

# **Technische Universität München**

## **Fakultät für Medizin**

Lehrstuhl für Diabetes und Gestationsdiabetes,  
Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München

### **INIT II-Atemgasstudie**

Julia Katharina Elisabeth Nyc

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfende/-r der Dissertation:

1. Prof. Dr. Anette-Gabriele Ziegler
2. Prof. Dr. Gerhard Schneider

Die Dissertation wurde am 19.12.2019 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 12.08.2020 angenommen.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b><u>EINLEITUNG .....</u></b>	<b><u>1</u></b>
<b>2.</b>	<b><u>ZIELSTELLUNG .....</u></b>	<b><u>3</u></b>
<b>2.1</b>	<b>ALLGEMEINE ZIELSTELLUNG .....</b>	<b>3</b>
<b>2.2</b>	<b>SPEZIFISCHE FRAGESTELLUNGEN .....</b>	<b>3</b>
<b>3.</b>	<b><u>GRUNDLAGEN.....</u></b>	<b><u>4</u></b>
<b>3.1</b>	<b>GRUNDLAGEN UND AKTUELLER STAND DER FORSCHUNG AUS DEM BEREICH TYP 1 DIABETES UND ANTIGENBASIERTER DIABETESPRÄVENTION .....</b>	<b>4</b>
3.1.1	ÄTIOLOGIE VON TYP 1 DIABETES .....	4
3.1.2	PATHOGENESE UND PRÄDIKTIVE MARKER VON TYP 1 DIABETES .....	5
3.1.3	IMMUNMODULATION DURCH ANTIGENTHERAPIE .....	6
<b>3.2</b>	<b>HORMONELLE WIRKUNGEN VON INTRANASAL VERABREICHTEM INSULIN .....</b>	<b>8</b>
3.2.1	PERIPHERE INSULINEFFEKTE .....	8
3.2.2	ZNS-VERMITTELTE INSULINEFFEKTE .....	8
<b>3.3</b>	<b>GRUNDLAGEN AUS DEM BEREICH DER ATEMGASANALYSE .....</b>	<b>10</b>
3.3.1	VOC-DEFINITION UND ALLGEMEINE GRUNDLAGEN .....	10
3.3.2	VOCS MIT KORRELATION ZUR BLUTGLUKOSEKONZENTRATION .....	11
<b>4.</b>	<b><u>MATERIAL- UND METHODEN.....</u></b>	<b><u>13</u></b>
<b>4.1</b>	<b>UNTERSUCHUNGSGRUPPE .....</b>	<b>13</b>
<b>4.2</b>	<b>STUDIENPRÄPARAT .....</b>	<b>14</b>
<b>4.3</b>	<b>MESSTMETHODE.....</b>	<b>15</b>
4.3.1	PROTONENTRANSFERREAKTIONS-MASSENSPEKTROMETRIE (PTR-MS).....	15
4.3.2	TRANSMISSIONSMESSUNG .....	18
4.3.3	ATEMLUFTSAMMLUNG .....	18
4.3.4	ZUORDNUNG VON MASEN ZU CHEMISCHEN STOFFEN: .....	21
<b>4.4</b>	<b>STUDIENAUFBAU .....</b>	<b>22</b>
<b>4.5</b>	<b>DURCHFÜHRUNG DER STUDIE .....</b>	<b>24</b>
4.5.1	STANDARDISIRTER ABLAUF DER VORBEREITUNG UND DER MESSUNGEN.....	24
4.5.2	DATENAUFZEICHNUNG UND -VERARBEITUNG .....	27
4.5.3	AUSWERTUNG DER DATEN UND STATISTIK .....	29
<b>5.</b>	<b><u>ERGEBNISSE .....</u></b>	<b><u>31</u></b>
<b>5.1</b>	<b>DYNAMIK DER BLUTZUCKERSPIEGEL.....</b>	<b>31</b>
5.1.1	DARSTELLUNG UND DESKRIPTION DER BLUTZUCKERDYNAMIKEN DER 9 PROBANDEN .....	31
5.1.2	UNTERSCHIEDE DER BLUTGLUKOSEDYNAMIKEN ZWISCHEN INSULIN- UND PLACEBOGRUPPE 32	
<b>5.2</b>	<b>ERGEBNISSE DER VOC-MESSUNGEN PER PTR-MS .....</b>	<b>33</b>
5.2.1	UNTERSUCHUNG DER 38 VARIABLEN .....	33
5.2.2	DYNAMIK DER 8 MASEN MIT DURCHGEHEND POSITIVEN DELTAWERTEN .....	35
5.2.2.1	m/z = 33 .....	35
5.2.2.2	m/z = 51 .....	38
5.2.2.3	m/z = 55 .....	41
5.2.2.4	m/z = 59 .....	44
5.2.2.5	m/z = 63 .....	47
5.2.2.6	m/z = 65 .....	49
5.2.2.7	m/z = 69 .....	52

5.2.2.8	m/z = 77 .....	55
5.2.3	ZUSAMMENFASSENDE VERGLEICH .....	56
5.2.4	PCA .....	57
<b>6.</b>	<b><u>INTERPRETATION DER DATEN UND DISKUSSION .....</u></b>	<b>60</b>
<b>6.1</b>	<b>GRUNDÜBERLEGUNGEN ZUR ZUORDNUNG VON MASSEN ZU STOFFWECHSELPRODUKTEN UND ZUR INTERPRETATION VON VOC-DYNAMIKEN DER INIT II-ATEMGASSTUDIE .....</b>	<b>60</b>
<b>6.2</b>	<b>ZUORDNUNG DER 8 ANALYSIERTEN MASSEN ZU STOFFWECHSELPRODUKTEN .....</b>	<b>61</b>
<b>6.3</b>	<b>BLUTGLUKOSEVERÄNDERUNGEN WÄHREND DER ATEMGASMESSUNGEN .....</b>	<b>61</b>
<b>6.4</b>	<b>INTERPRETATION UND DISKUSSION DER AUFGETRETENEN VOC-DYNAMIKEN .....</b>	<b>62</b>
6.4.1	m/z = 33 UND m/z = 51 MIT ZUORDNUNG ZU METHANOL .....	62
6.4.2	m/z = 59 MIT ZUORDNUNG ZU ACETON .....	63
6.4.3	m/z = 69 MIT ZUORDNUNG ZU ISOPREN .....	64
6.4.4	m/z = 77 .....	66
6.4.5	m/z = 55, m/z = 63 UND m/z = 65 .....	66
<b>6.5</b>	<b>DISKUSSION VON METHODE UND STUDIENAUFBAU: .....</b>	<b>66</b>
6.5.1	AUFTRETEN HOHER RAUMLUFTKONZENTRATIONSANTEILE .....	66
6.5.2	RAUMLUFTKORREKTURBERECHNUNG IN DIESER STUDIE.....	67
6.5.3	BASISLINIENKORREKTUR, AUC-WERTE UND -INTERVALLE ZUM VERGLEICH DER VOC- DYNAMIKEN.....	68
<b>6.6</b>	<b>AUSBLICK.....</b>	<b>69</b>
<b>7.</b>	<b><u>ZUSAMMENFASSUNG .....</u></b>	<b>71</b>
<b>8.</b>	<b><u>APPENDIX .....</u></b>	<b>74</b>
<b>9.</b>	<b><u>LITERATURVERZEICHNIS.....</u></b>	<b>82</b>
<b>10.</b>	<b><u>DANKSAGUNG.....</u></b>	<b>104</b>

# Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1:</b> Aufbau eines PTR-MS-Gerätes.....	16
<b>Abb. 2:</b> Aufbau eines Quadrupols.....	17
<b>Abb. 3:</b> Aufbau des BET-Atemluftsammlers.....	19
<b>Abb. 4:</b> Expirationsprofil eines protonierten Metaboliten (MH <sup>+</sup> ).....	20
<b>Abb. 5:</b> Gesamter Messaufbau: Messung und Aufzeichnung einer Expiration mittels eines BET-Atemluftsammlers und PTR-MS-Gerätes .....	21
<b>Abb. 6:</b> Auftrennung der Bereiche von Raumluft und abgeatmetem alveolärem Gasgemisch anhand der in der Expirationsluft enthaltenen Feuchtigkeit ( $m/z = 37$ ) beispielhaft dargestellt für Aceton ( $m/z = 59$ ).....	28
<b>Abb. 7:</b> Blutglukoseverlauf der 9 Probanden .....	31
<b>Abb. 8:</b> Konzentrationsmessungen von $m/z = 33$ .....	35
<b>Abb. 9:</b> Konzentrationsmessungen von $m/z = 51$ .....	38
<b>Abb. 10:</b> Konzentrationsmessungen von $m/z = 55$ .....	41
<b>Abb. 11:</b> Konzentrationsmessungen von $m/z = 59$ .....	44
<b>Abb. 12:</b> Konzentrationsmessungen von $m/z = 63$ .....	47
<b>Abb. 13:</b> Konzentrationsmessungen von $m/z = 65$ .....	49
<b>Abb. 14:</b> Konzentrationsmessungen von $m/z = 69$ .....	52
<b>Abb. 15:</b> Konzentrationsmessungen von $m/z = 77$ .....	55
<b>Abb. 16:</b> Positionierung der Probanden entlang der jeweils ersten drei Hauptkomponenten zu den untersuchten Zeitintervallen 30, 60, 90 und 120 Minuten.....	59

# Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 1:</b> Probandencharakterisierung .....	14
<b>Tab. 2:</b> Übersicht der analysierten Massen .....	23
<b>Tab. 3:</b> Einstellungen am PTR-MS-Gerät.....	26
<b>Tab. 4:</b> $m/z = 33$ : Initiales Delta zwischen Raumluftkonzentration und Atemluftkonzentration sowie initialer, minimaler, maximaler und durchschnittlicher Raumluftanteil bei den Messungen.....	36
<b>Tab. 5:</b> $m/z = 51$ : Initiales Delta zwischen Raumluftkonzentration und Atemluftkonzentration sowie initialer, minimaler, maximaler und durchschnittlicher Raumluftanteil bei den Messungen.....	39
<b>Tab. 6:</b> $m/z = 55$ : Initiales Delta zwischen Raumluftkonzentration und Atemluftkonzentration sowie initialer, minimaler, maximaler und durchschnittlicher Raumluftanteil bei den Messungen.....	42
<b>Tab. 7:</b> $m/z = 59$ : Initiales Delta zwischen Raumluftkonzentration und Atemluftkonzentration sowie initialer, minimaler, maximaler und durchschnittlicher Raumluftanteil bei den Messungen.....	45
<b>Tab. 8:</b> $m/z = 63$ : Initiales Delta zwischen Raumluftkonzentration und Atemluftkonzentration sowie initialer, minimaler, maximaler und durchschnittlicher Raumluftanteil bei den Messungen.....	48
<b>Tab. 9:</b> $m/z = 65$ : Initiales Delta zwischen Raumluftkonzentration und Atemluftkonzentration sowie initialer, minimaler, maximaler und durchschnittlicher Raumluftanteil bei den Messungen.....	50
<b>Tab. 10:</b> $m/z = 69$ : Initiales Delta zwischen Raumluftkonzentration und Atemluftkonzentration sowie initialer, minimaler, maximaler und durchschnittlicher Raumluftanteil bei den Messungen.....	53
<b>Tab. 11:</b> $m/z = 77$ : Initiales Delta zwischen Raumluftkonzentration und Atemluftkonzentration sowie initialer, minimaler, maximaler und durchschnittlicher Raumluftanteil bei den Messungen.....	56
<b>Tab. 12:</b> $m/z = 33$ : „Area under the curve“-Berechnung der Basislinien-korrigierten Deltawerte bis zu den 4 Vergleichszeitpunkten .....	74
<b>Tab. 13:</b> $m/z = 51$ : „Area under the curve“-Berechnung der Basislinien-korrigierten Deltawerte bis zu den 4 Vergleichszeitpunkten .....	74
<b>Tab. 14:</b> $m/z = 55$ : „Area under the curve“-Berechnung der Basislinien-korrigierten Deltawerte bis zu den 4 Vergleichszeitpunkten .....	75
<b>Tab. 15:</b> $m/z = 59$ : „Area under the curve“-Berechnung der Basislinien-korrigierten Deltawerte bis zu den 4 Vergleichszeitpunkten .....	75
<b>Tab. 16:</b> $m/z = 63$ : „Area under the curve“-Berechnung der Basislinien-korrigierten Deltawerte bis zu den 4 Vergleichszeitpunkten .....	76
<b>Tab. 17:</b> $m/z = 65$ : „Area under the curve“-Berechnung der Basislinien-korrigierten Deltawerte bis zu den 4 Vergleichszeitpunkten .....	76
<b>Tab. 18:</b> $m/z = 69$ : „Area under the curve“-Berechnung der Basislinien-korrigierten Deltawerte bis zu den 4 Vergleichszeitpunkten .....	77
<b>Tab. 19:</b> $m/z = 77$ : „Area under the curve“-Berechnung der Basislinien-korrigierten Deltawerte bis zu den 4 Vergleichszeitpunkten .....	77
<b>Tab. 20:</b> Übersicht über Eigenwerte, Anteile der erklärten Varianz und Faktorladungen der Hauptkomponenten (HK) der AUC-Daten des untersuchten Zeitabschnittes 30 Minuten.....	78
<b>Tab. 21:</b> Übersicht über Eigenwerte, Anteile der erklärten Varianz und Faktorladungen der Hauptkomponenten (HK) der AUC-Daten des untersuchten Zeitabschnittes 60 Minuten.....	79
<b>Tab. 22:</b> Übersicht über Eigenwerte, Anteile der erklärten Varianz und Faktorladungen der Hauptkomponenten (HK) der AUC-Daten des untersuchten Zeitabschnittes 90 Minuten.....	80
<b>Tab. 23:</b> Übersicht über Eigenwerte, Anteile der erklärten Varianz und Faktorladungen der Hauptkomponenten (HK) der AUC-Daten des untersuchten Zeitabschnittes 120 Minuten.....	81

# 1. Einleitung

Typ 1 Diabetes ist eine durch autoreaktive T-Zellen vermittelte Autoimmunerkrankung, bei der es durch die fortschreitende, selektive und irreversible Zerstörung von pankreatischen  $\beta$ -Zellen zu einem kompletten Funktionsverlust der Insulinsekretion kommt<sup>1,2</sup>. Insulin stellt dabei das primäre Antigen dar<sup>3-8</sup> bis im Rahmen des Antigenreadings auch weitere intra- und intermolekulare Bestandteilen von  $\beta$ -Zellen zu Angriffspunkten für das Immunsystem werden<sup>3,4,9,10</sup>. Bis die Insulinsekretion nicht mehr ausreicht um die Glukosehomöostase im Körper aufrecht zu erhalten und sich die Diabeteserkrankung manifestiert, verläuft das Autoimmungeschehen in einer prädiabetischen Phase über Monate und Jahre symptomlos<sup>11,12</sup>. In dieser Phase lassen sich bereits Autoantikörper im Blut nachweisen, die gegen spezifische Bestandteile von  $\beta$ -Zellen gerichtet sind und die je nach Art und Anzahl als wichtigste prädiktive und frühdiagnostische Marker von Typ 1 Diabetes gelten<sup>11,13</sup>. Während singuläre Autoantikörper auch nur transient auftreten können<sup>14</sup>, bedeutet der Nachweis multipler Autoantikörper, dass bereits das präklinische Stadium von Typ 1 Diabetes vorliegt<sup>15</sup>, dem nach Monaten bis Jahren die klinische Diabetesmanifestation folgt<sup>11</sup>. Die genaue Ursache für Beginn und Fortschreiten der autoimmunen Zerstörung von  $\beta$ -Zellen ist nach wie vor weitgehend unbekannt. Man geht davon aus, dass ein Zusammenspiel von prädisponierenden Genen mit weiteren größtenteils noch nicht evidenten exogenen Faktoren zur Entwicklung von Autoreaktivität führt<sup>16-19</sup>. Dabei ist weltweit ein Anstieg der Inzidenzrate von Typ 1 Diabetes zu verzeichnen<sup>20,21</sup>.

Primär und sekundär präventive Therapien, die entweder die Entstehung von Autoimmunität oder das Fortschreiten von Autoimmunität zu Typ 1 Diabetes verhindern sollen, sind deshalb Forschungsschwerpunkte. Neben einer antigenunspezifischen systemischen Immunsuppression, deren Einsatz aufgrund von Nebenwirkungen oft nicht gerechtfertigt ist, besteht ein weiterer Ansatz im Versuch durch die Administration von Autoantigenen wie Insulin oder Glutamatdecarboxylase (GAD) eine antigenspezifische Veränderung des Autoimmungeschehens zu bewirken und im Sinne einer negativen Vaccination eine Reetablierung von Immuntoleranz gegenüber Inselzellen zu induzieren<sup>22-25</sup>. Grundsätzlich eignen sich zur Vaccination subkutane Injektionen<sup>26-28</sup> und die mukosale Darbietung von Antigenen durch orale<sup>29-31</sup> oder intranasale<sup>27,32-34</sup> Gaben. Dabei ist neben der Induktion von klonaler Anergie<sup>35,36</sup> und Deletion<sup>37,38</sup> autoreaktiver T-Zellen einer der effektivsten Mechanismen der Immunmodulation eine durch regulatorische T-Zellen vermittelte „Bystander Suppression“<sup>22,33,39,40</sup>. Durch diese wird autoimmunes Geschehen in der Umgebung entsprechender Antigene unspezifisch und umfassend supprimiert, so dass auch Autoimmunreaktionen gegen weitere in der Nähe befindliche Zielantigene gehemmt werden. In einigen primär- und sekundärpräventiven Diabetesstudien zeigten sich bereits Effekte im Sinne einer Modulation des Autoimmungeschehens in Richtung Reetablierung von Immuntoleranz<sup>41-43</sup>, wie die Induktion regulatorischer T-Zellaktivität bei der Pre-POINT-Studie<sup>41</sup>. Diese Ergebnisse geben Hoffnung, dass durch weitere Studien ein Therapiemodus für die Antigengabe gefunden werden kann, der eine erfolgreiche Prävention von Typ 1 Diabetes verspricht.

Ein generelles Problem präventiver Studien ist die Tatsache, dass es Jahre dauert, bis sich Ergebnisse abzeichnen und dass es kaum Biomarker gibt, die das Autoimmungeschehen der Diabetespathogenese genauer reflektieren oder die eine sinnvolle Dosis, Applikationsart und Antigenverwendung zur Induktion von Immuntoleranzeffekten anzeigen können<sup>44,45</sup>.

Entsprechende Biomarker zu finden wäre ein bedeutender Schritt die Forschung bei der Entwicklung präventiver Therapien zu unterstützen. Da viele Marker, die aus biochemischen Vorgängen im Körper hervorgehen, durch Atemgasanalysen besser detektiert werden können als aus dem Blut<sup>46</sup> und sich non-invasiv, schnell und kostengünstig auch eine große Anzahl an Metaboliten untersuchen lässt, bieten Atemgasuntersuchungen ein besonderes Potential für das Finden von Biomarkern für die Diabetespräventionsforschung.

In der vorliegenden INIT(Intranasal Insulin Trial) II-Atemgasstudie kam die Methode deshalb erstmalig im Rahmen einer Diabetespräventionsstudie bei Kindern und Jugendlichen im prädiabetischen Stadium zum Einsatz. Ziel war es die Effekte von intranasalem Insulin auf Volatile Organic Compounds (VOCs; = flüchtige organische Verbindungen) der Atemluft per Protonentransferreaktions-Massenspektrometrie (PTR-MS) zu untersuchen.

## **2. Zielstellung**

### **2.1 Allgemeine Zielstellung**

Um aktuelle Möglichkeiten, Besonderheiten und Grenzen von Atemgasanalysen bei jüngeren Probanden im Rahmen einer Diabetespräventionsstudie besser kennen zu lernen, wurden in einer ersten Pilotstudie bei 9 Probanden der INIT(Intranasal Insulin Trial) II-Studie, einer randomisierten, doppelblinden, placebokontrollierten Phase II-Interventionsstudie, die Auswirkungen von intranasalem Insulin auf VOCs in der Atemluft per PTR-MS untersucht. Dazu wurde die Atemluftkonzentration von 38 vorausgewählten Massen nach der ersten Applikation des Studienpräparates (6 Insulin vs. 3 Placebo) über einen zweistündigen Messzeitraum in gewissen Zeitintervallen gemessen. Da durch die intranasale Gabe von Insulin Veränderungen des Blutzuckerspiegels bekannt sind und dieser im Stoffwechsel eine zentrale Rolle spielt, wurde auch die Dynamik des Blutzuckerspiegels der Probanden während des zweistündigen Messzeitraumes registriert und analysiert. Insbesondere wurden folgende Fragestellungen untersucht:

### **2.2 Spezifische Fragestellungen**

- 1) Wie gestaltet und unterscheidet sich die Dynamik des Blutzuckerspiegels bei den Probanden?
- 2) Wie gestaltet und unterscheidet sich die Dynamik der per PTR-MS untersuchten Metaboliten bei den Probanden? Welche Stoffwechselprodukte lassen sich den in dieser Studie analysierten Massen zuordnen und was könnte die Ursache für aufgetretene Dynamiken sein?
- 3) Welche Erkenntnisse ergeben sich aus der Studie hinsichtlich einer Einschätzung, ob sich Atemgasanalysen für die Suche nach Biomarkern für die Diabetespräventionsforschung eignen?

