing and on-line single exhalations using proton transfer reaction mass spectrometry. Physiol Meas 29: 309 - 330.

Oakley-Girvan I and Davis SW (2017). Breath based volatile organic compounds in the detection of breast, lung, and colorectal cancers: A systematic review. Cancer Biomark 21(1): 29-39.

Obermeier J, Trefz P, Happ J, Schubert JK, Staude H, Fischer D-C and Miekisch W (2017). Exhaled volatile substances mirror clinical conditions in pediatric chronic kidney disease. PLOS one 12(6).

Oyer DS (2013). The science of hypoglycemia in patients with diabetes. Curr Diabetes Rev 9(3): 195-208.

Pabst F, Miekisch W, Fuchs P, Kischkel S and Schubert JK (2007). Monitoring of oxidative and metabolic stress during cardiac surgery by means of breath biomarkers: an observational study. J Cardiothorac Surg 2: 37.

Paredi P, Kharitonov SA, Leak D, Ward S, Cramer D and Barnes PJ (2000). Exhaled ethane, a marker of lipid peroxidation, is elevated in chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med 162(2 Pt 1): 369-373.

Patterson CC, Dahlquist GG, Gyurus E, Green A and Soltesz G (2009). Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989-2003 and predicted new cases 2005-20: a multicentre prospective registration study. Lancet 373(9680): 2027-2033.

Peng CH, Ker YB, Weng CF, Peng CC, Huang CN, Lin LY and Peng RY (2009). Insulin secretagogue bioactivity of finger citron fruit (Citrus medica L. var. Sarcodactylis Hort, Rutaceae). J Agric Food Chem 57(19): 8812-8819.

Petsky HL, Cates CJ, Kew KM and Chang AB (2018). Tailoring asthma treatment on eosinophilic markers (exhaled nitric oxide or sputum eosinophils): a systematic review and meta-analysis. Thorax 73(12): 1110-1119.

Phillips M, Cataneo RN, Greenberg J, Grodman R and Salazar M (2003). Breath Markers of Oxidative Stress in Patients with Unstable Angina. Heart Disease 5(2): 95 - 99.

Phillips M, Gleeson K, Hughes JM, Greenberg J, Cataneo RN, Baker L and McVay WP (1999). Volatile organic compounds in breath as markers of lung cancer: a cross-sectional study. Lancet 353(9168): 1930-1933.

Poretsky L (2010). Principles of Diabetes mellitus, Springer US.

Prabhakar A, Quach AD, Wang D, Zhang H, Terrera M, Jackemeyer D, Xian X, Tsow F, Tao N and Forzani ES (2014). Breath Acetone as Biomarker for Lipid Oxidation and Early Ketone Detection. Glob J Obes Diabetes Metab Syndr 1(1): 012-019.

Prakasam RK, Gotze A, von Keyserlingk S, Junemann A, Rohlig M, Stachs O and Fischer DC (2019). Spectral-Domain Optical Coherence Tomography for Determination of Retinal Thickness in Pediatric Patients with Mild-To-Moderate Chronic Kidney Disease: A Cross-Sectional Study. Curr Eye Res 44(2): 206-211.

Qiao Y, Gao Z, Liu Y, Cheng Y, Yu M, Zhao L, Duan Y and Liu Y (2014). Breath ketone testing: a new biomarker for diagnosis and therapeutic monitoring of diabetic ketosis. Biomed Res Int 2014: 869186.

Rewers M and Ludvigsson J (2016). Environmental risk factors for type 1 diabetes. Lancet 387(10035): 2340-2348.

Righettoni M, Schmid A, Amann A and Pratsinis SE (2013). Correlations between blood glucose and breath components from portable gas sensors and PTR-TOF-MS. J Breath Res 7(037110).

Robert Koch Institut (2013). Referenzperzentile für anthropometrische Maßzahlen und Blutdruck aus der Studie zur Gesundheit von Kindern und Jugendlichen in Deutschland (KiGGS), RKI-Hausdruckerei, Berlin.

Robroeks CM, van Berkel JJ, Jobsis Q, van Schooten FJ, Dallinga JW, Wouters EF and Dompeling E (2013). Exhaled volatile organic compounds predict exacerbations of childhood asthma in a 1-year prospective study. Eur Respir J 42(1): 98-106.

Ross BM, Maxwell R and Glen I (2011). Increased breath ethane levels in medicated patients with schizophrenia and bipolar disorder are unrelated to erythrocyte omega-3 fatty acid abundance. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 35(2): 446-453.

Saler T, Cakmak G, Saglam ZA, Ataoglu E, Yesim Erdem T and Yenigun M (2009). The assessment of pulmonary diffusing capacity in diabetes mellitus with regard to microalbuminuria. Intern Med 48(22): 1939-1943.

Salerno-Kennedy R and Cashman K (2005). Potential applications of breath isoprene as a biomarker in modern medicine: A concise overview. Wien Klin Wochenschr 117(180-6).

Saraoğlu HM, Selvi AO, Ebeoğlu MA and Taşaltin C (2013). Electronic Nose System Based on Quartz Crystal Microbalance Sensor for Blood Glucose and HbA1c Levels From Exhaled Breath Odor. IEEE Sensors Journal 13(11): 4229 - 4935.

Scholpp J, Schubert JK, Miekisch W and Geiger K (2002). Breath markers and soluble lipid peroxidation markers in critically ill patients. Clin Chem Lab Med 40(6): 587-594.

Schubert JK, Miekisch W, Birken T, Geiger K and Noldge-Schomburg GF (2005). Impact of inspired substance concentrations on the results of breath analysis in mechanically ventilated patients. Biomarkers 10(2-3): 138-152.

Schubert R, Schwoebel H, Mau-Moeller A, Behrens M, Fuchs P, Sklorz M, Schubert JK, Bruhn S and Miekisch W (2012). Metabolic monitoring and assessment of anaerobic threshold by means of breath biomarkers. Metabolomics.

Schwarz K, Pizzini A, Arendacka B, Zerlauth K, Filipiak W, Schmid A, Dzien A, Neuner S, Lechleitner M, Scholl-Burgi S, Miekisch W, Schubert J, Unterkofler K, Witkovsky V, Gastl G and Amann A (2009). Breath acetone-aspects of normal physiology related to age and gender as determined in a PTR-MS study. J Breath Res 3(2): 027003.

Sehnert SS, Jiang L, Burdick JF and Risby TH (2002). Breath biomarkers for detection of human liver diseases: preliminary study. Biomarkers 7(2): 174-187.

Senthilmohan ST, McEwan MJ, Wilson PF, Milligan DB and Freeman CG (2001). Real time analysis of breath volatiles using SIFT-MS in cigarette smoking. Redox Rep 6(3): 185-187.

Siegel AP, Daneshkhah A, Hardin DS, Shrestha S, Varahramyan K and Agarwal M (2017). Analyzing breath samples of hypoglycemic events in type 1 diabetes patients: towards developing an alternative to diabetes alert dogs. J Breath Res 11(2): 026007.

Smith-Palmer J, Brandle M, Trevisan R, Orsini Federici M, Liabat S and Valentine W (2014). Assessment of the association between glycemic variability and diabetes-related complications in type 1 and type 2 diabetes. Diabetes Res Clin Pract 105(3): 273-284.

Smith D, Španěl P, Fryer AA, Hanna F and Ferns GAA (2011). Can volatile compounds in exhaled breath be used to monitor control in diabetes mellitus? J Breath Res 5(2): 022001.

Smith D, Turner C and Spanel P (2007). Volatile metabolites in the exhaled breath of healthy volunteers: their levels and distributions. J Breath Res 1(1).

Smolinska A, Klaassen EMM, Dallinga JW, van de Kant KDG, Jobsis Q, Moonen EJC, van Schayck OCP, Dompeling E and van Schooten FJ (2014). Profiling of Volatile Organic Compounds in Exhaled Breath As a Strategy to Find Early Predictive Signatures of Asthma in Children. PLOS one 9(4).

Sousa BC, Pitt AR and Spickett CM (2017). Chemistry and analysis of HNE and other prominent carbonyl-containing lipid oxidation compounds. Free Radic Biol Med 111: 294-308.

Spanel P, Dryahina K and Smith D (2007). The concentration distributions of some metabolites in the exhaled breath of young adults. J Breath Res 1(026001).

Spanel P, Dryahina K and Smith D (2013). A quantitative study of the influence of inhaled compounds on their concentrations in exhaled breath. J Breath Res 7(1): 017106.

Spanel P and Smith D (2011). Volatile compounds in health and disease. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 14(5): 455-460.