## 3. Grundlagen

### 3.1 Grundlagen und aktueller Stand der Forschung aus dem Bereich Typ 1 Diabetes und antigenbasierter Diabetesprävention

#### 3.1.1 Ätiologie von Typ 1 Diabetes

Die Ätiologie von Typ 1 Diabetes ist bis heute nicht genau geklärt. Man geht davon aus, dass ein Zusammenwirken von prädisponierenden Genen mit weiteren größtenteils noch nicht bekannten exogenen Faktoren für Beginn und Fortschreiten der Autoimmunreaktion gegen  $\beta$ -Zellen verantwortlich ist<sup>16-19</sup>. Familiäre Belastung gilt als starker Risikofaktor für die Entwicklung von Typ 1 Diabetes und erhöht das Risiko gegenüber Personen ohne familiäre Vorbelastung um etwa das Zehnfache<sup>47</sup>. Es sind mehr als 40 Genorte beschrieben<sup>48,49</sup>, die in Verbindung mit der Entwicklung von Typ 1 Diabetes gebracht werden. Bis auf einige Ausnahmen bei seltenen monogenen Autoimmunsyndromen wie APS-1 (autoimmune polyendocrine syndrome type 1)<sup>50</sup> oder IPEX (immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked)<sup>51,52</sup> wird bei der Entwicklung von Typ 1 Diabetes von einem polygenen Zusammenwirken ausgegangen<sup>17,47,48</sup>.

Vor allem der hoch polymorphe Human Leucocyte Antigen (HLA)-Komplex, der auf Chromosom 6 lokalisiert ist und funktionelle Unterschiede in der Präsentation von Peptidfragmenten an das Immunsystem bedingt, hat einen großen Einfluss auf das Diabetesrisiko<sup>17,47,53,54</sup>. Man geht davon aus, dass ungefähr 50% der genetischen Determination durch den HLA-Typ bestimmt sind<sup>55,56</sup>. Besonders die HLA II-Klasse steht in enger Assoziation zur Wahrscheinlichkeit einer Diabetesmanifestation. Das höchste Risiko ergibt sich aus den HLA-Genotypen DR3/DR4-DQ8 und HLA DR4-DQ8/DR4-DQ8<sup>47,57,58</sup>. Neben HLA-Typen, die ein erhöhtes Diabetesrisiko bedeuten, sind auch HLA-Allele bekannt, die protektiv wirken, so z. B. DRB1\*1501-DQA1\*0102-DQB1\*0602 und einige weitere<sup>59,60</sup>.

Da sich der Genpool aber nur langsam über viele Generationen hinweg verändert und sogar eine Abnahme des Anteils von Diabetespatienten mit Hochrisiko-HLA-Typen über die letzten Jahrzehnte beobachtet wurde<sup>61,62</sup>, kann der Anstieg der Diabetesinzidenz und die Beobachtung eines immer jüngeren Manifestationsalters nur durch eine Veränderung von Umweltbedingungen<sup>19,63,64</sup> bzw. durch Gen-Umwelt-Interaktionen und epigenetische Regulationsmechanismen<sup>16,65-67</sup> erklärt werden. Mehr als 90% der Typ 1 Diabetes-Patienten haben keine erstgradigen Verwandten, die ebenfalls von der Erkrankung betroffen sind<sup>47</sup> und bei nur etwa 5% der Personen mit HLA-Risikotypen manifestiert sich Typ 1 Diabetes<sup>19</sup>. Länderabhängige Variationen der Diabetesinzidenz innerhalb der kaukasischen Bevölkerung<sup>68,69</sup> und Migrationsstudien<sup>70-73</sup> weisen ebenfalls auf eine bedeutende Rolle von Umweltfaktoren bei der Entwicklung von Typ 1 Diabetes hin.

Die „Hygiene-Hypothese“, die 1989 erstmalig von Strachan aufgestellt wurde<sup>74</sup>, bietet die Erklärung, dass das Risiko für die Entwicklung von Typ 1 Diabetes, anderen Autoimmunerkrankungen und Allergien in Ländern mit gehobenem Hygienestandard deshalb gesteigert ist, weil es durch weniger Infektions- und Wurmerkrankungen zu einer verminderten Stimulation des Immunsystems und zu einer veränderten intestinalen Bakterienflora kommt<sup>75-78</sup>.

Besonders dem intestinalen Mikrobiom kommt durch die komplexe Beeinflussung von Immunantworten wohl eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung von Autoreaktivität zu<sup>79-84</sup>. Durch Faktoren, die die Beschaffenheit des intestinalen Mikrobioms prägen und verändern, wie Ernährung<sup>85</sup>, Antibiotikatherapien<sup>86,87</sup>, Probiotikaeinnahme<sup>88,89</sup> und grundlegend der Geburtsmodus (vaginal vs. Sectio caesarea)<sup>90-94</sup> kann ein direkter Effekt auf die Entwicklung von Typ 1 Diabetes nachgewiesen werden. Muttermilch wirkt sich durch ihre Zusammensetzung allgemein positiv auf die Entwicklung des intestinalen Mikrobioms eines Kindes aus<sup>95-98</sup>.

Hinsichtlich der Einführung komplexer Proteine in den Diätplan eines Säuglings konnte für die Gabe von glutenhaltigen Getreideprodukten vor dem dritten Lebensmonat ein Zusammenhang mit der Entwicklung von Typ 1 Diabetes nachgewiesen werden<sup>99-101</sup>. Wider erster Hinweise<sup>102</sup> konnten Knip et al. 2014 die kuhmilchproteinhaltige Ernährung betreffend in einer großangelegten internationalen Studie keinen Vorteil von hydrolysiertes gegenüber konventioneller Säuglingsmilch hinsichtlich der Entwicklung von Typ 1 Diabetes feststellen<sup>103</sup>.

Vitamin D scheint aufgrund seiner immunmodulatorischen Wirkung<sup>104-108</sup> einen bedeutenden protektiven Effekt auf die Entwicklung von Typ 1 Diabetes und anderer Autoimmunerkrankungen zu haben und seine Supplementierung stellt, wie Studien belegen<sup>109-111</sup>, einen vielversprechenden Ansatz zur Prävention von Typ 1 Diabetes dar. Auch für Omega-3-Fettsäuren ergaben sich erste Hinweise darauf, dass das Diabetesrisiko durch ihre Einnahme bei Personen mit genetischer Prädisposition gesenkt werden könnte<sup>112</sup>, in einer anderen Studie konnte dies jedoch nicht bestätigt werden<sup>113</sup>.

Schon seit längerer Zeit werden auch gewisse Infektionserkrankungen als möglicher Risikofaktor für die Entwicklung von Inselzellautoimmunität diskutiert, bisher konnte jedoch kein eindeutiger Zusammenhang nachgewiesen werden. Vor allem häufige Atemwegsinfekte in der frühen Kindheit scheinen das Risiko für die Entwicklung von Typ 1 Diabetes zu erhöhen<sup>114</sup>. Dabei sind wohl vor allem Infektionen mit Enteroviren von Bedeutung<sup>115-119</sup>. Möglicherweise bedingt die molekulare Ähnlichkeit mit viralen Antigenen eine Kreuzreaktivität oder gewisse Virusinfektionen aktivieren das angeborene Immunsystem so, dass die Entwicklung von Typ 1 Diabetes getriggert wird<sup>120</sup>.

### **3.1.2 Pathogenese und prädiktive Marker von Typ 1 Diabetes**

Bei Typ 1 Diabetes kommt es vermittelt durch T-Zell-Autoreaktivität zu einer irreversibel fortschreitenden selektiven Zerstörung von pankreatischen  $\beta$ -Zellen<sup>1,2</sup>. Nach einer Monate bis Jahre dauernden prädiabetischen Phase, die symptomlos verläuft<sup>11,12</sup>, manifestiert sich Typ 1 Diabetes klinisch dann, wenn der größte Teil der  $\beta$ -Zellen zerstört wurde und die  $\beta$ -Zell-Masse auf bis zu 10 %<sup>121,122</sup> reduziert ist, so dass die verbleibende Insulinproduktion nicht mehr ausreicht, um die Blutglukosehomöostase des Körpers aufrecht zu erhalten. Proteine, die durch autoreaktive CD8+-T-Zellen sezerniert werden, wie Perforin<sup>123-125</sup> und Granzym<sup>126</sup>, spielen eine bedeutende Rolle bei der Zerstörung von  $\beta$ -Zellen<sup>127-130</sup>. Insgesamt sind viele verschiedene Immunzellen in komplexen Interaktionen am Autoimmungeschehen beteiligt<sup>127,131-140</sup> und neben CD8+-T-Zellen können wohl auch weitere Zellen als Effektorzellen fungieren<sup>141-143</sup>. Man nimmt an, dass die Autoimmunantwort initial gegen Insulin als primäres  $\beta$ -Zell-Antigen gerichtet ist<sup>3-8</sup>. Im Verlauf der  $\beta$ -Zellzerstörung

kommt es im Rahmen des Antigenreadings dann zu einer Ausweitung der Autoimmunität auch gegen andere  $\beta$ -Zellbestandteile<sup>3,4,9,10</sup>.

Histologisches Korrelat der beginnenden und fortschreitenden Autoimmunreaktion gegen  $\beta$ -Zellen ist die entzündliche Infiltration der Langerhans' schen Inseln mit verschiedenen Immunzellen wie CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten, Antigen-präsentierende Zellen (APCs) wie Makrophagen und dendritische Zellen (DCs), B-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen (NK)<sup>141,144,145</sup>. Solche entzündlichen Infiltrate werden als Insulinitis<sup>146</sup> bezeichnet und treten in der prädiabetischen Phase schon Jahre vor der klinischen Manifestation auf<sup>1,147</sup>. Als Zeichen einer Insulinitis lassen sich gegen  $\beta$ -Zellbestandteile gerichtete Autoantikörper, die von autoreaktiven B-Lymphozyten sezerniert werden, peripher im Blut nachweisen<sup>147</sup>. Es existieren vier Autoantikörpertypen, die je nach aufgetretener Anzahl als wichtigste prädiktive und frühdiagnostische Marker von Typ 1 Diabetes gelten<sup>11,13</sup>. Zu diesen gehören Insulin-Autoantikörper (IAA)<sup>148</sup>, Glutamatdecarboxylase-Autoantikörper (GADA)<sup>149</sup>, Autoantikörper gegen Tyrosinphosphatase-homologe Inselantigene IA-2 und IA-2 $\beta$  (IA-2A und IA-2 $\beta$ A)<sup>150,151</sup> und Zinktransporter 8-Autoantikörper (ZnT8A)<sup>152</sup>. Singuläre Autoantikörper können auch nur transient auftreten<sup>11,14,153</sup>. Wenn ein Autoantikörpertyp nachgewiesen werden kann, erhöht sich allerdings das Risiko für die Entwicklung weiterer<sup>11,14</sup>. Treten multiple Autoantikörper auf, liegt bereits das präklinische Stadium von Typ 1 Diabetes vor<sup>15</sup>, dem nach Monaten bis Jahren die klinische Diabetesmanifestation folgt<sup>11</sup>. So haben Kinder mit familiärem Risiko für Typ 1 Diabetes, die multiple Inselautoantikörper aufweisen, ein Diabetesmanifestationsrisiko von etwa 70% innerhalb der nächsten 10 Jahre, nach 20 Jahren sind es nahezu 100%<sup>11</sup>. Neben der Anzahl der aufgetretenen Autoantikörper spielen für eine genauere zeitliche Prädiktion des Progressionsrisikos Informationen über die Antigen/Epitop-Spezifität, Affinität, Titerhöhe und das Immunglobulin-Subklassenmuster der Inselautoantikörper sowie Alter, Geschlecht, genetische Informationen und metabolische Parameter eine Rolle<sup>11,14,15,147</sup>. Im Gegensatz zur Messung von Autoantikörpern sind T-Zellen, die gegen  $\beta$ -Zellbestandteile gerichtet sind, in der peripheren Blutzirkulation nur schwierig zu detektieren<sup>154,155</sup>. Auch andere Biomarker, die die Pathogenese im Pankreas widerspiegeln sind immer noch weitgehend unbekannt<sup>147</sup>.

### 3.1.3 Immunmodulation durch Antigen-therapie

Bei Autoimmunerkrankungen reagiert das Immunsystem durch eine Dysregulation auf bestimmte körpereigene Antigene wie auf körperfremde Stoffe und bewirkt eine Zerstörung von Antigen enthaltenden Strukturen. Schon vor einigen Jahrzehnten wurde bekannt, dass durch die systemische Applikation entsprechender Autoantigene die Entstehung von Immuneffekten gegenüber körpereigenen Antigenen verhindert werden kann<sup>22-25</sup>. In einer großen Zahl an Studien konnten für Tiermodelle Therapiestrategien gefunden werden, die Schutz vor entsprechenden Autoimmunerkrankungen bieten<sup>156</sup>.

Neben subkutanen Injektionen<sup>26-28</sup> hat sich auch die mukosale Darbietung eines Antigens durch orale<sup>29-31</sup> oder intranasale<sup>27,32-34</sup> Administration als effektiv für die Immunmodulation erwiesen. Bei der mukosalen Darbietung werden Autoantigene über die nasalen bzw. intestinalen Schleimhäute

aufgenommen und Immunzellen des Schleimhaut-assoziierten lymphatischen Gewebes und lokaler Lymphknoten vermitteln via Antigenpräsentation Effekte auf das Immunsystem<sup>157-162</sup>. Dabei spielen dendritische Zellen wohl eine wichtige Rolle<sup>157-160,163-166</sup>. Man nimmt an, dass die evolutionäre Grundlage des oralen Immuntoleranzmechanismus in der Verhinderung von hypersensitiven Reaktionen gegen Nahrungsproteine und Darmbakterienantigene begründet liegt<sup>167,168</sup>. Orales Insulin wird eher schnell im Magen zersetzt und die Bioverfügbarkeit im oberen Dünndarmsegment kann nicht vorhergesagt werden<sup>169</sup>. Die intranasale Applikation bietet dazu eine Alternative mit größerer Bioverfügbarkeit von Insulin für das Immunsystem<sup>156,170</sup>.

Eine Autoantigenadministration bewirkt neben klonaler Anergie<sup>35,36</sup> und Deletion<sup>37,38</sup> autoreaktiver T-Zellen die Induktion verschiedener regulatorischer T-Zellen<sup>22</sup>. Anergie ist definiert als ein antigenspezifisches Ausbleiben von Immunantworten<sup>36</sup>. Anergie T-Zellen können auch aktiv die Immunantwort anderer T-Zellen supprimieren<sup>171</sup>. Die Deletion von T-Zellen wird durch Apoptose bedingt<sup>37,38</sup> und führt schließlich ebenfalls zu einer verminderten Antwort des Immunsystems auf Stimulation. Die Mechanismen von Anergie und Deletion wurden vor allem im Rahmen von Studien mit eher hochdosierten oralen<sup>36,37</sup> und subkutan applizierten Antigenen<sup>38</sup> untersucht. Um auf diese Art Immuntoleranz gegenüber Autoantigenen längerfristig aufrecht zu erhalten, ist es notwendig entsprechende Antigene kontinuierlich zu verabreichen<sup>28,172</sup>.

Durch die Induktion verschiedener regulatorischer T-Zellen können immunmodulatorische Effekte durch eine mukosale Administration von Antigenen in verhältnismäßig niedrigerer Dosierung auch langfristig etabliert werden, ohne dass die Antigene kontinuierlich gegeben werden müssen<sup>22,167,173</sup>. Dabei sind sowohl die von regulatorischen T-Zellen sezernierten anti-inflammatorischen Zytokine wie IL 10 und TGF- $\beta$ , als auch die direkte Beeinflussung anderer Immunzellen via Zell-Zell-Kontakt für die Immunmodulation ausschlaggebend<sup>22,174-178</sup>. Regulatorische T-Zellen supprimieren die potentiell schädliche Aktivität von T-Helferzellen<sup>179</sup>. Sie wirken regulatorisch auf T-Effektorzellen, indem sie die T-Zellproliferation verhindern und die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine blockieren<sup>22</sup>. Zudem werden durch einige regulatorische T-Zellen weitere regulatorische T-Zellsubpopulationen induziert<sup>22</sup>. Insgesamt bewirken regulatorische T-Zellen so im entsprechenden Antigen enthaltenden Zielorgan eine „Bystander Suppression“<sup>39</sup> in der Umgebung des Antigens und vermitteln eine umfassende non-spezifische Supprimierung entzündlicher autoimmuner Prozesse<sup>22,33,40</sup>.

Man nimmt an, dass Insulin nicht nur beim murinen immunvermittelten sondern auch bei humanem Typ 1 Diabetes als primäres Autoantigen fungiert<sup>3-6</sup>. Im Rahmen der autoimmunen Progression kommt es zu einer Ausweitung der T-Zell-Autoreaktivität gegen weitere intra- und intermolekulare Bestandteilen von humanen  $\beta$ -Zellen<sup>3,4,10</sup>, wie Glutamatdecarboxylase (GAD65), Tyrosin-Phosphatase-homologem Insel-Antigen-2 (IA-2), Glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related Protein (IGRP) und weitere<sup>9</sup>. In Studien wird jedoch meist nur ein Antigen verabreicht, da regulatorische T-Zellen im Rahmen der Bystander-Suppression in der Umgebung des entsprechenden Antigens umfassend unspezifisch entzündliche autoimmune Prozesse supprimieren<sup>33,40,156,180</sup>. Studien an Tiermodellen legen nahe, dass besonders eine frühe

Autoantigen-Administration effektiv ist, d.h. möglichst vor der Entstehung von Autoimmunität oder zu einem frühen Zeitpunkt des Autoimmungeschehens<sup>33,181,182</sup>.

Studien mit mukosal appliziertem Antigen beim Menschen zeigen, dass eine Anwendung als sicher eingestuft werden kann<sup>43</sup> und dass grundsätzlich Immuneffekte wie die Induktion regulatorischer T-Zellaktivität<sup>41,183</sup> sowie eine verminderte Insulin-spezifische T-Zellantwort<sup>43,184</sup> hervorgerufen werden können. Außerdem wiesen Subgruppenanalysen auf mögliche Erfolge hin<sup>42,185</sup>. Bis jetzt konnte aber kein Therapiemodus gefunden werden, der die Manifestation von humanem Typ 1 Diabetes bei Risikopatienten erfolgreich verhindert oder verzögert<sup>23</sup>.

## **3.2 Hormonelle Wirkungen von intranasal verabreichtem Insulin**

### **3.2.1 Periphere Insulineffekte**

Schon seit einiger Zeit besteht Interesse herauszufinden, ob sich die intranasale Applikation von Insulin als therapeutische Alternative zu subkutanen Injektionen eignet. Deshalb wurden in verschiedenen Studien vor allem die Effekte von intranasal verabreichtem Insulin auf den Blutzuckerspiegel sowohl bei gesunden Freiwilligen als auch bei Probanden mit Typ 1 oder Typ 2 Diabetes untersucht<sup>170,186-193</sup>. Die Antwort auf intranasales Insulin weist eine gewisse Variabilität auf<sup>186,190</sup>. Etwa 10-20 Minuten nach intranasaler Gabe können die höchsten Plasmakonzentrationen von Insulin verzeichnet werden<sup>186</sup>. Nach ca. 10 Minuten beginnt der Blutzuckerspiegel zu fallen, nach etwa 30-40 Minuten werden tiefste Werte erreicht und nach etwa 80-100 Minuten kommt es wieder zum Blutglukoseanstieg ungefähr auf Ausgangsniveau<sup>186-190</sup>. Daneben sind mit entsprechendem Ausmaß natürlich auch die vielfältigen weiteren systemischen Wirkungen von Insulin auf den Stoffwechsel zu verzeichnen<sup>188,189</sup>.

Aufgrund der geringen systemischen Bioverfügbarkeit von intranasal appliziertem Insulin und lokaler Schleimhautirritationen ließ sich bis jetzt jedoch kein marktfähiges Insulinspray entwickeln, das eine subkutane Insulintherapie ersetzen kann<sup>186,194</sup>. Die systemische Bioverfügbarkeit von intranasalem Insulin ohne absorptionsfördernde Zusätze beträgt nur 1-2% und selbst mit absorptionsfördernden Substanzen ist sie in der Regel nicht größer als 10-15%<sup>186,188,190,195</sup>.

### **3.2.2 ZNS-vermittelte Insulineffekte**

Neben der Wirkung von systemischem Insulin in der Peripherie können Insulineffekte grundsätzlich auch zentralnervös durch das Gehirn als Insulin-sensitives Organ<sup>196</sup> vermittelt werden. Die Besonderheit nach intranasaler Applikation von Insulin besteht darin, dass ZNS-vermittelte Effekte in einem verhältnismäßig höheren Ausmaß auftreten. Physiologisch erreicht systemisches Insulin das Gehirn wahrscheinlich hauptsächlich über einen sättigbaren, rezeptorvermittelten Transportmechanismus<sup>197,198</sup> und bindet an Rezeptoren, die vor allem im Cortex, Bulbus olfactorius, Kleinhirn, Hippocampus und Hypothalamus lokalisiert sind<sup>199</sup>. Es kommt dabei verzögert zu einem langsamen Übertritt von Insulin aus dem Blut in den cerebrospinalen Liquor mit nachweislichen Konzentrationsanstieg im Liquor etwa 90 Minuten nach einem Anstieg der Insulinkonzentration im Blut<sup>200</sup>. Nach intranasaler Applikation von Insulin kommt es schon innerhalb von 10 Minuten

wahrscheinlich vor allem via extraneuronaler Diffusion über das Epithel des N. olfactorius und des N. trigeminus zu einem Anstieg der Insulinkonzentration im Liquor<sup>201,202</sup>.

Insulin spielt eine bedeutende Rolle bei zentralnervös vermittelten Funktionen wie der neuroendokrinen Kontrolle des Energiehaushaltes oder einer Beteiligung an kognitiven Prozessen<sup>197,198,203</sup>. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass einige der ZNS-vermittelten Effekte den entsprechenden Insulineffekten in der Peripherie entgegen gerichtet sind und Insulin so in gewissem Maße als sein eigenes gegenregulatorisches Hormon wirkt<sup>204</sup>. Nach intranasaler Gabe von Insulin kann beispielsweise ein Abfall der postprandialen Serum-Insulinkonzentration und eine Veränderung der Insulinsensitivität in der Körperperipherie beobachtet werden<sup>205,206</sup>. Die peripheren Insulinsensitivität fällt nach intranasaler Insulinapplikation und ist nach 30 Minute signifikant niedriger als zuvor, nach 60 Minuten steigt sie wieder auf Ausgangsniveau und nach 120 Minuten kann eine signifikante Erhöhung der peripheren Insulinsensitivität verzeichnet werden<sup>206</sup>. Der physiologische Grund für dieses Phänomen könnte sein, dass unmittelbar nach Nahrungsaufnahme ein überschießender Insulineffekt abgemildert und in einer späteren postprandialen Phase noch eine verbesserte Wirkung des Hormons gewährleistet werden soll<sup>206</sup>. Es besteht dabei eine Korrelation zwischen Veränderungen der peripheren Insulinsensitivität und regionaler Gehirn-Aktivität in belohnungsassoziierten Arealen<sup>206</sup>. Ob die entsprechenden Gehirnregionen in die biphasischen Veränderung der peripheren Insulinsensitivität involviert sind und auf welchem Wege genau die ZNS-vermittelten Insulineffekte umgesetzt werden, ist noch unklar<sup>206</sup>. Eine Beteiligung der Hypothalamus-Hypophysen-Achse konnte nicht bestätigt werden und es wird eine Regulation durch das autonome Nervensystem diskutiert<sup>206</sup>. Durch die Aktivierung hypothalamischer ATP-sensitiver Kalium-Kanäle und vagaler hepatischer Efferenzen vermittelt Insulin auch über das ZNS eine Inhibition der hepatischen Glukoneogenese<sup>207-210</sup>. Dieser Effekt scheint physiologisch jedoch nicht essentiell für die schnelle Inhibition der endogenen Glukoseproduktion in Zeiten einer Hyperinsulinämie zu sein<sup>207,211</sup>. Des Weiteren bewirkt intranasales Insulin zentralnervös-vermittelt postprandial eine Steigerung der Thermogenese und ruft einen vorübergehenden Abfall von freien Fettsäuren hervor<sup>205</sup>. Schon lange wird angenommen, dass Insulin die Menge der Nahrungsaufnahme moduliert und so die Aufrechterhaltung eines konstanten Körpergewichtes gewährleistet<sup>212,213</sup>. Dahingehend zeigt sich, dass Männer direkt nach der intranasalen Applikation von Insulin eine geringere Nahrungsmenge zu sich nehmen<sup>214</sup>. Frauen scheinen nicht so empfänglich für diesen Effekt zu sein und er ist bei ihnen nicht zu beobachten<sup>214</sup>. Bei Frauen kann nach einmaliger intranasaler Insulingabe aber eine vorübergehende Verbesserung der Hippocampus-involvierten Erinnerungsfunktion nachgewiesen werden<sup>214</sup>.

Auch längerfristige Veränderungen durch wiederholte intranasale Insulingaben sind bekannt. So kommt es bei Männern zu einer Abnahme des Körpergewichtes, des Körperfettes sowie des Leptin-Spiegels<sup>215</sup>. Frauen hingegen verlieren nicht an Körperfett und es kommt durch einen Anstieg des Gehaltes an extrazellulärem Wasser sogar zu einer Gewichtszunahme<sup>215</sup>. Bei Frauen und Männern kann durch die Langzeitgabe von intranasalem Insulin eine Verbesserung des Hippocampus-abhängigen deklarativen Gedächtnisses sowie eine allgemeine Verbesserung der Stimmung

beobachtet werden<sup>216,217</sup>. Diese Effekte könnten in der Therapie von Alzheimerpatienten von Nutzen sein<sup>203,218,219</sup>, da man annimmt, dass reduzierte zentralnervös-vermittelte Insulineffekte zu den mit der Erkrankung verbundenen kognitiven Defiziten beitragen<sup>220,221</sup>. Auch bei Typ 2 Diabetes und Übergewicht, die durch eine Störung des metabolischen Gleichgewichtes wohl mitbedingt durch eine Insulinresistenz im Gehirn<sup>222-224</sup> hervorgerufen sind, wäre intranasales Insulin als Therapieoption denkbar<sup>203,222</sup>.

### 3.3 Grundlagen aus dem Bereich der Atemgasanalyse

#### 3.3.1 VOC-Definition und allgemeine Grundlagen

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Analyse von Metabolitprofilen in der Atemluft einer Probandengruppe aus dem Kollektiv der Diabetespräventionsstudie INIT II. Per Protonentransferreaktions-Massenspektrometrie (PTR-MS) wurden dafür Konzentrationen bestimmter Volatiler Organic Compounds (VOCs), d. h. flüchtiger organischer Verbindungen gemessen. Bei VOCs handelt es sich um eine große Gruppe organischer, d. h. kohlenstoffhaltiger Substanzen, die die Eigenschaft besitzen, schon bei niedrigen Temperaturen durch einen niedrigen Siedepunkt im gasförmigen Zustand vorzuliegen. Viele anthropogene und biogene Vorgänge führen zu einer VOC-Emission in die Umgebung. Lösemittelanwendung und Straßenverkehr stellen dabei die wichtigsten anthropogenen Ursprünge dar. Durch biochemische Vorgänge bei allen Lebewesen und Pflanzen, sowie organische Prozesse in Böden und Meeren werden biogene VOCs generiert. In der menschlichen Atemluft konnten über 3000 verschiedene VOCs in unterschiedlicher Konzentration nachgewiesen werden<sup>225,226</sup>. Dabei kommt es in der Zusammensetzung zu großen interindividuellen Unterschieden und es können durchschnittlich etwa 200 verschiedene VOCs gemessen werden<sup>225,226</sup>. Diese Substanzen sind zum Teil endogenen Ursprungs, das heißt, sie stammen aus biochemischen Vorgängen im Körper, gelangen mit dem Blutstrom zur Lunge und diffundieren über die schmale Blut-Gas-Barriere zwischen pulmonalen Kapillaren und Alveoli, die nur ca. 200-400 nm dick ist<sup>227</sup>, in die Expirationsluft<sup>228,229</sup>. Zum anderen Teil stellen sie ein Spektrum exogener Stoffe dar, die aus der Umgebungsluft stammend in die Atemluft aufgenommen wurden<sup>230</sup>. Durch eine Analyse der Zusammensetzung der Atemluftbestandteile können non-invasiv Aufschlüsse über metabolische Vorgänge im Körper gewonnen werden<sup>231</sup>. Zur Messung der VOC-Konzentrationen stehen verschiedene Messverfahren zur Verfügung<sup>231,232</sup>. Zum einen findet die Gas-Chromatografie Anwendung, bei der die Atemluftbestandteile anhand ihrer unterschiedlichen chemischen und physikalischen Eigenschaften analysiert werden. Des Weiteren kommen massenspektrometrische Verfahren zum Einsatz, bei der das Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) der einzelnen VOCs ausschlaggebend für eine Auftrennung der Bestandteile ist. Ihren Ursprung nehmen die modernen Atemgasanalysen im Jahre 1971, als Paulig et al etwa 250 Komponenten der Expirationsluft per Gas-Chromatografie bestimmten<sup>233</sup>. Probleme bereitete für mehr als zehn Jahre die Separation und Identifikation der einzelnen Substanzen, danach gewann die Fragestellung nach der physiologischen Bedeutung und Korrelation mit der gesundheitlichen Verfassung eines Probanden mehr und mehr an Bedeutung<sup>234</sup>. Voraussetzung für Aussagen über

metabolische oder pathologische Prozesse ist es, den jeweils endogenen Anteil einer Substanz zu bestimmen und zugrunde liegende biochemische Stoffwechselwege zu kennen. Die genaue biochemische Herkunft ist allerdings nur für eine sehr kleine Anzahl an VOCs bekannt<sup>231,235</sup>. Durch vielfältige Einflüsse auf gemessene VOC-Konzentrationen in der Atemluft<sup>232,236-242</sup> und die Komplexität, die hinter der Ermittlung des endogenen Anteils eines VOC an seiner gesamten gemessenen Atemkonzentration steht<sup>243</sup>, ist die Entwicklung von allgemeinen Standards zur Atemgassammlung und -analyse noch immer nicht gelungen und dringend notwendig um zuverlässige und vergleichbare Daten generieren zu können<sup>232,235</sup>. Neben *Helicobacter pylori*-Infektionen sowie Fructose- und Lactoseintoleranzen, bei deren Diagnostik die Messung von gewissen Testbestandteilen in der Atemluft im klinischen Alltag regelmäßig Anwendung findet, weisen Studien darauf hin, dass auch die Untersuchung von generell in der Atemluft vorkommenden VOCs ein großes Potential zur non-invasiven, schnellen und kostengünstigen Diagnostik vieler Erkrankungen wie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen, Typ 1 und Typ 2 Diabetes mellitus, pulmonaler Erkrankungen wie Asthma bronchiale und COPD, kardiovaskulärer Erkrankungen, Leberpathologien, Nierenerkrankungen und verschiedener onkologischer Erkrankungen bietet<sup>231,235</sup>. Viele der entsprechenden volatilen Marker wären nämlich, auch wenn ihre genaue biochemische Herkunft zum Teil unbekannt ist, nur schwierig direkt aus dem Blut zu detektieren<sup>46</sup>.

### 3.3.2 VOCs mit Korrelation zur Blutglukosekonzentration

Kenntnisse über VOCs, die mit der Blutglukosekonzentration korrelieren sind für diese Arbeit von besonderem Interesse. Da im Forschungsbereich „Diabetes mellitus“ ein großes Bestreben besteht, das Monitoring des Blutzuckerspiegels durch die Analyse von Atemluftbestandteilen zu erleichtern, sind VOCs, die in Zusammenhang mit dem Glukosestoffwechsel stehen und ihr dynamisches Verhalten bei Veränderungen des Blutzuckerspiegels in zahlreichen Studien untersucht worden<sup>244-247</sup>. Aceton, das im Rahmen der Ketogenese durch Oxidation aus freien Fettsäuren gebildet wird, ist eines der Stoffwechselprodukte, dessen Entstehung in engem Zusammenhang mit dem Glukosestoffwechsel steht<sup>248,249</sup>. Zur Regulierung eines steigenden bzw. erhöhten Blutzuckerspiegels wird Insulin ausgeschüttet, welches die Ketonkörperproduktion hemmt und den Abbau von Ketonkörpern fördert<sup>250</sup>. Die Konzentration von Aceton in der Atemluft korreliert deshalb in der Regel invers mit der Blutglukosekonzentration<sup>248,249,251</sup>. Da das Verhältnis zwischen Glukosekonzentration im Blut und Acetonkonzentration in der Atemluft aber stark variiert, ist eine Berechnung der Blutglukosekonzentration allein anhand einer gewissen Atemluftacetonkonzentration nicht möglich<sup>251,252</sup>. Weitere VOCs, die mit dem Blutzuckerspiegel korrelieren, sind Methylnitrate, die im Rahmen von oxidativem Stress gebildet werden und vermehrt nach fettreichem Essen anfallen<sup>253</sup>, Ethanol<sup>249</sup> und Methanol<sup>254</sup>, die vor allem durch die anaerobe Fermentation von Nahrungsbestandteilen durch Darmbakterien entstehen<sup>249,255,256</sup> und Propan, welches ebenfalls durch Darmfloraaktivität generiert wird<sup>254</sup>. Auch für Kohlenstoffmonoxid<sup>257</sup>, Ethylbenzene<sup>254,258</sup>, 2-Pentylnitrate<sup>254</sup> sowie M/P- und O-xylene<sup>258</sup> ist eine Korrelation zum Blutzuckerspiegel beschrieben. Die gleichzeitige Atemgasanalyse von Aceton in

Kombination mit Methylnitrat, Ethanol und Ethylbenzenen<sup>254,258</sup> oder mit 2-Pentyl Nitrat, Methanol und Propan<sup>254</sup> ermöglicht eine relativ exakte Abschätzung des Blutzuckerspiegels. Allerdings lässt sich die Blutglukosekonzentration durch diese Parameter in hypoglykämischen Phasen nicht bestimmen<sup>254</sup>. Auch bei Normo- und Hyperglykämie wäre aufgrund großer interindividueller Unterschiede für die potentielle Nutzung eines entsprechenden Messsystems eine regelmäßige individuelle Eichung notwendig<sup>254</sup> und bis jetzt sind noch keine marktfähigen Messgeräte entwickelt worden<sup>228</sup>.

## 4. Material- und Methoden

### 4.1 Untersuchungsgruppe

Die Untersuchungsgruppe der vorliegenden Pilotstudie wurde aus dem Probandenkollektiv der INIT II-Studie (A randomised, double-blind, placebo-controlled trial of intranasal insulin (440IU) in children and young adults at risk of type 1 diabetes: INTRANASAL INSULIN TRIAL II. EudraCT Number: 2009-017329-20) rekrutiert. Die INIT II-Studie ist eine randomisierte placebokontrollierte doppelblinde Phase-II-Interventionsstudie, in der die Auswirkungen von intranasal verabreichtem Insulin zu Präventionszwecken bei Kinder und jungen Erwachsenen mit genetischem Risiko für Typ 1 Diabetes im prädiabetischen Stadium untersucht wurden. An der INIT II waren weltweit insgesamt 10 Studienzentren beteiligt mit Beginn in Australien/Neuseeland ab 2006 und mit Teilnahme der Forschergruppe Diabetes der Technischen Universität München in Deutschland ab 2012. Die wichtigsten Einschlusskriterien der INIT-II-Studie waren eine erstgradige (Einschlussalter 4 bis 30 Jahre) oder zweitgradige (Einschlussalter 4 bis 20 Jahre) Verwandtschaft zu einer Person, bei der vor dem 40. Lebensjahr Typ 1 Diabetes diagnostiziert wurde mit gleichzeitigem Nachweis von zwei oder mehr positiven Inselautoantikörpern im Serum der potentiellen Studienteilnehmer. Sowohl der orale Glukosetoleranztest (oGTT) als auch die Messung der frühen Insulinsekretion [„First-Phase Insulin Release (FPIR)“] nach intravenösem Glukosetoleranztest (ivGTT) der Probanden musste für den Einschluss in die Studie im Normbereich liegen. Außerdem wurde ein ggf. zu niedriger Vitamin-D-Spiegel vor Studieneinschluss behandelt und auf Normwerte gebracht, weil ein Zusammenhang zwischen zu niedrigem Vitamin-D-Spiegel und der Entwicklung von Typ1 Diabetes bekannt ist<sup>109,110</sup>. Das Risiko einer klinischen Diabetesmanifestation innerhalb der nächsten 10 Jahren betrug für die INIT II-Studienteilnehmer etwa 70 %<sup>11</sup>.

Aus dem INIT II-Probandenkollektiv wurde für die vorliegende Pilotstudie bei 9 Probanden zusätzlich die Auswirkung des Studienpräparates auf Metaboliten in der Atemluft untersucht. Die INIT II-Atemgasstudie wurde am 23.01.2012 von der Ethikkommission der Technischen Universität München unter der Projektnummer 5215/11 genehmigt. Vor Durchführung der Studie gaben die gesetzlichen Vertreter der minderjährigen Probanden ihre schriftliche Einwilligung, nachdem sie über Zweck, Methoden und Ablauf der Studie aufgeklärt worden waren. Die Atemgasmessungen fanden nach Randomisierung und unmittelbar nach der ersten Anwendung des zugeteilten Studienpräparates im Studienzentrum der Forschergruppe Diabetes der Technischen Universität München statt. Zu diesem Zeitpunkt waren die Probanden nicht nüchtern. Die 9 Studienteilnehmer der INIT-II-Atemgasstudie waren zum Untersuchungszeitpunkt zwischen 4 und 15 Jahre alt (Median 11 Jahre), von ihnen waren 2 weiblich (w) und 7 männlich (m). Für die Dauer der INIT II-Studie war ursprünglich für jedes teilnehmende Zentrum jeweils ein Zeitraum von 10 Jahren bis zur Entblindung und Auswertung geplant. Nach einer verblindeten Zwischenauswertung, die bezüglich der klinischen Manifestation von Typ 1 Diabetes keinen Vorteil der Insulinbehandlung gegenüber Placebo ergab, wurde die INIT II-Studie jedoch am 31.05.2016 in

allen Studienzentren vorzeitig beendet. Die Ergebnisse der Entblindung erhielt die Forschergruppe Diabetes der Technischen Universität München im Oktober 2017.

Die Entblindung der Studie ergab, dass 6 Probanden der INIT II-Atemgasstudie ein insulinhaltiges Studienpräparat und 3 Probanden Placebo erhalten hatten.

Eine Übersicht der Probandencharakterisierung der INIT II-Atemgasstudie befindet sich in untenstehender Tabelle (Tab. 1).

**Tab. 1:** Probandencharakterisierung

Proband		Alter	Geschlecht	Gewicht	Körpergröße
1	Insulin	14 J.	w	48,4 kg	1,54 m
2	Placebo	12 J.	m	55,0 kg	1,61 m
3	Placebo	11 J.	m	50,0 kg	1,61 m
4	Insulin	7 J.	w	22,0 kg	1,18 m
5	Placebo	4 J.	m	19,5 kg	1,03 m
6	Insulin	9 J.	m	40,0 kg	1,43 m
7	Insulin	11 J.	m	36,5 kg	1,49 m
8	Insulin	11 J.	m	50,0 kg	1,59 m
9	Insulin	15 J.	m	63,8 kg	1,74 m

## 4.2 Studienpräparat

Das verwendete Studienpräparat nennt sich DV001. Es handelt sich dabei um eine Lösung, die vom Melbourne Health and Diabetes Vaccine Development Centre als mukosaler Impfstoff zu Forschungszwecken entwickelt wurde. Die im DV001-Präparat enthaltene aktive Substanz ist humanes Insulin (40 mg/ml = 1100 IU/ml), das mittels rekombinanter DNA-Technologie in *Saccharomyces cerevisiae* hergestellt wurde (NovoNordisk A/S Novo Allè 2880 Bagsvaerd Dänemark). Daneben sind Zusätze von Benzalkoniumchlorid (0,06 mg/ml) und Glycerol (16 mg/ml) enthalten. Das abgegebene Placebopräparat enthält lediglich Benzalkoniumchlorid und Glycerol in derselben Konzentration wie im Insulinspray.

Bei der INIT II-Studie erhalten die Probanden eine intranasale Insulindosis von insgesamt 440 IU pro Anwendung zunächst einmal täglich für eine Woche, dann einmal wöchentlich für ein Jahr. Zu Beginn der INIT II-Studie gab es aufgrund fehlender Vorstudien zu einem Präparat mit derselben Zusammensetzung wie in DV001 und dem gleichen Anwendungsmodus keine Daten zu Aufnahme, lokaler und systemischer Bioverfügbarkeit oder Nebenwirkungen des Studienpräparates. In DV001 sowie im Placebopräparat sind Benzalkoniumchlorid und Glycerol enthalten. Bei Benzalkoniumchlorid handelt es sich um einen Konservierungsstoff, der häufig sowohl verschreibungspflichtigen als auch rezeptfreien Medikamenten und medizinischen Produkten zugesetzt wird, wie zum Beispiel abschwellend wirkenden Nasensprays. Bei der Langzeitanwendung von Benzalkoniumchlorid kann es zu Nebenwirkungen wie Schwellung und

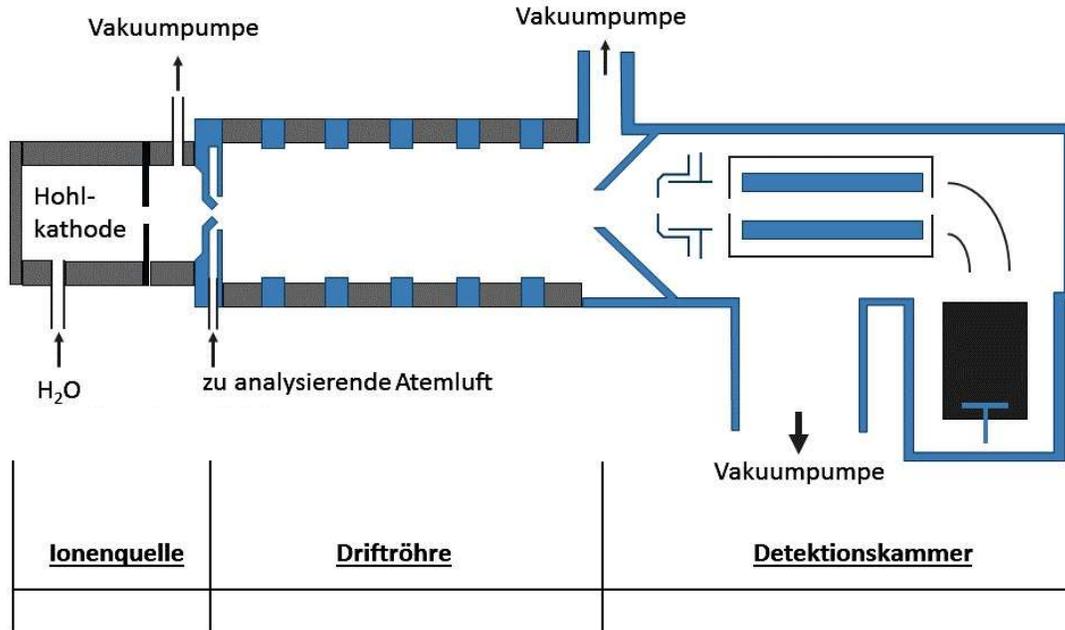
Irritation der Nasenschleimhäute kommen. Da DV001 keine absorptionsfördernden Zusätze wie Surfactant enthält, wurde nicht erwartet, dass das insulinhaltige Präparat systemische Hormoneffekte bewirkt. Im abschließenden Studienreport der INIT II Studie wurden für die Studienteilnehmer aller Studienzentren von insgesamt 3 Hypoglykämien bei 47 Studienteilnehmern mit insulinhaltigem Nasenspray berichtet und von insgesamt 2 Hypoglykämien bei 45 Studienteilnehmer, die Placebo erhielten. Allgemein wurde kein Blutglukosewert festgelegt, ab dem eine Hypoglykämie galt – die Forschergruppe Diabetes der Technischen Universität München definierte eine Hypoglykämie ab einem Wert von  $< 50$  mg/dl. Von anderen Nebenwirkungen, die in Zusammenhang mit dem Studienpräparat stehen könnten, wurde nicht berichtet.