Statheropoulos M, Agapiou A and Georgiadou A (2006). Analysis of expired air of fasting male monks at Mount Athos. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 832(2): 274-279.

Sukul P, Schubert JK, Oertel P, Kamysek S, Taunk K, Trefz P and Miekisch W (2016). FEV manoeuvre induced changes in breath VOC compositions: an unconventional view on lung function tests. Sci Rep 6(28029).

Tanda N, Hinokio Y, Washio J, Takahashi N and Koseki T (2014). Analysis of ketone bodies in exhaled breath and blood of ten healthy Japanese at OGTT using a portable gas chromatograph. J Breath Res 8(4): 046008.

Tangerman A, Meuwese-Arends MT and Jansen JB (1994). Cause and composition of foetor hepaticus. Lancet 343(8895): 483.

Taucher J, Hansel A, Jordan A, Fall R, Futrell JH and Lindinger W (1997). Detection of isoprene in expired air from human subjects using proton-transfer-reaction mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom 11(11): 1230-1234.

Teranishi R, Mon TR, Robinson AB, Cary P and Pauling L (1972). Gas chromatography of volatiles from breath and urine. Anal Chem 44(1): 18-20.

Trefz P, Schmidt M, Oertel P, Obermeier J, Brock B, Kamysek S, Dunkl J, Zimmermann R, Schubert JK and Miekisch W (2013). Continuous real time breath gas monitoring in the clinical environment by proton-transfer-reaction-time-of-flight-mass spectrometry. Anal Chem 85(21): 10321-10329.

Trefz P, Obermeier J, Lehbrink R, Schubert JK, Miekisch W and Fischer DC (2019). Exhaled volatile substances in children suffering from type 1 diabetes mellitus: results from a cross-sectional study. Sci Rep 9(1): 15707.

Trefz P, Schmidt SC, Sukul P, Schubert JK, Miekisch W and Fischer DC (2019). Non-Invasive Assessment of Metabolic Adaptation in Paediatric Patients Suffering from Type 1 Diabetes Mellitus. J Clin Med 8(11).

Trovarelli G, Brunori F, De Medio GE, Timio M, Lippi G, Pelli MA and Capodicasa E (2001). Onset, time course, and persistence of increased haemodialysis-induced breath isoprene emission. Nephron 88(1): 44-47.

Turner C (2011). Potential of breath and skin analysis for monitoring blood glucose concentration in diabetes. Expert Rev Mol Diagn 11(5): 497-503.

Turner C, Parekh B, Walton C, Spanel P, Smith D and Evans M (2008). An exploratory comparative study of volatile compounds in exhaled breath and emitted by skin using selected ion flow tube mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom 22(4): 526-532.

Turner C, Spanel P and Smith D (2006). A longitudinal study of breath isoprene in healthy volunteers using selected ion flow tube mass spectrometry (SIFT-MS). Physiol Meas 27(1): 13-22.

Turner C, Walton C, Hoashi S and Evans M (2009). Breath acetone concentration decreases with blood glucose concentration in type I diabetes mellitus patients during hypoglycaemic clamps. J Breath Res 3(4): 046004.

Unterkofler K, King J, Mochalski P, Jandacka M, Koc H, Teschl S, Amann A and Teschl G (2015). Modeling-based determination of physiological parameters of systemic VOCs by breath gas analysis: a pilot study. J Breath Res 9(3): 036002.

Valera JL, Togores B and Cosio BG (2012). Use of the electronic nose for diagnosing respiratory diseases. Arch Bronconeumol 48(6): 187-188.

van de Kant KD, van Berkel JJ, Jobsis Q, Lima Passos V, Klaassen EM, van der Sande L, van Schayck OC, de Jongste JC, van Schooten FJ, Derks E, Dompeling E and Dallinga JW (2013). Exhaled breath profiling in diagnosing wheezy preschool children. Eur Respir J 41(1): 183-188.

van den Borst B, Gosker HR, Zeegers MP and Schols AM (2010). Pulmonary function in diabetes: a metaanalysis. Chest 138(2): 393-406.

Wallace MAG and Pleil JD (2018). Evolution of clinical and environmental health applications of exhaled breath research: Review of methods and instrumentation for gas-phase, condensate, and aerosols. Anal Chim Acta 1024: 18-38.