### **4.3 Messmethode**

#### **4.3.1 Protonentransferreaktions-Massenspektrometrie (PTR-MS)**

Zur Analyse von Metabolitprofilen in der Atemluft der Probanden wurden für die vorliegende Arbeit Volatile Organic Compounds (VOCs) mittels Protonentransferreaktions-Massenspektrometrie (PTR-MS) bestimmt. Dafür kam ein Standard-PTR-MS-Gerät mit Quadrupol-Technik der Firma Ionicon Analytik GmbH, Innsbruck, Österreich zum Einsatz. Mit dieser nicht-invasive Methode können VOCs in Echtzeit erfasst und auch Mengen im Bereich von wenigen ppb (parts per billion)<sup>259,260</sup> bis ppt (parts per trillion)<sup>260,261</sup> detektiert werden.

Grundprinzip der PTR-MS ist die Ionisation von VOCs durch die Übertragung von Protonen von Protonendonatoren, wie in dieser Studie  $\text{H}_3\text{O}^+$  (= Oxonium)-Ionen, auf entsprechende VOCs<sup>262,263</sup>. Anschließend werden die protonierten VOCs anhand ihres Masse-zu-Ladung-Verhältnisses (m/z-ratio) erfasst<sup>262</sup>. Das PTR-MS-Gerät besteht dazu aus folgenden drei Einheiten: einer Ionenquelle, in der die Protonendonatoren erzeugt werden, einer Driftröhre, in der es zum Protonenübertrag auf entsprechende VOCs kommt und einer Detektionskammer, in der die protonierten VOCs aufgetrennt und gezählt werden.



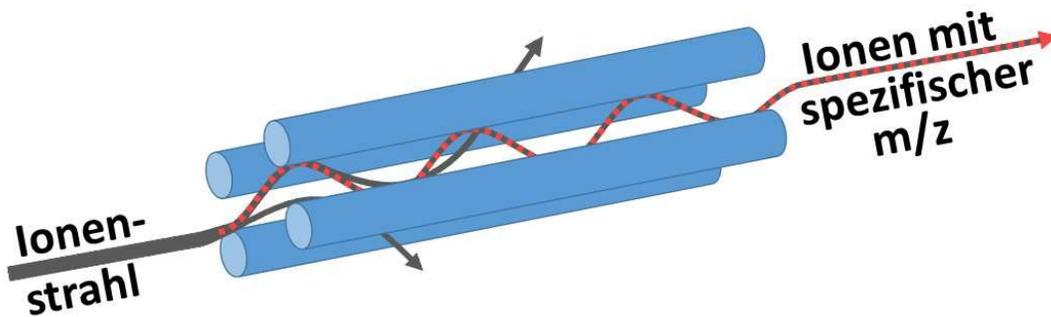
**Abb. 1:** Aufbau eines PTR-MS-Gerätes (modifiziert nach<sup>264</sup>)

Die in dieser Studie als Protonendonatoren verwendeten Oxonium-Ionen werden durch Entladung einer Hohlkathode in der Ionenquelle aus Wasserdampf generiert, der aus Wasser aus einem Reinstwassertank entsteht. Mit Hilfe eines elektrischen Feldes gelangen die Oxonium-Ionen durch eine Blendenöffnung in die Driftröhre. In die Driftröhre strömt die VOCs-enhaltende Atemluft hinzu und bei Kollision eines Oxonium-Ions mit einem entsprechenden Metabolit (M) kann unter gewissen Voraussetzungen die Protonentransferreaktion stattfinden:



Dafür ist grundsätzlich ein Vakuum in der Driftröhre notwendig, das von drei angeschlossenen Vakuumpumpen generiert wird. Bei der Protonentransferreaktion (Gleichung I.) handelt es sich um eine exotherme Reaktion, das heißt die Generierung protonierter Moleküle ist nur dann möglich, wenn energetische Prozesse nicht dagegen sprechen und die Protonenaffinität eines VOC höher ist als die Protonenaffinität von  $H_2O$ . Da die Hauptbestandteile der Umgebungsluft, wie Sauerstoff ( $O_2$ ), Stickstoff ( $N_2$ ), Kohlenstoffdioxid ( $CO_2$ ) und einige weitere, eine niedrigere Affinität als  $H_2O$  besitzen, reagieren sie nicht mit den  $H_3O^+$ -Ionen und werden deshalb auch nicht erfasst<sup>265</sup>. Weil es in einem überwiegenden Teil der Fälle durch die Ionisation nicht zur Fragmentierung der zu untersuchenden Moleküle kommt, wird die Protonentransferreaktion im PTR-MS-Gerät als "soft ionization" bezeichnet,<sup>266,267</sup>. Das heißt die Molekülmasse der entstehenden Ionen entspricht normalerweise der protonierten Molekülmasse der ursprünglichen VOCs.

Mithilfe eines elektrischen Feldes gelangen die entstandenen Ionen in die Detektionskammer, wo sie entsprechend ihres Verhältnisses an Masse zu Ladung ( $m/z$ -ratio) in dieser Studie mittels eines Quadrupol-Massenfilters aufgetrennt und gezählt werden. Auch in der Detektionskammer sind Vakuumbedingungen erforderlich, die durch eine Vakuumpumpe erzeugt werden. Bei der Quadrupol-Technik erzeugt ein elektrischer Quadrupol, das sind vier parallel angeordneten Stabelektroden, ein elektrisches Feld, das Ionen beschleunigt. Je nach Einstellung von Frequenz bzw. Spannung können nur protonierte Moleküle mit einem bestimmten Verhältnis an Masse zu Ladung ( $m/z$ -ratio) die Stabelektroden zentral passieren. Die sinusförmige Fluglinie eines entsprechenden Ions verläuft dabei in konstanten Abständen zur Mittellinie durch den Quadrupol hindurch. Ionen mit einem anderen  $m/z$ -Verhältnis werden immer weiter von der Mittellinie weg beschleunigt, bis sie sich schließlich außerhalb des elektrischen Feldes befinden.<sup>268</sup>



**Abb. 2:** Aufbau eines Quadrupols (modifiziert nach<sup>269</sup>)

Nachdem die vorausgewählten Ionen das elektrische Feld zentral durchquert haben, treffen sie auf einen Sekundärelektronenvervielfacher, ein Messverstärker, der die Ionen als Ionenstrom misst. Die Zählrate der protonierten VOCs wird aus diesem Ionenstrom mithilfe einer speziellen Software errechnet und in cps (counts per second) wiedergegeben. Eine hohe Sensitivität der PTR-MS-Methode wird durch eine hohe Ionenzählrate pro Dichte einer VOC-Substanz erreicht, die wiederum durch eine hohe Dichte an Protonendonatoren in der Driftröhre gewährleistet wird. Ein Software-Tool der Kontrollsoftware evaluiert die Spannung, die zur Generierung einer konstanten Oxoniumionenkonzentration notwendig ist.

Die Umrechnung der Ionenzählrate [cps] vorausgewählter Massen in ihre absolute Konzentration [ppb] kann bei bekannter Oxoniumionenkonzentration durch Verrechnung einer Konstanten erfolgen, die sich aus der Zeit, die die Ionen zum Durchqueren der Driftröhre benötigen, einem Reaktionskoeffizienten, einem Umrechnungsfaktor und einem Transmissionsfaktor (vgl. 4.3.2.) zusammensetzt:

$$\text{II. } \text{MH}^+[\text{ppb}] = c \cdot \text{MH}^+[\text{cps}]/\text{H}_3\text{O}^+[\text{ppb}]$$

$\text{MH}^+$  : Konzentration der protonierten Metaboliten

$\text{H}_3\text{O}^+$ : Oxoniumionenkonzentration

$c$ : Konstante, die  $t$ ,  $k$ , einen Umrechnungsfaktor, sowie den Transmissionsfaktor (vgl. Abschnitt 4.4.3) enthält

$t$  : Zeit, die die Ionen zum Durchqueren der Driftröhre benötigen

$k$  : Reaktionskoeffizient (typisch  $\sim 2 \cdot 10^{-9} \text{ cm}^3/\text{s}$ )

### 4.3.2 Transmissionsmessung

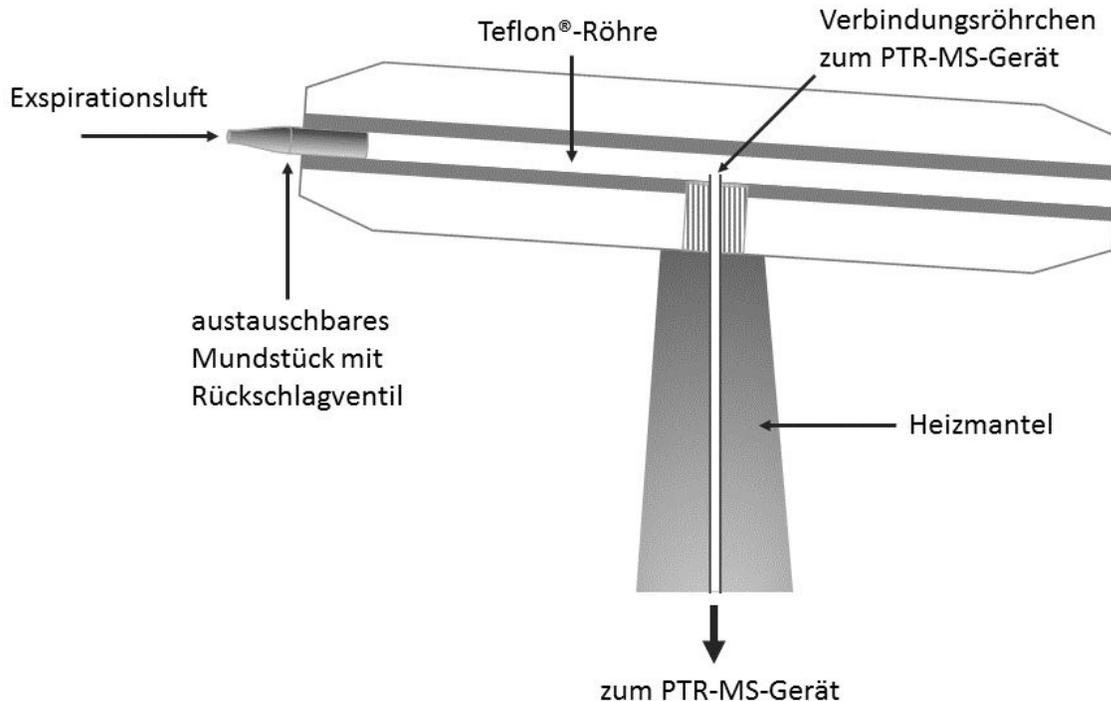
Über den Zeitraum hinweg, in der das PTR-MS-Gerät für die INIT II-Atemgasstudie zum Einsatz kam, wurden monatlich Transmissionsmessungen mittels eines Standard-Testgases der Firma Scott Specialty Gas, Plumsteadville, USA durchgeführt. Diese sind notwendig um bei längerem Betrieb, nach Wartung oder nach Transport des Gerätes die Zuverlässigkeit und Vergleichbarkeit der gemessenen Daten gewährleisten zu können<sup>270</sup>. Das Testgas enthält stabile Substanzen in bekannter Konzentration und deckt einen weiten Massenbereich ab. Die Transmission entspricht der Empfindlichkeit des Gerätes und ist definiert als Quotient aus der Anzahl der Ionen, die im Detektor des PTR-MS-Gerätes ankommen und registriert werden zu der Anzahl der Ionen, die in das PTR-MS-Gerät eingetreten sind<sup>271</sup>. Die Ionisierungswahrscheinlichkeit innerhalb der Driftröhre, die Güte des Quadrupol-Massenfilters und die Effektivität des Massendetektors sind dabei maßgebliche Einflussfaktoren. Daraus lässt sich für jede Masse ein relativer Transmissionsfaktor berechnen, der unter anderem bei der Umrechnung der Ionenzählrate [cps] vorausgewählter Massen in ihre absolute Konzentration [ppb] von Bedeutung ist (vgl. Gleichung II).

### 4.3.3 Atemluftsammlung

Für die Sammlung der Atemluftproben wurde eine Vorrichtung zur Buffered end-tidal (BET)-Atemgassammlung verwendet. Diese Technik wurde von Herbig et al. entwickelt und 2008 erstmalig beschrieben<sup>242</sup>. Sie bietet die Möglichkeit zur VOC-Analyse in Echtzeit und hat sich gegenüber anderen Techniken durchgesetzt, bei denen Atemluftproben erst im Nachhinein untersucht werden können.

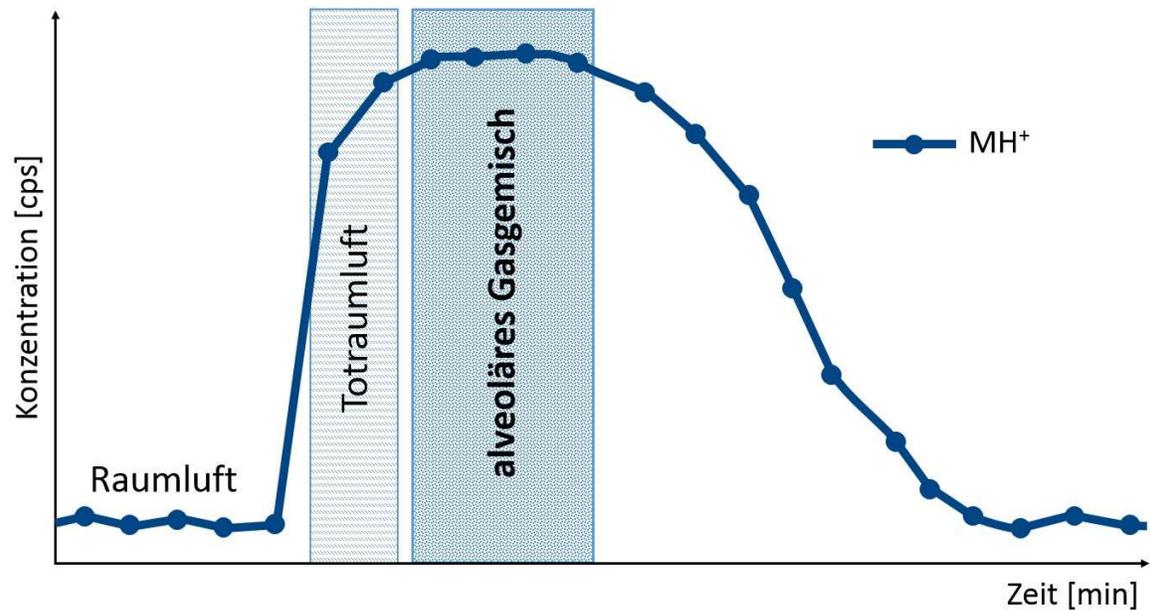
Der Aufbau eines BET-Atemluftsammlers ist in Abb. 3 schematisch dargestellt. Hauptbestandteil ist eine 300 mm lange, beheizbare, an beiden Enden offene Teflon®-Röhre mit einem Durchmesser von 13 mm, die ein Gas-Volumen von 40 ml speichern kann. Durch ein Verbindungsrohrchen zum PTR-MS-Gerät, dessen Durchmesser 1 mm beträgt und dessen Einlassventil sich in der Mitte der Teflon®-Röhre befindet, werden kontinuierlich Gasproben (in dieser Studie 60 ml/min) aus der Teflon®-Röhre in die Driftröhre des PTR-MS-Gerätes gezogen.

Um zu verhindern, dass die Luftfeuchtigkeit der Atemluft kondensiert, wird sowohl die Teflon®-Röhre als auch das Verbindungsrohrchen zum PTR-MS-Gerät durch ein Heizsystem kontinuierlich auf 80° C geheizt. Um das versehentliche Einatmen von heißer Luft zu verhindern enthielten die Mundstücke, die auf die Teflon®-Röhre aufgesetzt wurden, ein Rückschlagventil.



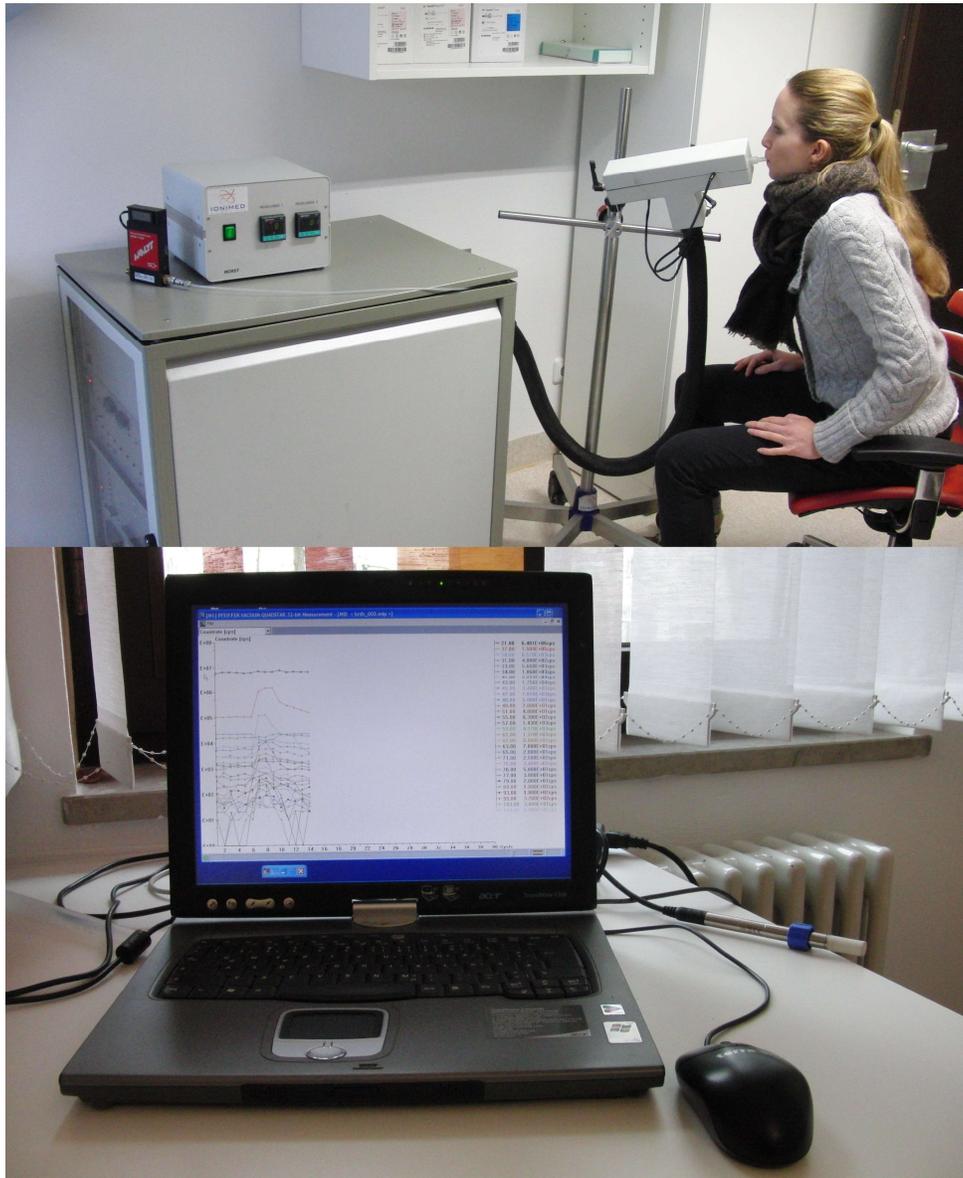
**Abb. 3:** Aufbau des BET-Atemluftsammlers (modifiziert nach<sup>242</sup>)

Das Expirationsprofil einer VOC-Konzentrationsmessung mittels BET-Atemluftsammler ist in Abb. 4 dargestellt: Zunächst ist die Teflon®-Röhre mit Umgebungsluft gefüllt. Nach einer tiefen Inspiration treten die Studienteilnehmer an den Atemluftsammler und atmen die gesamte Expirationsluft durch das Mundstück in die Teflon®-Röhre aus. Die Atemluft ersetzt die Umgebungsluft im Röhreninneren mit Beginn des Ausatmens ziemlich schnell. Zuerst gelangt beim Ausatmen Totraumluft aus Mund, Rachen, Trachea und Bronchien in die Teflon®-Röhre, gegen Ende wird alveoläres Gasmisch abgeatmet, das die höchste Konzentration an endogenen und die niedrigste Konzentration an exogenen VOC-Bestandteilen enthält<sup>272</sup>. Der zuletzt in die Teflon®-Röhre gelangte Atemluftanteil, also alveoläres Gasmisch, wird dort für einige Zeit gespeichert. Da beide Enden der Teflon®-Röhre offen sind, entweicht die Atemluft nach und nach und das Röhreninnere enthält nach einer gewissen Zeit wieder Raumluft, deren Bestandteile ebenfalls durch das Gerät analysiert werden. Neben den VOC-Konzentrationen in der Alveolarluft werden also gleichzeitig auch die jeweiligen VOC-Konzentrationen in der Umgebungsluft erfasst, was wichtig für die Auswertung und Interpretation von Messergebnissen ist.



**Abb. 4:** Expirationsprofil eines protonierten Metaboliten (MH<sup>+</sup>) - (modifiziert nach<sup>242</sup>)

Durch die sofortige graphische Darstellung der Ergebniswerte ausgewählter Massen auf einem angeschlossenen Monitor ist es möglich, umgehend zu kontrollieren, ob das Ausatmen in den Atemluftsammler zufriedenstellend ausgeführt wurde (vgl. Abb. 5).



**Abb. 5:** Gesamter Messaufbau: Messung und Aufzeichnung einer Expiration mittels eines BET-Atemluftsammlers und PTR-MS-Gerätes

#### 4.3.4 Zuordnung von Massen zu chemischen Stoffen:

Zur Erfassung von Metaboliten kam in der vorliegenden Arbeit ein PTR-MS-Gerät mit Quadrupol-Massenfilter zum Einsatz. Mit Hilfe der Quadrupol-Technik ist es möglich, VOCs anhand ihrer Massenzahl zu unterscheiden und ihre absolute Konzentration zu ermitteln. Nähere Aufschlüsse über die physikalischen oder chemischen Eigenschaften der VOCs können jedoch nicht gewonnen werden. Im Gegensatz zu anderen Verfahren der Atemgasanalyse<sup>273,274</sup> lassen sich verschiedene Substanzen mit demselben Verhältnis an Masse zu Ladung per PTR-MS mit Quadrupol-Technik also nicht unterscheiden. Kenntnisse über das Vorkommen von bestimmten Stoffwechselprodukten in der Atemluft auf der Grundlage anderer Publikationen machen aber eine gewisse versuchsweise Zuordnung von Masse zu Stoffwechselprodukt möglich. Zusätzlich kann das Auftreten einer starken linearen Korrelation zwischen Isotopen oder Fragmenten einer bestimmten Substanz für die Massenzuordnung zu einem Stoffwechselprodukt nützlich sein<sup>262,267</sup>.

#### 4.4 Studienaufbau

Für die INIT-II-Atemgasstudie wurden 38 Massen ausgewählt, die per PTR-MS in der Atemluft der 9 Probanden während eines zweistündigen Zeitfensters kurz nach Applikation des Studienpräparates untersucht werden sollten. Die Auswahl der zu analysierenden Massen, des Messzeitraumes und der Messintervalle orientierte sich an Erkenntnissen aus einer Atemgaspilotstudie der Arbeitsgruppe des Projects Breath Gas Analysis, Research Unit Medical Radiation Physics and Diagnostics des Helmholtz Zentrums München. Bei dieser Pilotstudie wurden Atemgasmessungen bei Gestationsdiabetespatientinnen während eines oGTTs durchgeführt<sup>275</sup>. Signifikante Ereignisse nach der Gabe der Glukose mit anschließender körpereigener Insulinausschüttung waren hier bei einigen der Massen eines untersuchten breiten Spektrums vor allem in der ersten Stunde der zweistündigen Atemluftsammlungen zu beobachten. In der vorliegenden Studie geht es darum, Auswirkung von extern zugeführtem, intranasalem Insulin auf Metabolitprofile in der Atemluft im Rahmen der INIT-II-Studie zu untersuchen. Als Messzeitraum wurde ebenfalls ein zweistündiger Zeitraum unmittelbar nach der ersten Anwendung des Studienpräparates gewählt. Neben Erkenntnissen aus der Gestationsdiabetesstudie<sup>275</sup> war für die Wahl dieses Zeitraumes ausschlaggebend, dass in anderen Studien durch die intranasale Applikation von Insulin Auswirkungen auf den Blutzuckerspiegel<sup>186-190</sup> und andere Kurzzeiteffekte<sup>189,205,206</sup> auch etwa in dieser Zeitspanne nachgewiesen wurden. Daher ging man davon aus, dass Veränderungen von Metabolitprofilen, die per PTR-MS erfasst werden können, ggf. ebenfalls in dieser Zeitspanne auftreten.

Zunächst wurden basierend auf Erkenntnissen der Gestationsdiabetesstudie von Halbritter et al.<sup>275</sup> für die INIT-II-Atemgasstudie 56 Massen ausgewählt, die per PTR-MS untersucht werden sollten. Es handelt sich bei diesen um Oxidationsprodukte des Glukose- und Lipidstoffwechsels, Thiole, Sulfide sowie Aceton und seine Metaboliten<sup>275</sup>. Nach einer Zwischenanalyse durch Mitarbeiter der Arbeitsgruppe des Projects Breath Gas Analysis, Research Unit Medical Radiation Physics and Diagnostics des Helmholtz Zentrums München wurden 18 der ursprünglich ausgewählten Massen ab dem 10.08.2012 aufgrund zu geringer Signalintensität oder Identifikation eines natürlichen Isotops aus dem Messvorgang genommen. So reduzierte sich die Auswahl für die INIT-II-Atemgasstudie auf 38 Massen. Um die Messzeiten über die ganze Studie hinweg konstant zu halten wurde nach Ausschluss der 18 Massen die Konzentration anderer, soweit als besonders responsiv erachteter Massen doppelt bestimmt. Eine Übersicht der 38 ausgewählten Massen dieser Studie findet sich in untenstehender Tabelle (Tab. 2).

**Tab. 2:** Übersicht der analysierten Massen

Block 1	Messzeit (ms)	Block 2	Messzeit (ms)
21	50	21	50
37	50	37	50
18	100	18	100
31	100	33	100
33	100	45	100
34	100	47	100
41	100	51	100
43	100	59	100
45	100	61	100
47	100	65	100
48	100	69	100
49	100	71	100
51	100	72	100
55	100	73	100
57	100	75	100
59	100	76	100
61	100	77	100
62	100	79	100
63	100	81	100
65	100	89	100
71	100	90	100
75	100	91	100
76	100	93	100
77	100	95	100
79	100	97	100
89	100	103	100
93	100	111	100
95	100	124	100
103	100	135	100
124	100	137	100
<b>Gesamte Messzeit [s]</b>	<b>2,9</b>	<b>Gesamte Messzeit [s]</b>	<b>2,9</b>

 Hoher Takt: 20 Massen (dunkelblau hinterlegt), die sowohl in Block 1 als auch Block 2 gemessen werden.

 Niedriger Takt: 20 Massen (grau hinterlegt), die entweder in Block 1 oder in Block 2 gemessen werden.

Die Messung der 38 Massen erfolgte in zwei hintereinandergeschalteten Messblöcken jeweils mit einer Messzeit von 100 ms. Neben einigen doppelt gemessenen Massen, die in beiden Messblöcken vorkamen, war auch  $m/z = 21$  ( $H_3O^+$ ) und  $m/z = 37$  ( $H_3O^+ \cdot H_2O$ ), also Oxoniumionen und Wassercluster, mit einer Messzeit von jeweils 50 ms in beiden Messblöcken enthalten. Jeder Messblock bestand so insgesamt aus 30 zu analysierenden Massen, die mit MID(multiple ion detection)-Modus ausgewählt wurden. Je Messblock wurden 2 Exspirationskurven aufgezeichnet

und die Konzentrationen der ausgewählten Massen dabei 30 Mal nacheinander bestimmt. Insgesamt ergibt sich so eine Messzeit von 87 sec. pro Messblock und inklusive der Zeit, die benötigt wird um zwischen den beiden Messblöcken zu wechseln, war eine maximale zeitliche Auflösefrequenz von 3-4 Minuten möglich.

Im zweistündigen Messzeitraum betrug die angestrebte Messfrequenz für die erste Stunde etwa 6 – 10 Minuten, für die zweite Stunde erschienen größere Messintervalle ausreichend. Es wurde stets darauf geachtet, die jungen Probanden durch die Messungen nicht zu überfordern. So sollten ferner auch stressinduzierte VOC-Signale vermieden werden.

Parallel zu den Atemgasmessungen wurde über eine vor Messstart gelegte Venenverweilkanüle in gewissen Zeitintervallen Blutproben für die spätere laborchemische Bestimmung der Blutglukosekonzentration im Medizet (Medizinisches Dienstleistungszentrum) des Klinikums München-Schwabing des Städtischen Klinikums München GmbH abgenommen. Der Blutzuckerspiegel wurde parallel auch mit einem Handmessgerät kontrolliert, um im Falle einer Hypoglykämie bedingt durch mögliche systemische Insulineffekte rechtzeitig intervenieren zu können. Die Blutentnahmen sollten vor Messstart und dann während des zweistündigen Messfensters in halbstündlichem Takt erfolgen. Bei Proband 4 wurde zur 30. Minute eine Hypoglykämie detektiert, dies führte zur Einführung häufigerer Blutzuckerkontrollen in der ersten Stunde des Messzeitraumes. Fortan wurde der Blutzuckerspiegel vor Messstart und in der ersten Stunde alle 15 Minuten kontrolliert, in der zweiten Stunde erfolgten die Kontrollen weiterhin halbstündlich. Zu allen Messzeitpunkten wurde auch Blut für die spätere Bestimmung der Blutglukosekonzentration im Labor abgenommen.

## **4.5 Durchführung der Studie**

### **4.5.1 Standardisierter Ablauf der Vorbereitung und der Messungen**

Die Atemgasmessungen zu vorliegender Studie fanden in einem etwa 12 m<sup>2</sup> großen Raum mit einem Volumen von etwa 35m<sup>3</sup> im Studienzentrum Ungererstr. 25, 80802 München statt. An jedem Messtag wurden hier in einem standardisierten Ablauf vor und während der Atemgasmessungen folgende Arbeitsschritte durchgeführt:

- 1) Vor Einschalten des PTR-MS Gerätes wurden Fenster und Tür des Messraumes zum Lüften geöffnet. So sollte die Konzentration an exogenen VOCs bedingt durch Reinigungs-, Desinfektionsmittel und Ähnlichem minimiert werden. Für die Atemgasmessungen der ersten beiden Probanden wurden Fenster und Tür kurz vor Messstart wieder geschlossen und in der Absicht konstantere Umgebungsbedingungen zu gewährleisten wurde das Fenster erst wieder nach etwa 60 Minuten bei Proband 1 bzw. etwa 90 Minuten bei Proband 2 zum Lüften geöffnet. Da die Analyse der Atemgasmessungen der ersten beiden Probanden aber ergab, dass VOCs in den ersten 60 bzw. 90 Minuten stark in der Raumluft akkumulierten, wurde dieses Lüftungsschema bei den Messungen der übrigen Probanden nicht beibehalten. Das Fenster sollte fortan je nach Außentemperatur und Witterung auch während der Messungen geöffnet oder zumindest gekippt bleiben und die Tür zum Messraum blieb nun über den gesamten Messzeitraum hinweg offen.
- 2) Etwa 30-45 Minuten vor Beginn der Atemgasmessungen wurde das PTR-MS-Gerät und die

Heizung des Atemluftsammlers eingeschaltet und außerdem die permanente Messung der Raumtemperatur und der relativen Luftfeuchtigkeit mit dem Hygrothermometer HYTE-LOG 4800Bd der Firma Hygrosens Instruments, Löffingen, Deutschland gestartet.

- 3) Die Flussrate des Atemluftsammlers und die Setting Parameter des PTR-MS-Gerätes wurden überprüft bzw. eingestellt um die Arbeitsparameter der unten stehenden Tabelle zu erhalten (Tab. 3). Die entsprechende Kontroll-Software SEABREAS ist wie das PTR-MS-Gerät ein Produkt der Firma Ionicon Analytik, Innsbruck, Österreich. Für einen Überblick über das gemessene Konzentrationsniveau wichtiger Substanzen wie  $m/z = 21$  (Oxoniumionen),  $m/z = 32$  (molekularer Sauerstoff),  $m/z = 37$  (Wassercluster),  $m/z = 59$  (Aceton) und einige weitere, wurden ca. 60 Zyklen in einem 6- bis 7-minütigen „Einbrennvorgang“ mit dem sogenannten MID (multiple ion detection)-Modus aufgezeichnet, bei dem nur vorausgewählte Massen mit einer individuell einstellbaren Messzeit analysiert werden.

**Tab. 3:** Einstellungen am PTR-MS-Gerät

Temperatur im BET-Atemluftsammler	80 °C
Flussrate des BET-Atemluftsammlers	60ml/min
Stromstärke der Ionenquelle	0,44 – 0,6 mA
Temperatur in der Driftröhre	60 °C
Druck in der Driftröhre	2,17 – 2,19 mbar
Driftröhrenspannung	580 – 600 V
Druck in der Detektionskammer	<2 x 10 <sup>-5</sup> mbar
Detektorspannung	1950 - 2100 V
O <sub>2</sub> zu H <sub>3</sub> O <sup>+</sup> -Ratio	< 2 %
Spannung der Ionenquelle	90 – 125 V
Spannung des Ionenquellenausgangs	70 V
Spannung der Blende	5,8 V

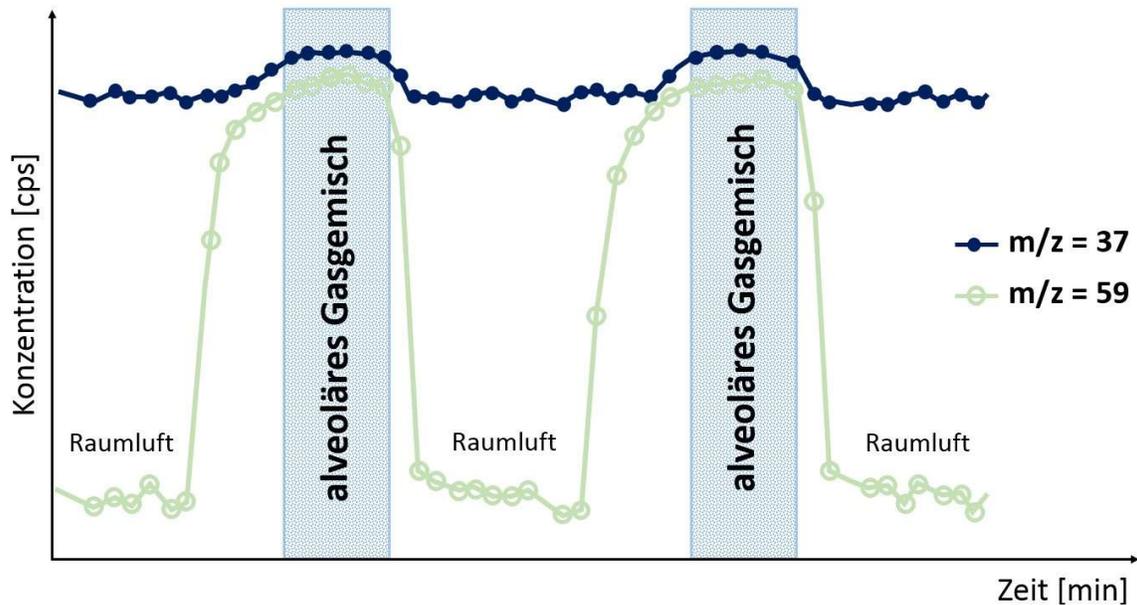
- 4) Daraufhin wurden 4 - 6 Massenscans der Raumluft im Scan-Modus durchgeführt, in dem alle Massen im Bereich von  $m/z = 21$  bis  $m/z = 200$  aufgezeichnet wurden, um „Ausreißer“ zu identifizieren, die die folgenden Atemgasmessungen stören könnten.
- 5) Um Messfehler bedingt durch den BET-Atemluftsammler oder seine Verbindung zum PTR-MS-Gerät zu vermeiden, wurde vor Beginn der Atemgasmessungen ein Selbsttest durchgeführt. Dabei wurde die graphische Veranschaulichung der Messung von Konzentrationsanstiegen und – abfällen ausgewählter Massen während mehrerer Expirationen an einem angeschlossenen Monitor beobachtet und hinsichtlich eines optimalen Verlaufes beurteilt. Es hat sich gezeigt, dass eine ca. 20° betragende Schrägstellung des Atemluftsammlers mit höchstem Punkt am Mundstück des Probanden ein gut in die eingestellten Messzeiten der Messblöcke passendes Fallen der Konzentrationswerte nach Maximalanstieg bei den Expirationskurven begünstigt.
- 6) Vor Beginn der Atemgasmessungen wurde den jungen Probanden kurz die Methode der PTR-MS altersgerecht erklärt und die Höhe des Atemluftsammlers auf die Körpergröße der sitzenden Studienteilnehmer eingestellt. Dann wurden die Probanden in den Messvorgang eingewiesen. Ihnen wurde erklärt und demonstriert, dass ein etwa 6 - 7 Sekunden langes, vollständiges und möglichst gleichmäßiges Ausatmen in das Mundstück des Atemluftsammlers optimal ist. Es folgten ein bis zwei Probemessungen. Um die jungen Probanden zu motivieren und geeignete Startpunkte für die beiden Expirationskurven zu bekommen, die je Messblock aufgezeichnet werden sollten, wurde den Kindern der jeweilige Beginn des Ausatmens in den Atemluftsammler angesagt. Außerdem wurde während des Ausatmens bis zu einer vorher vereinbarten Zahl 6 - 7 sec. lang mitgezählt.
- 7) Danach wurde den Studienteilnehmern in einem anderen Raum eine Venenverweilkanüle gelegt. Nach Randomisierung und Erläuterung der Anwendung des Studienpräparates erfolgten die erste Blutentnahme und die erste Applikation des Nasensprays. Unmittelbar nach der ersten Sprayanwendung starteten die Atemgasmessungen. Parallel zu den Atemgasmessungen wurde ein Studienprotokoll verfasst. In den Intervallen zwischen den Messungen wurde mit den Probanden bzw. ihren Angehörigen ein Fragebogen ausgefüllt. In

diesem wurden neben Alter, Geschlecht, Gewicht und Körpergröße auch die Zusammensetzung und der Zeitpunkt der letzten Nahrungsaufnahme am Morgen vor den Messungen, Angaben über den Gesundheitsstatus sowie regelmäßig bzw. am Messtag eingenommene Medikamente erfasst.

#### 4.5.2 Datenaufzeichnung und -verarbeitung

Die Daten der Atemgasmessungen wurden mit Hilfe der Kontroll-Software SEABREAS aufgezeichnet. Für jeden der 2 Messblöcke wurde jede einzelne der 30-mal hintereinander gemessenen Massenkonzentrationen der vorausgewählten Massen kodiert als „\*.mdc data file“ gespeichert.

Über die Messung der in der Atemluft enthaltenen Feuchtigkeit kann eine Unterscheidung und Fraktionierung der Exhalationsluft in verschiedene, zeitlich hintereinander geschaltete Bestandteile erfolgen. Zuerst befindet sich die am wenigsten Feuchtigkeit enthaltende Raumluft in der Teflon®-Röhre des BET-Atemluftsammlers. Mit Beginn des Ausatmens gelangt für eine kurze Zeitspanne die mehr Feuchtigkeit enthaltende Totraumluft aus Mund, Rachen, Trachea und Bronchien in die Teflon®-Röhre. Am Schluss wird für einige Zeit endexpiratorisches alveoläres Gasgemisch in der Teflon®-Röhre gespeichert, das den höchsten Feuchtigkeitsgehalt aufweist, bis dieses schließlich nach und nach vollständig durch Umgebungsluft ersetzt wird. Mit Hilfe eines bereits in der GDM-Studie<sup>275</sup> verwendeten Algorithmus, der mit dem Softwareprogramm MATLAB R2010a (MathWorks, Natick, USA) ausgeführt wird, kann durch das Monitoring des Wasserclusters  $m/z = 37$  zwischen Wertebereichen mit Raumluftkonzentration und Wertebereichen mit alveolärer Massenkonzentration unterschieden werden (vgl. Abb. 6). So konnten für jede der untersuchten Massen mit Hilfe des Algorithmus aus den zwei je Messblock aufgezeichneten Expirationskurven jeweils 3 Bereiche mit Raumluftkonzentrationen und 2 Bereiche mit alveolärem Gasgemisch definiert werden. Durch Bestimmung des Medians aus allen Werten eines entsprechenden Bereiches einer Masse eines Messblocks wurden dann jeweils ein Raumluftkonzentrationswert und ein Atemluftkonzentrationswert ermittelt. Die Bestimmung des Medians wurde deshalb gewählt, weil die in einem entsprechenden Bereich liegenden Werte teilweise etwas verrauschte Verläufe zeigten und eine Medianberechnung als relativ resistent gegen Ausreißer gilt. Die Werte der Raumluft- und Atemluftkonzentrationen wurden nach Masse und Messzeitpunkt sortiert in eine Excel-Tabelle übertragen. Außerdem fand eine Umrechnung der Ionenzählrate [cps] der Massen in ihre absolute Konzentration [ppb] statt (vgl. Gleichung II). Die Datenverarbeitung wurde soweit durch Mitarbeiter des Projects Breath Gas Analysis, Research Unit Medical Radiation Physics and Diagnostics des Helmholtz Zentrums München übernommen.



**Abb. 6:** Auftrennung der Bereiche von Raumluft und abgeatmetem alveolärem Gasmisch anhand der in der Expirationsluft enthaltenen Feuchtigkeit ( $m/z = 37$ ) beispielhaft dargestellt für Aceton ( $m/z = 59$ ) - (mit freundlicher Genehmigung modifiziert nach<sup>276</sup>)

Weil sich die Konzentration einer Masse in der Atemluft sowohl aus endogen produzierten VOCs als auch aus VOCs, die aus der Umgebungsluft stammen, zusammensetzt und Unklarheit über die Clearance und Aufnahme von VOCs in der Lunge besteht, ist es wichtig, jedes einzelne VOC-Profil separat zu betrachten und mit der gleichzeitig gemessenen Raumluftkonzentration zu vergleichen. Bis jetzt fehlen etablierte Algorithmen zur Ermittlung des exogenen VOC-Anteils, um welchen die Atemluftkonzentration korrigiert werden müsste, um den endogenen Anteil zu erhalten<sup>277</sup>. Für diese Studie wurde daher beschlossen, neben einer separaten Betrachtung und deskriptiven Analyse von Atemluftkonzentration und Raumluftkonzentration, das Delta zwischen Raumluft- und Atemluftkonzentration zu bilden und als endogenen Anteil für die weitere Analyse zu verwenden. Dies entspricht dem von Phillips et al. postulierten „alveolären Gradienten“<sup>278</sup>. Da unterschiedliche Niveaus der Ausgangskonzentrationen der Probanden bei der Analyse der Dynamik im Zeitverlauf weniger ins Gewicht fallen sollten, wurde von den Deltawerten der verschiedenen Messzeitpunkte jeweils der erste gemessene Deltawert als Basislinienwert abgezogen. Per „Area under the curve“ (AUC)-Berechnung (vgl. Formel III) wurde sodann versucht einen statistischen Vergleich der Dynamik der Massenkonzentrationen zu ermöglichen<sup>279</sup>.

$$\text{III. AUC} = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n x_{i-1} (y_{i-1} + y_i)$$

Die VOC-Konzentrationen wurden bei den Probanden in interindividuell unterschiedlichen Intervallen bestimmt und damit lagen keine bei allen Probanden direkt bestimmbareren Vergleichszeitpunkte für die AUC-Berechnungen vor. Es wurde sich daher dazu entschieden, jeweils den im Zeitverlauf nächstgelegene Messwert zu verwenden und die AUC-Werte bis zu den

Zeitpunkten der 30, 60, 90 und 120 Minuten zu berechnen und zu vergleichen. Die erste Messung wurde dabei als Wert für den Zeitpunkt „0 Minuten“ verwendet.