WAng C, Mbi A and Shepherd M (2010). A Study on Breath Acetone in Diabetic Patients Using a Cavity Ringdown Breath Analyzer: ExploringCorr elations of Breath Acetone With Blood Glucose and Glycohemoglobin A1C. IEEE Sensors Journal 10(1).

Wang Z and Wang C (2013). Is breath acetone a biomarker of diabetes? A historical review on breath acetone measurements. J Breath Res 7(3): 037109.

Wang Z and Wang C (2013). Is breath acetone a biomarker of diabetes? A historical review on breath acetone measurements. J Breath Res 7(037109).

Watson A, Soro-Paavonen A and Jandeleit-Dahm KAM (2010). AGE-RAGE signalling in endothelial dysfunction and atherosclerosis in diabetes. Endothelial dysfunction and inflammation: 161 - 174.

Wehinger A, Schmid A, Mechtcheriakov S, Ledochowski M, Grabmer C, Gastl GA and Amann A (2007). Lung cancer detection by proton transfer reaction mass-spectrometric analysis of human breath gas. Int J Mass Spectrom 265(1): 49-59.

Weynand B, Jonckheere A, Frans A and Rahier J (1999). Diabetes mellitus induces a thickening of the pulmonary basal lamina. Respiration 66(1): 14-19.

Worrall AD, Bernstein JA and Angelopoulos AP (2013). Portable method of measuring gaseous acetone concentrations. Talanta 112: 26-30.

Yazdanpanah M, Luo X, Lau R, Greenberg M, Fisher LJ and Lehotay DC (1997). Cytotoxic Aldehydes as Possible Markers for Childhood Cancer. Free Radical Bio Med 23(6): 870-878.

Ye M, Chien PJ, Toma K, Arakawa T and Mitsubayashi K (2015). An acetone bio-sniffer (gas phase biosensor) enabling assessment of lipid metabolism from exhaled breath. Biosens Bioelectron 73: 208-213.

Yokokawa T, Sato T, Suzuki S, Oikawa M, Yoshihisa A, Kobayashi A, Yamaki T, Kunii H, Nakazato K, Suzuki H, Saitoh S-i, Ishida T, Shimouchi A and Takeishi Y (2017). Elevated exhaled acetone concentration in stage C heart failure patients with diabetes mellitus. BMC Cardiovasc Disor 17(280).

Zheng P, Li Z and Zhou Z (2018). Gut microbiome in type 1 diabetes_a comprehensive review. Diabetes Metab Res Rev 34(e3043).

9 Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt Frau Professor Dr. Dagmar-Christiane Fischer für die Vergabe dieser Arbeit, ihren unermüdlichen Willen und ihre Unterstützungskraft auch in mühevollen Zeiten und ihre stets aufrichtige, fokussierte und aufmunternde Korrektur. In zahlreichen Gesprächen hat sie mir Kraft und Motivation geschenkt, die meinen Lebensweg nachhaltig prägen werden.

Ich danke Herrn Professor Dr. Jochen K. Schubert und Dr. Wolfram Miekisch, Dr. Phillip Trefz und der gesamten Arbeitsgruppe ROMBAT sowie Leokadia Fötisch für die Durchführung der Atemgasmessungen, die Bereitstellung der Versuchsmaterialien und Unterstützung während der Auswertung.

Großer Dank gilt der Endokrinologie und Diabetologie der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Rostock unter Leitung von Dr. Ulrike Jacoby und ihrem Team für die Begleitung der Patienten, insbesondere während der umfangreicheren Rekrutierungsphase.

Großer Dank gebührt zudem Frau Professor Dr. Astrid Bertsche, Regina Seiler und der gesamten Abteilung für Neuropädiatrie, die mir während der arbeitsbegleitenden Erarbeitung dieser Dissertation geduldig Freiräume in mehrfacher Hinsicht geschaffen und mir stets zuversichtlich und aufmunternd begegnet sind.

Darüber hinaus möchte ich diese Gelegenheit nutzen, um dem gesamten Kollegium der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der UMR meinen Dank für eine glückliche, lehrreiche und anregende Zeit auszusprechen.

Mein privates Umfeld hat mir in den Jahren räumlicher Trennung und reduzierter gemeinsamer Zeit immer liebend zur Seite gestanden. Ich bin meiner Familie und Freunden zutiefst dankbar für diese unermüdliche und bedingungslose Treue, warme positive Verstärkung, Zuversicht und Geduld.