#### 4.5.3 Auswertung der Daten und Statistik

Neben einer deskriptiven Analyse wurden die AUC-Daten soweit möglich zur graphischen Darstellung des Datensatzes auch einer „Principal Component Analysis“ (PCA) (= Hauptkomponentenanalyse)<sup>280</sup> unterzogen. Dazu kam die Statistiksoftware "XLSTAT2016" der Firma Addinsoft zum Einsatz.

Bei der PCA entsteht durch die Ermittlung von Hauptkomponenten (engl. principal components) bzw. Faktoren die Grundlage für ein mathematisches Konstrukt, in welchem die multidimensionalen Daten in einen niederdimensionalen Raum so projiziert werden, dass die Dispersion der Daten reduziert auf relevante Informationen, erhalten bleibt. So sollen verborgene Strukturen der Daten aufgedeckt und bei verrauschten Datensätzen das Rauschen durch die Darstellung entlang einer neuen Basis herausgefiltert werden. Die PCA wird oft angewendet um eine graphische Veranschaulichung eines Datensatzes zu ermöglichen.

Die durch die PCA generierten Hauptkomponenten entsprechen jeweils einer gewichteten Summe aller ursprünglichen Variablen und stellen optimale Linearkombinationen dar. Die originalen Daten von  $n$  Variablen bilden in einem  $n$ -dimensionalen kartesischen Koordinatensystem eine Punktwolke. Zur Ermittlung der 1. Hauptkomponente wird ein neues Koordinatensystem in die Punktwolke projiziert und so lange rotiert, bis die Darstellung der Daten entlang der ersten Achse (= 1. Hauptkomponente) mit der maximalen Varianz in der Punktwolke einhergeht. Die zweite Achse (= 2. Hauptkomponente) steht senkrecht auf der ersten Achse und wird wiederum solange gedreht, bis sie der zweitgrößten Varianz der Punktwolke entspricht. Jede weitere Achse wird ebenfalls so rotiert und gelegt, dass sie die größte Varianz der noch nicht beschriebenen Restvarianz abbildet. Für die  $n$ -dimensionalen Originaldaten ergeben sich insgesamt  $n$  Achsen, die zueinander orthogonal liegen und zusammen die gesamte Varianz der Daten erklären. Die jeweilige erklärte Varianz nimmt von der ersten zur letzten Hauptkomponente ab. Idealerweise repräsentieren die ersten Faktoren einen großen prozentualen Anteil der Varianz der Daten, so dass die Darstellung der Daten entlang der ersten Faktorenachsen eine gute Abbildungsqualität des Datensatzes bietet und mit den ersten Hauptkomponenten der wesentliche Informationsgehalt der Daten wiedergegeben wird.

Je nach Höhe des Beitrages einer Variablen zu einer Hauptkomponenten spricht man von Faktorladung der Variablen auf die Hauptkomponente mit Werte zwischen 0 und +/- 1. Eine Faktorladung mit Werten von  $\geq \pm 0,5$  wird in der Regel als „hohe Ladung“ betrachtet. Durch das Aufsummieren der quadrierten Faktorladungen einer Hauptkomponente über alle Variablen hinweg erhält man den Eigenwert einer Hauptkomponente. Dieser dient als Maßstab für den Beitrag einer Hauptkomponente zur Erklärung der Gesamtvarianz aller Variablen. Unter dem Aspekt der Datenreduktion ist es sinnvoll nur jene Hauptkomponenten zu betrachten, die relevante Informationen aus dem originalen Datensatz enthalten. Deshalb sind nur Hauptkomponenten mit einer bestimmten Höhe des Eigenwertes von Relevanz und Hauptkomponenten mit Eigenwerten

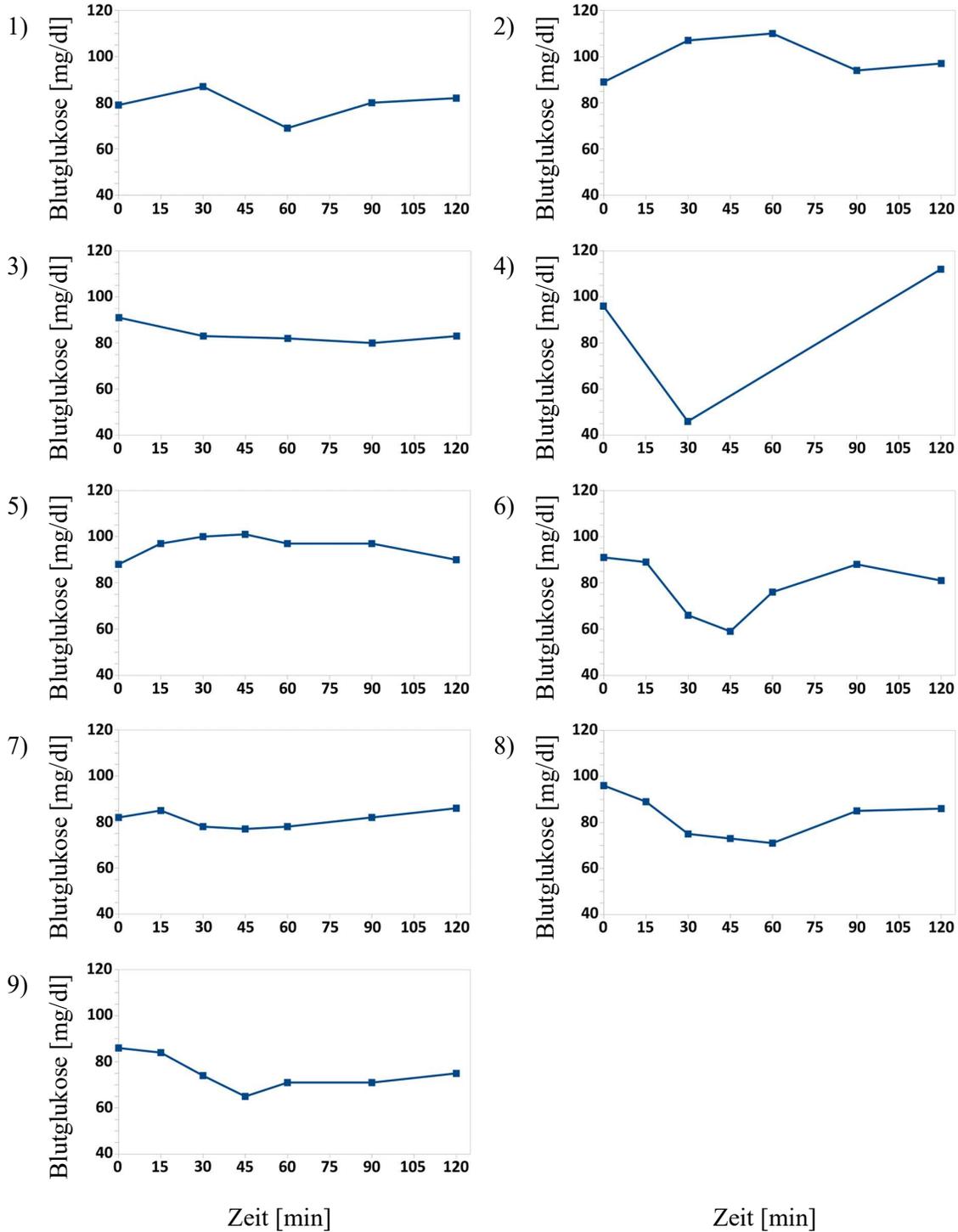
nahe dem Minimum können vernachlässigt werden. Für die Festlegung der als relevant betrachteten Eigenwerte gibt es verschiedene Kriterien, die zur Auswahl - man spricht auch von Extraktion - einer gewissen Zahl an Hauptkomponenten führen. In dieser Arbeit soll das Kaiser-Kriterium zur Anwendung kommen, welches besagt, dass „die Zahl der zu extrahierenden Faktoren (Anm. = Hauptkomponenten) gleich der Faktoren mit Eigenwerten größer eins“<sup>281</sup> ist.

Im Idealfall lassen sich die hoch auf eine Hauptkomponente ladenden Variablen durch einen Sammelbegriff zusammenfassen, der die Hauptkomponente beschreibt, und die Probanden, die ursprünglich durch alle erhobenen Variablen beschrieben wurden, trennen sich entlang der Hauptkomponenten bzw. Sammelbegriffe in entsprechende Untergruppen auf. Allerdings können die bei der Projektion verloren gegangenen Informationen auch zu Interpretationsfehlern führen, worin die Grenzen der PCA liegen.

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Dynamik der Blutzuckerspiegel

#### 5.1.1 Darstellung und Deskription der Blutzuckerdynamiken der 9 Probanden



**Abb. 7:** Blutzuckerungsverlauf der 9 Probanden (1-9). Zeitpunkt „0 Minuten“ markiert jeweils den Zeitpunkt der ersten Blutzuckermessung, unmittelbar danach erfolgte die Spraygabe. Symbole stellen Messzeitpunkte dar, die mit Geraden verbunden sind, um die Dynamik der Blutzuckeränderungen über den zweistündigen Messzeitraum hinweg zu veranschaulichen.

Bei Proband 1 ergab sich zu Beginn des zweistündigen Messzeitraumes ein Blutglukosewert von 79 mg/dl. Bis zur 30. Minute zeigte sich ein gemessener Maximalwert von 87 mg/dl. Bis zur 60. Minute fiel der Blutzuckerspiegel auf einen gemessenen Minimalwert von 69 mg/dl. Am Ende des Messzeitraumes zeigten sich wieder Werte um das Ausgangsniveau mit 80 mg/dl zur 90. Minute und 82 mg/dl zur 120. Minute (Abb. 7.1).

Bei Proband 2 ergab sich zu Beginn ein Blutzuckerwert von 89 mg/dl, gefolgt von einem Anstieg auf 107 mg/dl zur 30. Minute und 110 mg/dl zur 60. Minute. Gegen Ende fiel der Blutzuckerspiegel wieder auf 94 mg/dl zur 90. Minute und 97 mg/dl zur 120. Minute (Abb. 7.2).

Bei Proband 3 ergab sich anfangs ein Blutzuckerwert von 91 mg/dl, gefolgt von einem Fallen des Blutzuckerspiegels auf 83 mg/dl zur 30. Minute, 82 mg/dl zur 60. Minute, 80 mg/dl zur 90. Minute und 83 mg/dl zur 120. Minute (Abb. 7.3).

Bei Proband 4 zeigte sich zu Beginn der Messungen ein Blutzuckerwert von 96 mg/dl. Bis zur 30. Minute war der Blutzuckerspiegel auf einen hypoglykämischen Wert von 46 mg/dl gefallen. Es wurde durch die Gabe von kohlenhydratreicher Flüssigkeit und Nahrung interveniert. Die nächste Blutzuckermessung erfolgte zum Zeitpunkt der 120. Minute und ergab einen Wert von 112 mg/dl (Abb. 7.4).

Bei Proband 5 zeigte sich anfangs ein Blutzuckerwert von 88 mg/dl. Es folgte ein Anstieg der Blutglukosekonzentration auf 97 mg/dl zur 15. Minute, 100 mg/dl zur 30. Minute und 101 mg/dl zur 45. Minute. Danach fiel der Blutzuckerspiegel auf 97 mg/dl zur 60. und 90. Minute sowie 90 mg/dl zur 120. Minute (Abb. 7.5).

Bei Proband 6 zeigte sich zu Beginn ein Blutzuckerwert von 91 mg/dl, gefolgt von einem Fallen auf 89 mg/dl zur 15. Minute, 66 mg/dl zur 30. Minute und 59 mg/dl zur 45. Minute. Danach ergab sich ein Anstieg des Blutzuckerspiegels auf 76 mg/dl zur 60. Minute und 88 mg/dl zur 90. Minute. Zum Zeitpunkt der 120. Minute betrug die Blutglukosekonzentration 81 mg/dl (Abb. 7.6).

Bei Proband 7 zeigte sich anfangs ein Blutzuckerwert von 82 mg/dl. Zur 15. Minute betrug er 85 mg/dl, danach folgte ein Fallen auf 78 mg/dl zur 30. Minute, 77 mg/dl zur 45. Minute und 78 mg/dl zur 60. Minute. Zum Zeitpunkt der 90. Minute betrug die Blutglukosekonzentration wieder 82 mg/dl und zur 120. Minute 86 mg/dl (Abb. 7.7).

Bei Proband 8 ergab sich zu Beginn ein Blutzuckerwert von 96 mg/dl. Danach zeigte sich ein Fallen des Blutzuckerspiegels auf 89 mg/dl zur 15. Minute, 75 mg/dl zur 30. Minute, 73 mg/dl zur 45. Minute und 71 mg/dl zur 60. Minute. Danach stieg die Blutglukosekonzentration wieder auf 85 mg/dl zur 90. Minute und 86 mg/dl zur 120. Minute (Abb. 7.8).

Bei Proband 9 ergab sich anfangs ein Blutzuckerwert von 86 mg/dl. Danach fiel der Blutzuckerspiegel auf 84 mg/dl zur 15. Minute, 74 mg/dl zur 30. Minute und 65 mg/dl zur 45. Minute. Folgend konnte wieder ein Anstieg der Blutglukosekonzentration auf 71 mg/dl zur 60. und 90. Minute sowie 75 mg/dl zur 120. Minute verzeichnet werden (Abb. 7.9).

### **5.1.2 Unterschiede der Blutglukosedynamiken zwischen Insulin- und Placebogruppe**

Im Vergleich der Dynamiken der Blutglukosekonzentration der 9 Probanden fällt auf, dass sich bei allen Probanden, die Insulin erhielten, ein annähernd ähnlicher Verlauf ergab. So wiesen die

Probanden 1, 4, 6, 7, 8 und 9 ein Fallen des Blutzuckerspiegels nach Spraygabe mit tiefsten Werten zwischen der 30. und 60. Minute und folgendem Wiederanstieg im Verlauf auf. Bei Proband 6 und 7 sank der Blutzuckerspiegel bis zur 45. Minute auf einen Tiefstwert und stieg dann bis zur 90. Minute wieder auf Ausgangsniveau an. Bei Proband 7 zeigte sich der Verlauf bezogen auf die absolute Messwertänderung dabei nicht so ausgeprägt wie bei Proband 6. Auch bei Proband 9 zeigte sich ein Abfall mit einem minimalen Blutzuckerwert zur 45. Minute. Ein folgender Wiederanstieg des Blutzuckerspiegels konnte ebenfalls verzeichnet werden, allerdings wurde zu den übrigen Messzeitpunkten ein Anstieg bis auf Ausgangswerte nicht mehr erreicht. Bei den Probanden 1 und 8 wurden tiefste Blutzuckerwerte erst zur 60. Minute gemessen, bei Proband 1 stieg der Blutzuckerspiegel zuvor nach Messbeginn zunächst noch etwas an. Bis zur 90. Minute waren bei Proband 1 dann wieder Werte um das Ausgangsniveau erreicht. Bei Proband 8 wurde das Ausgangsniveau bei den übrigen Messungen nicht mehr ganz erreicht. Bei Proband 4 konnte ein Fallen des Blutzuckerspiegels mit hypoglykämischen Wert zur 30. Minute verzeichnet werden, so dass durch die Gabe eines kohlenhydrathaltigen Getränkes und Nahrung interveniert wurde. Die Messung zu den Zeitpunkten 60 und 90 Minuten wurde ausgesetzt. Bis zur 120. Minute lag der Blutzuckerspiegel dann wieder über dem Ausgangsniveau.

Die Probanden, die Placebo erhielten, wiesen deutlich andere Blutzuckerdynamiken auf. Bei den Probanden 2 und 5 kam es zunächst zu einem Anstieg des Blutzuckerspiegels mit maximalen Blutglukosewerten zwischen der 30. und 60. Minute. Bei Proband 2 zeigte sich der maximale Blutglukosewert zur 60. Minute, bei Proband 5 zur 45. Minute. Danach kam es bei beiden Probanden zu einem Fallen des Blutzuckerspiegels bis auf Werte etwas über dem Ausgangsniveau. Bei Proband 3 zeigten sich die Blutglukosekonzentrationen über den gesamten Messzeitraum hinweg in etwa gleichbleibend und es ergaben sich keine größeren Veränderungen.

## **5.2 Ergebnisse der VOC-Messungen per PTR-MS**

### **5.2.1 Untersuchung der 38 Variablen**

Bei 30 der 38 untersuchten Massen zeigten sich nicht bei allen Probanden Raumluftkonzentrationen, die innerhalb des zweistündigen Messzeitraumes konstant unterhalb der entsprechenden Konzentration in der Atemluft lagen. Bei einem Großteil der Probanden kam es bei diesen 30 Massen schon innerhalb der ersten 30 Minuten zu Raumluftkonzentrationen, die höher waren als die jeweilige Konzentration in der Atemluft und außerdem zeigten sich bei fast allen Probanden innerhalb der ersten 30 Minuten Raumluftkonzentrationsanteile an der jeweiligen Atemluftkonzentration von mehr als 25%. Aufgrund der hohen Raumluftkonzentrationsanteile wurden diese 30 Massen keiner weiteren Analyse zugeführt.

Nur bei 8 der 38 gemessenen Massen lagen die Raumluftkonzentrationen bei allen Probanden über den gesamten Untersuchungszeitraum hinweg unterhalb der entsprechenden Konzentration in der Atemluft und sie wurden weiter analysiert. Teilweise kam es ebenfalls zu Raumluftkonzentrationsanteilen von über 25 %. Daher wurde die Dynamik von

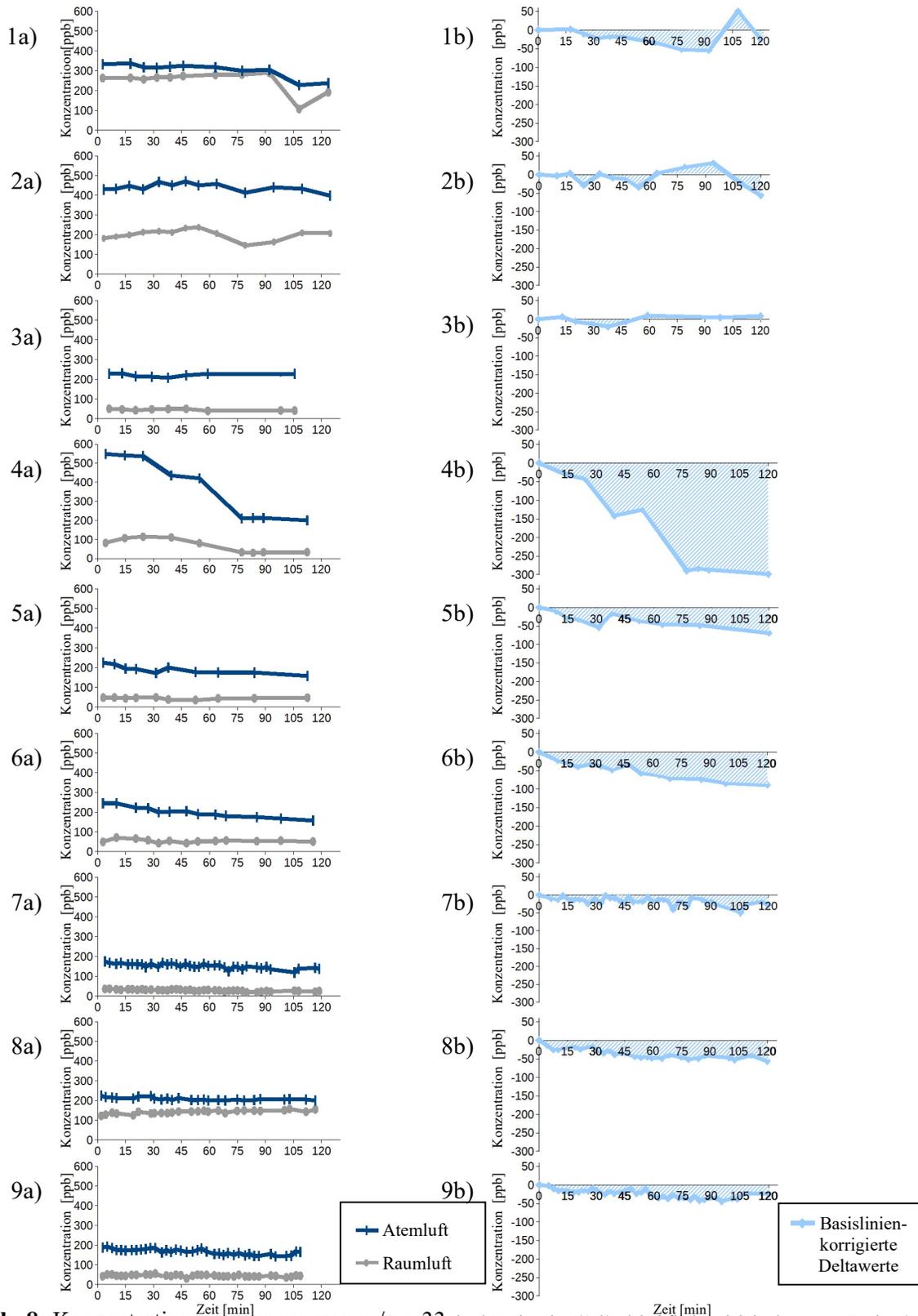
## Ergebnisse

Atemluftkonzentration und Raumlufkonzentration vor der weiteren Auswertung zunächst separat betrachtet.

Zwischen den 8 Massen sowie interindividuell ergaben sich grundsätzliche Unterschiede im Niveau der Deltawerte. Zu Messbeginn zeigten sich bei den jungen Probanden für  $m/z = 33$  Deltawerte zwischen 70 ppb und 248 ppb, für  $m/z = 51$  zwischen 5 ppb und 25 ppb, für  $m/z = 55$  zwischen 128 ppb und 760 ppb, für  $m/z = 59$  zwischen 771 ppb und 2620 ppb, für  $m/z = 63$  zwischen 9 ppb und 24 ppb, für  $m/z = 65$  zwischen 1 ppb und 5 ppb, für  $m/z = 69$  zwischen 48 ppb und 152 ppb und für  $m/z = 77$  zwischen 1 ppb und 10 ppb.

## 5.2.2 Dynamik der 8 Massen mit durchgehend positiven Deltawerten

### 5.2.2.1 $m/z = 33$



**Abb. 8:** Konzentrationsmessungen von  $m/z = 33$  der 9 Probanden (1-9); dabei finden sich in der ersten Spalte a) die absolut gemessenen Massenkonzentrationen in Atemluft (dunkelblau) und Raumluft (grau) der Probanden und in der zweiten Spalte b) jeweils die entsprechenden Basislinien-korrigierten Deltawerte eines Probanden bis zum Zeitpunkt der 120. Minute. Symbole stellen jeweils Messzeitpunkte dar, die zur Verdeutlichung des Verlaufes mit Geraden verbunden wurden. Die „Area under the curve“ ist in den Graphiken b) jeweils schraffiert worden.

**Tab. 4:** m/z = 33: Initiales Delta zwischen Raumlufkonzentration und Atemlufkonzentration sowie initialer, minimaler, maximaler und durchschnittlicher Raumlufanteil bei den Messungen

<i>Proband</i>	$\Delta$ [ppb]	<i>Raumlufanteil [%]</i>			
		initial	min.	max.	Ø
1	70	79	47	94	81
2	248	42	35	53	46
3	179	22	17	19	21
4	466	15	14	25	18
5	178	21	19	30	24
6	169	20	20	33	27
7	140	20	13	23	19
8	102	55	55	77	68
9	145	23	19	31	27

Die absolute Raumlufkonzentration von m/z = 33 zu Beginn der Messungen zeigt sich bei den Probanden 1, 2 und weniger ausgeprägt auch bei den Probanden 4 und 8 höher als bei den übrigen Probanden. Die gemessene Atemlufkonzentration liegt bei Proband 4 zu Beginn auf deutlich höherem Niveau als bei den übrigen Probanden. Bei den Probanden 1, 2 und 8 zeigen sich durchschnittliche Raumlufkonzentrationsanteile an den Atemlufkonzentrationen von 81%, 47% bzw. 68%, die deutlich höher als bei den übrigen Probanden liegen. Auch bei den Probanden 6 und 9 ergeben sich durchschnittliche Raumlufkonzentrationsanteile von etwas über 25%. Nur bei den Probanden 3, 4 und 7 macht die Raumlufkonzentration über den gesamten Messzeitraum hinweg nur einen Anteil von bis zu 25 % an der jeweiligen Atemlufkonzentration aus (vgl. Tab. 4).

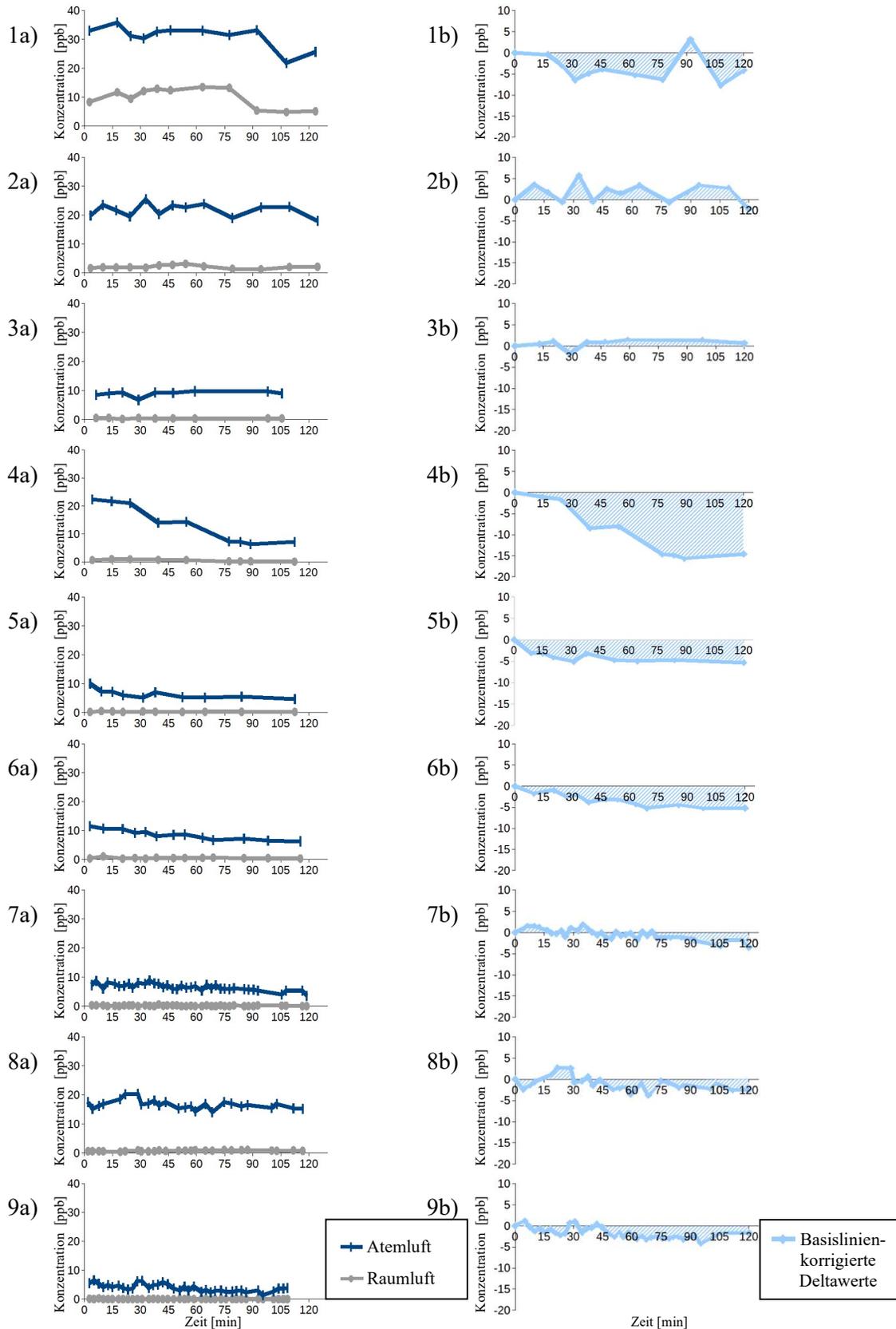
Die Dynamik der gemessenen Atemlufkonzentration über den Messzeitraum ähnelt bei den Probanden 1, 2 und 4 der Dynamik der Raumlufkonzentration. Bei Proband 1 zeigt sich die Raumlufkonzentration bis zur 92. Minute tendenziell leicht ansteigend, danach ergeben sich niedrigere Werte. Dies verhält sich ähnlich, wenn auch nicht so ausgeprägt, auch bei den Atemlufkonzentrationen. Hier zeigen sich bis zur 92. Minute zunächst Atemlufwerte auf ungefähr gleichbleibendem Niveau, danach ergeben sich niedrigere Werte. Daraus ergibt sich bei Proband 1 bei den Basislinien-korrigierten Deltawerten tendenziell ein Abfall und zur 108. Minute bei stärker ausgeprägtem Fallen der Raumlufkonzentration als Fallen der Atemlufkonzentration einmalig ein positiver Ausschlag bei den Basislinien-korrigierten Deltawerten. Bei Proband 2 zeigt sich bei den Raumlufkonzentrationen zunächst ein Anstieg bis zur 64. Minute, dann kommt es zu einem Abfall mit Tiefstwerten zur 79. Minute mit folgendem Wiederanstieg bis zum Messende. Auch hier zeigt sich bei den Atemlufkonzentrationen eine ähnliche, allerdings nicht so ausgeprägte Dynamik. Daraus ergeben sich bei Proband 2 um das Ausgangsniveau liegende Basislinien-korrigierte Deltawerte. Bei Proband 4 zeigt sich bis zur 24. Minute zunächst ein geringer Anstieg der Raumlufkonzentration, danach kommt es zu einem Fallen bis zur 77. Minute auf Werte unterhalb des Ausgangsniveaus, die sich bis zum Messende relativ konstant halten. Die Atemlufkonzentrationen zeigen sich bei Proband 4 zunächst bis zur 24. Minute auf konstantem Niveau. Dann kommt es zur 39. und 55. Minute zunächst zu einem Fallen auf ein etwas niedrigeres

Messniveau, zur 77. Minute kann ein weiterer Abfall verzeichnet werden und die Werte zeigen sich folgend bis zum Ende des Messzeitraumes konstant auf diesem Niveau. Daraus ergibt sich bei Proband 4 bei den Basislinien-korrigierten Deltawerten ein deutlicher Abfall im Zeitverlauf von der 24. Minute bis zur 77. Minute.

Die Atemluftkonzentration zeigt sich bei den Probanden 5 und 6 tendenziell über den Messzeitraum hinweg etwas abfallend, sonst ergeben sich bei den übrigen Studienteilnehmern relativ gleichbleibende Atemluftwerte. Die Raumluftkonzentration von Proband 8 zeigt tendenziell einen leichten Anstieg über den Messzeitraum, bei den übrigen Probanden ergeben sich in etwa konstante Raumluftkonzentrationen.

Ein Vergleich aller AUC-Verläufe von  $m/z = 33$  (Abb. 8) auf Basis der Basislinien-korrigierten Deltawerte der 9 Probanden ergibt bei Proband 4 eine sich deutlich von den übrigen Probanden unterscheidende Dynamik mit starkem Fallen der Basislinien-korrigierten Deltawerte von der 24. Minute bis zur 77. Minute mit ab dann deutlich negativer AUC-Fläche. Auch bei den Probanden 5 und 6 und schwächer ausgeprägt bei den Probanden 7, 8 und 9 zeigt sich ab Messbeginn bis zum Ende des Messzeitraumes tendenziell eine zunehmend negative AUC-Fläche, allerdings im Verhältnis zu den Werten von Proband 4 deutlich weniger ausgeprägt. Bei Proband 1 kommt es bis auf einen einmalig positiven Ausschlag zur 108. Minute bei stärkerem Fallen der Raumluftkonzentration als Fallen der Atemluftkonzentration tendenziell auch zu zunehmend negativen Basislinien-korrigierten Deltawerten. Bei den Probanden 2 und 3 zeigen sich die Basislinien-korrigierten Deltawerte durchgehend um das Ausgangsniveau herum. Dies spiegelt sich auch in den AUC-Berechnungen zu den 4 Vergleichszeitpunkten wider (vgl. Tab. 12 im Appendix). Insgesamt lässt sich für die Messungen von  $m/z = 33$  kein grundsätzlicher Unterschied zwischen der Gruppe mit intranasaler Insulingabe (Proband 1, 4, 6, 7, 8, 9) und der Placebogruppe (Proband 2, 3, 5) erkennen. Innerhalb der Insulingruppe unterscheidet sich die Dynamik von Proband 4 durch das ausgeprägte Fallen der Atemluftkonzentration respektive der Basislinien-korrigierten Deltawerte von etwa der 30. bis zur 75. Minute deutlich von den übrigen Probanden.

5.2.2.2  $m/z = 51$



**Abb. 9:** Konzentrationsmessungen von  $m/z = 51$  der 9 Probanden (1-9); dabei finden sich in der ersten Spalte a) die absolut gemessenen Massenkonzentrationen in Atemluft (dunkelblau) und Raumluft (grau) der Probanden und in der zweiten Spalte b) jeweils die entsprechenden Basislinien-korrigierten Deltawerte eines Probanden bis zum Zeitpunkt der 120. Minute. Symbole stellen jeweils Messzeitpunkte dar, die zur Verdeutlichung des Verlaufes mit Geraden verbunden wurden. Die „Area under the curve“ ist in den Graphiken b) jeweils schraffiert worden.

**Tab. 5:**  $m/z = 51$ : Initiales Delta zwischen Raumlufkonzentration und Atemlufkonzentration sowie initialer, minimaler, maximaler und durchschnittlicher Raumlufanteil bei den Messungen

<i>Proband</i>	$\Delta$ [ppb]	<i>Raumlufanteil [%]</i>			
		initial	min.	max.	$\bar{\Delta}$
1	25	25	20	41	31
2	18	8	5	14	9
3	8	6	2	6	5
4	22	3	1	5	4
5	10	2	2	7	5
6	11	3	3	9	6
7	7	4	0	5	2
8	17	3	2	7	5
9	5	2	0	4	0

Die absolute Raumlufkonzentration von  $m/z = 51$  zu Beginn der Messungen liegt bei Proband 1 deutlich höher als bei den übrigen Probanden, ebenso gestaltet es sich mit der Atemlufkonzentration von  $m/z = 51$  bei Proband 1. Auch bei den Probanden 2, 4 und 8 ergeben sich zu Beginn der Messungen etwas höhere Atemlufkonzentrationen als bei den restlichen Studienteilnehmern. Bei Proband 1 zeigt sich ein durchschnittlicher Raumlufkonzentrationsanteil von 31% an der Atemlufkonzentration, der deutlich höher liegt als bei den übrigen Probanden. Bei diesen ergeben sich durchschnittliche Raumlufkonzentrationsanteile von 0% bis 9% und über den gesamten Messzeitraum hinweg liegen die Raumlufkonzentrationsanteile bei ihnen konstant unter 25 % (vgl. Tab. 5).

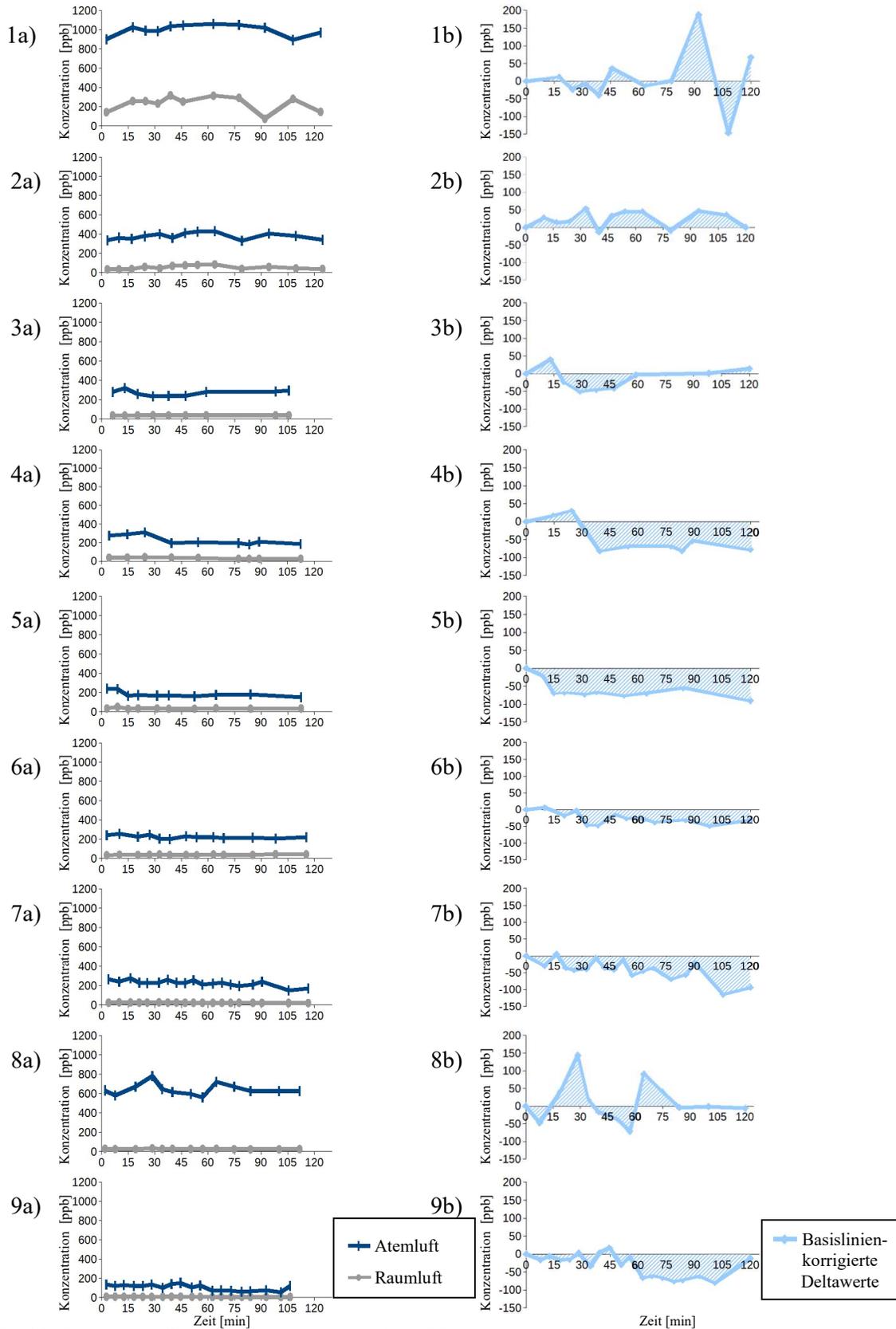
Die Dynamik der gemessenen Atemlufkonzentration über den Messzeitraum ähnelt bei Proband 1 der Dynamik der Raumlufkonzentration. So ergibt sich bei Proband 1 bei der Raumlufkonzentration bis zur 77. Minute ein leichter Anstieg, danach zeigen sich bis zum Messende Raumlufwerte auf niedrigerem, konstantem Niveau. Ähnlich, aber tendenziell etwas zeitversetzt verhält es sich bei Proband 1 auch bei den Atemlufkonzentrationen. Hier können bis zur 92. Minute Werte auf relativ gleichbleibendem Niveau verzeichnet werden, danach werden bis zum Ende des Messzeitraums niedrigere Werte gemessen. Daraus ergeben sich bei den Basislinien-korrigierten Deltawerten bei Proband 1 ab der 25. Minute Werte unterhalb des Ausgangsniveaus auf relativ gleichbleibendem Niveau mit Ausnahme eines einmalig positiven Ausschlags zur 92. Minute bei schon gefallener Raumlufkonzentration und noch konstanter Atemlufkonzentration.

Die Raumlufkonzentration liegt bei allen übrigen Probanden durchgehend auf gleichbleibendem Niveau. Bei Proband 4 zeigt die Atemlufkonzentration zunächst bis zur 24. Minute einen relativ konstanten Verlauf. Dann kommt es zur 39. und 55. Minute zunächst zu einem Fallen auf ein etwas niedrigeres Messniveau, zur 77. Minute kann ein weiterer Abfall verzeichnet werden und die Werte zeigen sich folgend bis zum Ende des Messzeitraumes konstant auf diesem Niveau. Die Atemlufkonzentrationen bei den Probanden 5, 6, 7 und 9 zeigen sich tendenziell über den Messzeitraum hinweg etwas abfallend, bei den restlichen Studienteilnehmern ergeben sich Atemlufwerte im Bereich des Ausgangsniveaus.

Ein Vergleich aller AUC-Verläufe von  $m/z = 51$  (Abb. 9) auf Basis der Basislinien-korrigierten Deltawerte der 9 Probanden ergibt erneut bei Proband 4 eine sich deutlich von den übrigen Probanden unterscheidende Dynamik mit starkem Abfall der Basislinien-korrigierten Deltawerte von der 24. Minute bis zur 77. Minute und ab dann deutlich negativer AUC-Flächen. Auch bei den Probanden 5 und 6 und schwächer ausgeprägt bei den Probanden 7, 8 und 9 zeigen sich ab Messbeginn bis zum Messende tendenziell zunehmend negative AUC-Flächen, allerdings im Verhältnis zu den Werten von Proband 4 deutlich weniger ausgeprägt. Bei Proband 1 kommt es bis auf einen einmalig positiven Ausschlag zur 92. Minute bei schon gefallener Raumluftkonzentration und noch konstanter Atemluftkonzentration tendenziell auch zu zunehmend negativen Basislinien-korrigierten Deltawerten. Die Basislinien-korrigierten Deltawerte liegen bei Proband 2 meist etwas oberhalb des Ausgangsniveaus und bei Proband 3 in etwa im Bereich des Ausgangsniveaus. Dies spiegelt sich auch in den AUC-Berechnungen zu den 4 Vergleichszeitpunkten wider (vgl. Tab. 13 im Appendix).

Insgesamt lässt sich für die Messungen von  $m/z = 51$  kein grundsätzlicher Unterschied zwischen der Gruppe mit intranasaler Insulingabe (Proband 1, 4, 6, 7, 8, 9) und der Placebogruppe (Proband 2, 3, 5) erkennen. Innerhalb der Insulingruppe unterscheidet sich die Dynamik von Proband 4 durch das Fallen der Atemluftkonzentration respektive der Basislinien-korrigierten Deltawerte von etwa der 30. bis zur 75. Minute deutlich von den übrigen Probanden.

5.2.2.3  $m/z = 55$



**Abb. 10:** Konzentrationsmessungen von  $m/z = 55$  der 9 Probanden (1-9); dabei finden sich in der ersten Spalte a) die absolut gemessenen Massenkonzentrationen in Atemluft (dunkelblau) und Raumluft (grau) der Probanden und in der zweiten Spalte b) jeweils die entsprechenden Basislinien-korrigierten Deltawerte (hellblau) eines Probanden bis zum Zeitpunkt der 120. Minute. Symbole stellen jeweils Messzeitpunkte dar, die zur Verdeutlichung des Verlaufes mit Geraden verbunden wurden. Die „Area under the curve“ ist in den Graphiken b) jeweils schraffiert worden.

**Tab. 6:**  $m/z = 55$ : Initiales Delta zwischen Raumluftkonzentration und Atemluftkonzentration sowie initialer, minimaler, maximaler und durchschnittlicher Raumluftanteil bei den Messungen

<i>Proband</i>	$\Delta$ [ppb]	<i>Raumluftanteil [%]</i>			
		initial	min.	max.	$\emptyset$
1	760	16	7	31	23
2	302	10	9	20	14
3	245	13	12	17	14
4	234	14	13	21	15
5	205	14	14	23	19
6	210	13	13	21	17
7	243	9	8	14	10
8	605	5	4	5	4
9	128	6	5	11	7

Die absolute Raumluftkonzentration von  $m/z = 55$  zu Beginn der Messungen ist bei Proband 1 deutlich höher als bei den übrigen Probanden. Die Atemluftkonzentration zu Beginn der Messungen liegt ebenfalls bei Proband 1, geringer ausgeprägt auch bei Proband 8, über dem Konzentrationsniveau der anderen Probanden. Bei Proband 1 zeigt sich ein durchschnittlicher Raumluftkonzentrationsanteil an den Atemluftkonzentrationen von 23%, der etwas höher als bei den anderen Probanden ist. Bei diesen ergeben sich durchschnittliche Raumluftkonzentrationsanteile von 4% bis 19%. Außer bei Proband 1 zeigen sich bei allen anderen Probanden über den gesamten Messzeitraum hinweg Raumluftkonzentrationsanteile von konstant unter 25% (vgl. Tab. 6).

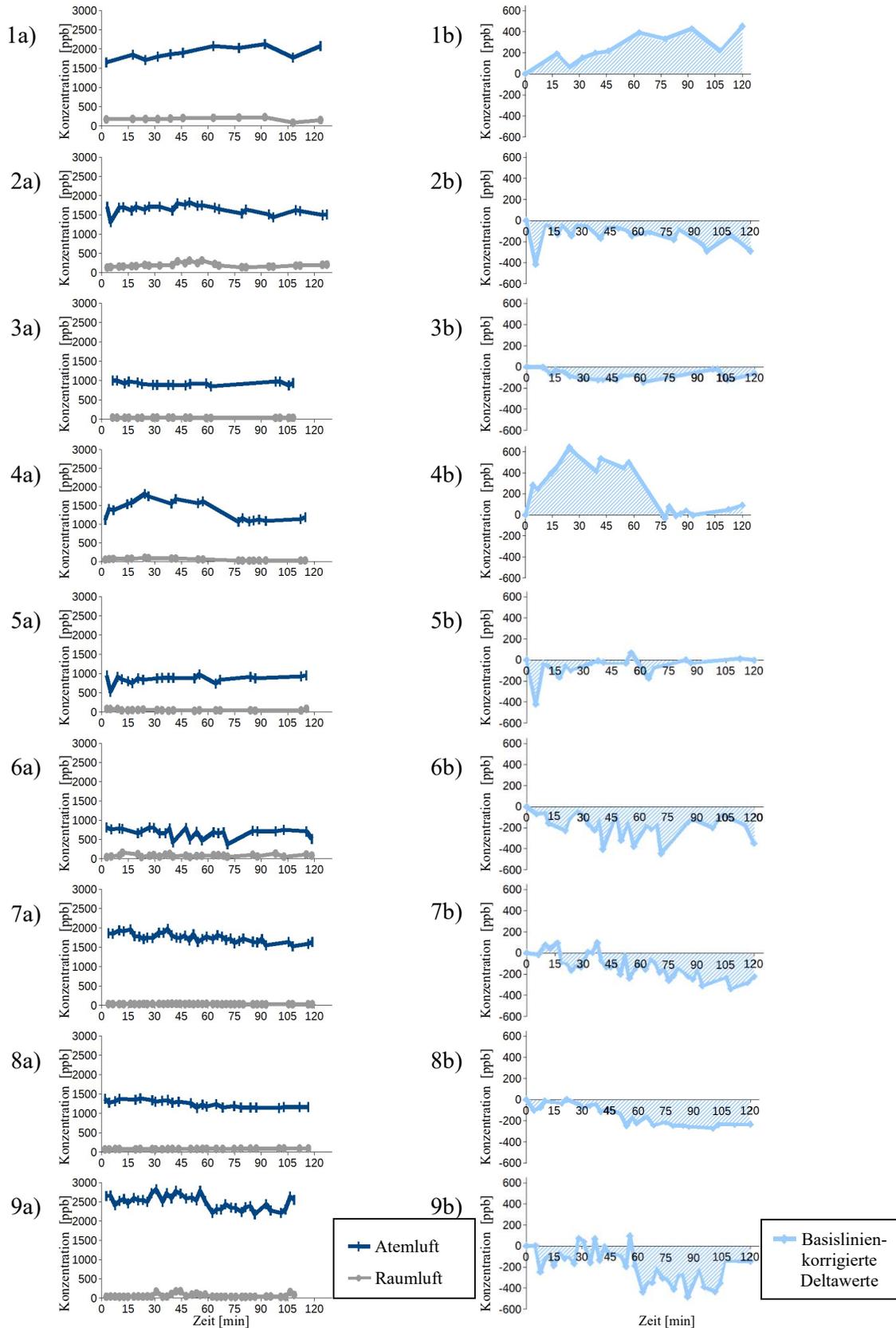
Die Dynamik der gemessenen Atemluftkonzentration über den Messzeitraum ähnelt bei Proband 1 und geringer ausgeprägt auch bei Proband 2 der Dynamik der Raumluftkonzentration. Bei Proband 1 ergibt sich ein Anstieg der Raumluftkonzentration bis zur 77. Minute, dann kommt es zu einem Abfall zur 92. Minute mit danach folgendem Wiederanstieg. Dies verhält sich bei den Atemluftkonzentrationen ähnlich, wenn auch nicht so ausgeprägt und etwas zeitversetzt. Hier zeigt sich ebenfalls ein Anstieg bis zur 77. Minute, danach kommt es zu einem flachen Abfall mit tiefsten Werten in der 108. Minute und folgendem Wiederanstieg. Daraus ergeben sich bei den Basislinienkorrigierten Deltawerten bei Proband 1 bis zur 77. Minute um das Ausgangsniveau liegende Werte mit deutlich positivem Ausschlag zur 92. Minute bei schon stärker gefallener Raumluftkonzentration und noch nicht so stark gefallener Atemluftkonzentration sowie deutlich negativem Ausschlag zur 108. Minute bei schon wieder angestiegener Raumluftkonzentration und noch nicht wieder angestiegener Atemluftkonzentration. Bei Proband 2 zeigt sich bei den Raumluftkonzentrationen zunächst ein leichter Anstieg bis zur 64. Minute. Dann kommt es zu einem leichten Abfallen mit Tiefstwerten um die 79. Minute mit folgendem dezentem Wiederanstieg zur 94. Minute. Danach zeigt sich bis zum Ende der Messungen tendenziell erneut ein leichter Abfall der Raumluftwerte. Die Dynamik der Atemluftkonzentration ist sehr ähnlich. Daraus ergeben sich bei Proband 2 meist etwas oberhalb des Ausgangsniveaus liegende Basislinienkorrigierten Deltawerte.

Die Raumlufkonzentration bei den übrigen Probanden liegt durchgehend auf gleichbleibendem Niveau. Bei Proband 4 zeigt sich zunächst ein geringer Anstieg der Atemluftkonzentrationen bis zur 24. Minute, danach ergibt sich ein Abfallen zur 39. Minute auf ein bis Messende relativ konstantes Niveau. Bei Proband 5 zeigen sich zu Beginn der Messungen zunächst bis zur 9. Minute gleichbleibende Atemluftkonzentrationen, danach ergibt sich ein Abfallen zur 15. Minute auf ein niedrigeres, bis Messende relativ konstantes Niveau. Bei Proband 6 zeigen sich ab der 33. Minute und bei Proband 9 ab der 54. Minute Atemluftwerte unterhalb des Ausgangsniveaus. Bei Proband 7 ergeben sich im Messverlauf tendenziell etwas abfallende Atemluftkonzentrationen. Bei den Probanden 3 und 8 zeigen sich Atemluftkonzentrationen mit mehr oder weniger ausgeprägten Schwankungen im Bereich des Ausgangsniveaus.

Ein Vergleich aller AUC-Verläufe von  $m/z = 55$  (Abb. 10) auf Basis der Basislinien-korrigierten Deltawerte der 9 Probanden zeigt bei den Probanden 4, 5, 6, 7 und 9 Schwankungen vor allem unterhalb des Ausgangsniveaus. Bei Proband 2 zeigt sich ein schwankender Verlauf vor allem oberhalb des Ausgangsniveaus und bei den Probanden 1, 3 und 8 zeigen sich mehr oder weniger stark ausgeprägte Schwankungen im Bereich des Ausgangsniveaus. Die Verläufe bei den einzelnen Probanden gestalten sich innerhalb dieser 3 Gruppen sehr heterogen. Dies spiegelt sich auch in den AUC-Berechnungen zu den 4 Vergleichszeitpunkten wider (vgl. Tab. 14 im Appendix).

Insgesamt lässt sich für die Messungen von  $m/z = 55$  kein grundsätzlicher Unterschied zwischen der Gruppe mit intranasaler Insulingabe (Proband 1, 4, 6, 7, 8, 9) und der Placebogruppe (Proband 2, 3, 5) erkennen.

5.2.2.4  $m/z = 59$



**Abb. 11:** Konzentrationsmessungen von  $m/z = 59$  der 9 Probanden (1-9); dabei finden sich in der ersten Spalte a) die absolut gemessenen Massenkonzentrationen in Atemluft (dunkelblau) und Raumluft (grau) der Probanden und in der zweiten Spalte b) jeweils die entsprechenden Basislinien-korrigierten Deltawerte (hellblau) eines Probanden bis zum Zeitpunkt der 120. Minute. Symbole stellen jeweils Messzeitpunkte dar, die zur Verdeutlichung des Verlaufes mit Geraden verbunden wurden. Die „Area under the curve“ ist in den Graphiken b) jeweils schraffiert worden.

**Tab. 7:**  $m/z = 59$ : Initiales Delta zwischen Raumlufkonzentration und Atemlufkonzentration sowie initialer, minimaler, maximaler und durchschnittlicher Raumlufanteil bei den Messungen

<i>Proband</i>	$\Delta$ [ppb]	<i>Raumlufanteil [%]</i>			
		initial	min.	max.	$\bar{\Delta}$
1	1477	10	5	11	10
2	1580	8	8	18	12
3	961	5	4	5	4
4	1066	5	2	6	4
5	869	8	4	15	6
6	771	5	5	20	12
7	1838	2	2	2	2
8	1309	5	5	8	7
9	2620	1	1	7	2

Die absolute Raumlufkonzentration von  $m/z = 59$  zu Beginn der Messungen ergibt bei den Probanden 1 und 2 eine etwas höhere Konzentration als bei den übrigen Studienteilnehmern. Die Atemlufkonzentration zu Beginn der Messungen liegt bei den Probanden 7 und 9 über dem Niveau der anderen Probanden, bei den Probanden 3, 5 und 6 zeigt sich eine geringere Atemlufkonzentrationen als bei den übrigen Probanden. Insgesamt ergeben sich bei allen Studienteilnehmern niedrige durchschnittliche Raumlufkonzentrationsanteile von 2 % bis 12 % und über den gesamten Messzeitraum hinweg liegen die Raumlufanteile bei allen Probanden konstant unter 25 % (vgl. Tab. 7).

Bei den Probanden 1 und 2 ergibt sich bei der Raumlufkonzentration über den Messezeitraum eine gering ausgeprägte Dynamik, die sich ähnlich auch in der Atemlufkonzentration darstellt. Bei Proband 1 zeigt sich ein Anstieg der Atemlufkonzentration über den Messzeitraum hinweg, zur 108. Minute wird einmalig ein etwas niedrigerer Wert gemessen. Bei der Raumlufkonzentration kann zur 108. Minute ebenfalls mit geringerer Ausprägung ein niedrigerer Wert gemessen werden. Bei Proband 2 zeigen sich zunächst bis zur 57. Minute Atemlufwerte auf ungefähr demselben Niveau, danach werden tendenziell etwas niedrigere Werte gemessen. Auch dies findet sich ähnlich mit geringerer Ausprägung in den Werten der Raumlufkonzentration. Daraus ergibt sich bei den Basislinien-korrigierten Deltawerten bei Proband 1 tendenziell ein Anstieg über den gesamten Messzeitraum hinweg mit einem einmalig prägnanterem Abfall zur 108. Minute, bei verhältnismäßig stärker ausgeprägtem Fallen der Atemlufkonzentration als Fallen der Raumlufkonzentration, bei Proband 2 liegen die Werte durchgehend etwas unterhalb des Ausgangsniveaus.

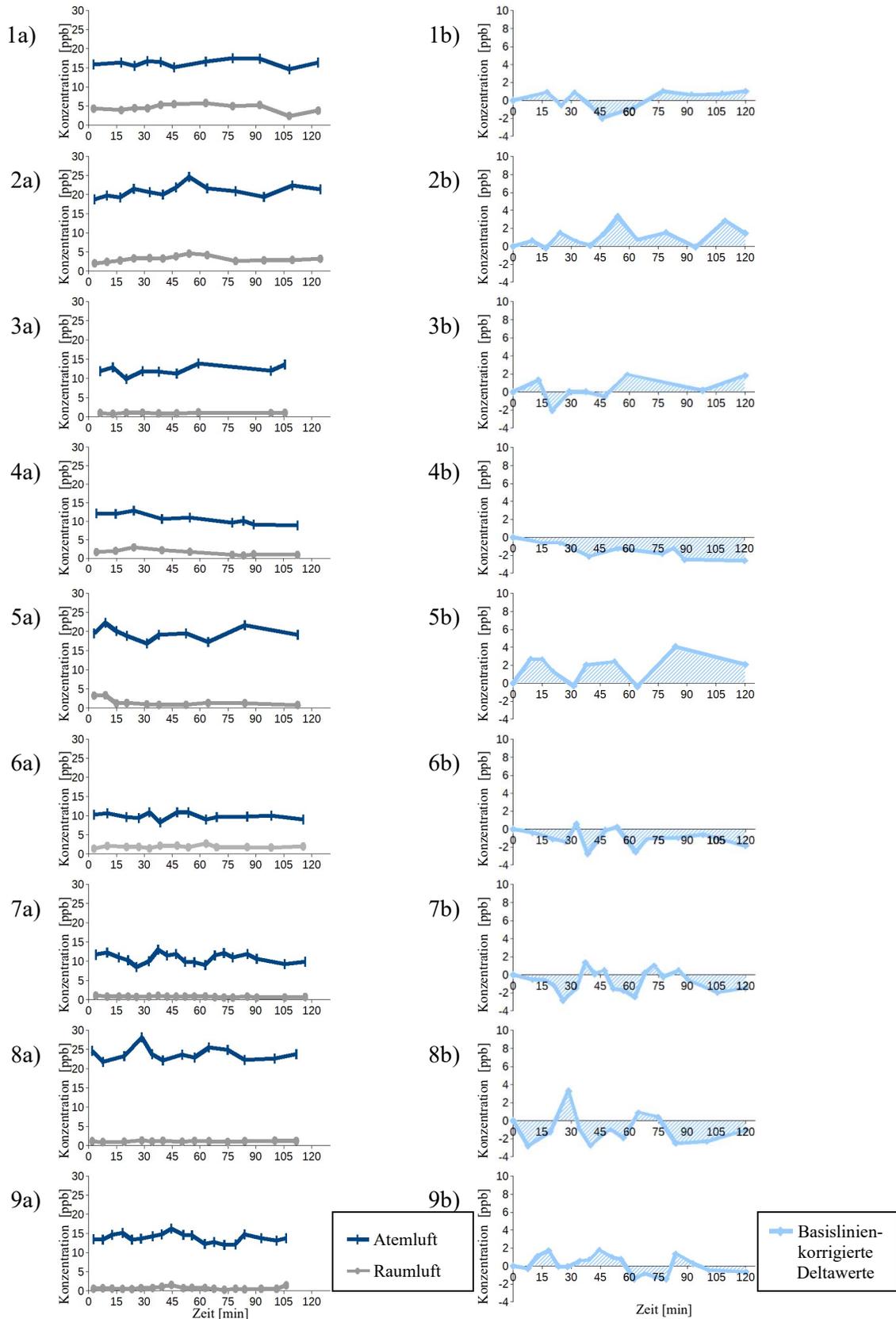
Bei den übrigen Probanden zeigen sich alle Raumlufkonzentrationen auf etwa gleichbleibendem Niveau. Bei den Atemlufkonzentrationen ergibt sich bei Proband 4 zunächst ein starker kontinuierlicher Anstieg bis zur 26. Minute. Dann kommt es zur 39. Minute zunächst zu einem Fallen auf ein etwas niedrigeres Messniveau, das bis zur 57. Minute gehalten wird. Zur 77. Minute kann ein weiteres Abfallen auf Ausgangsniveau verzeichnet werden und die Atemlufkonzentrationswerte zeigen sich folgend bis zum Messende auf diesem Ausgangsniveau.

Bei den Probanden 7 und 8 ergeben sich im Verlauf des Messzeitraumes tendenziell leicht abfallende Atemluftkonzentrationen. Bei Proband 9 werden in der zweiten Stunde des Messzeitraumes geringere Atemluftkonzentrationen als in der ersten Stunde gemessen und bei den Probanden 3, 5 und 6 ergeben sich mehr oder weniger stark ausgeprägte Schwankungen der Atemluftwerte auf etwa gleichbleibendem Niveau.

Ein Vergleich aller AUC-Verläufe von  $m/z = 59$  (Abb. 11) auf Basis der Basislinien-korrigierten Deltawerte der 9 Probanden zeigt bei den Probanden 1 und 4 jeweils Dynamiken, die sich deutlich von den übrigen Probanden unterscheiden. Bei Proband 1 ergibt sich ab Messbeginn über den gesamten Messzeitraum hinweg ein Anstieg. Bei Proband 4 kommt es zunächst zu ansteigenden Basislinien-korrigierten Deltawerten bis zur 26. Minute, danach ergibt sich bis zur 77. Minute ein Abfallen auf Ausgangsniveau, das bis zum Ende des Messzeitraumes gehalten wird. Bei den übrigen Probanden ergeben sich Basislinien-korrigierten Deltawerte, die vor allem unterhalb des Ausgangsniveaus liegen. Dabei zeigen sich die Werte der Probanden 7 und 8 ab etwa der 40. Minute über den restlichen Messzeitraum tendenziell abfallend. Bei Proband 6 zeigen sich ab etwa der 40. bis 90. Minute ausgeprägte Schwankungen deutlich unterhalb des Ausgangsniveaus. Bei Proband 9 ergeben sich zunächst Schwankungen in etwa im Bereich des Ausgangsniveaus, dann werden ab etwa der 60. bis zur 100. Minute Basislinien-korrigierten Deltawerte deutlich unterhalb des Ausgangsniveaus gemessen. Bei den Probanden 2, 3 und 5 liegen die Basislinien-korrigierten Deltawerte über den gesamten Messzeitraum in ungefähr gleichbleibender Konzentration vor allem etwas unterhalb des Ausgangsniveaus. Dies spiegelt sich auch in den AUC-Berechnungen zu den 4 Vergleichszeitpunkten wider (vgl. Tab. 15 im Appendix).

Insgesamt lässt sich für die Messungen von  $m/z = 59$  kein grundsätzlicher Unterschied zwischen der Gruppe mit intranasaler Insulingabe (Proband 1, 4, 6, 7, 8, 9) und der Placebogruppe (Proband 2, 3, 5) erkennen. Mit Ausnahme von Proband 1 weisen aber alle Probanden der Insulingruppe mit unterschiedlicher Ausprägung ein Fallen der Konzentration von  $m/z = 59$  zwischen der 40. und 60. Minute auf. Bei Proband 4 hält das Abfallen bis zur etwa 75. Minute an, bei den Probanden 7 und 8 bis zum Messende und bei den Probanden 6 und 9 können im Verlauf ab der etwa 90. bzw. 100. Minute wieder höhere Konzentrationen gemessen werden.

5.2.2.5 m/z = 63



**Abb. 12:** Konzentrationsmessungen von  $m/z = 63$  der 9 Probanden (1-9); dabei finden sich in der ersten Spalte a) die absolut gemessenen Massenkonzentrationen in Atemluft (dunkelblau) und Raumluft (grau) der Probanden und in der zweiten Spalte b) jeweils die entsprechenden Basislinien-korrigierten Deltawerte (hellblau) eines Probanden bis zum Zeitpunkt der 120. Minute. Symbole stellen jeweils Messzeitpunkte dar, die zur Verdeutlichung des Verlaufes mit Geraden verbunden wurden. Die „Area under the curve“ ist in den Graphiken b) jeweils schraffiert worden.

**Tab. 8:**  $m/z = 63$ : Initiales Delta zwischen Raumluftkonzentration und Atemluftkonzentration sowie initialer, minimaler, maximaler und durchschnittlicher Raumluftanteil bei den Messungen

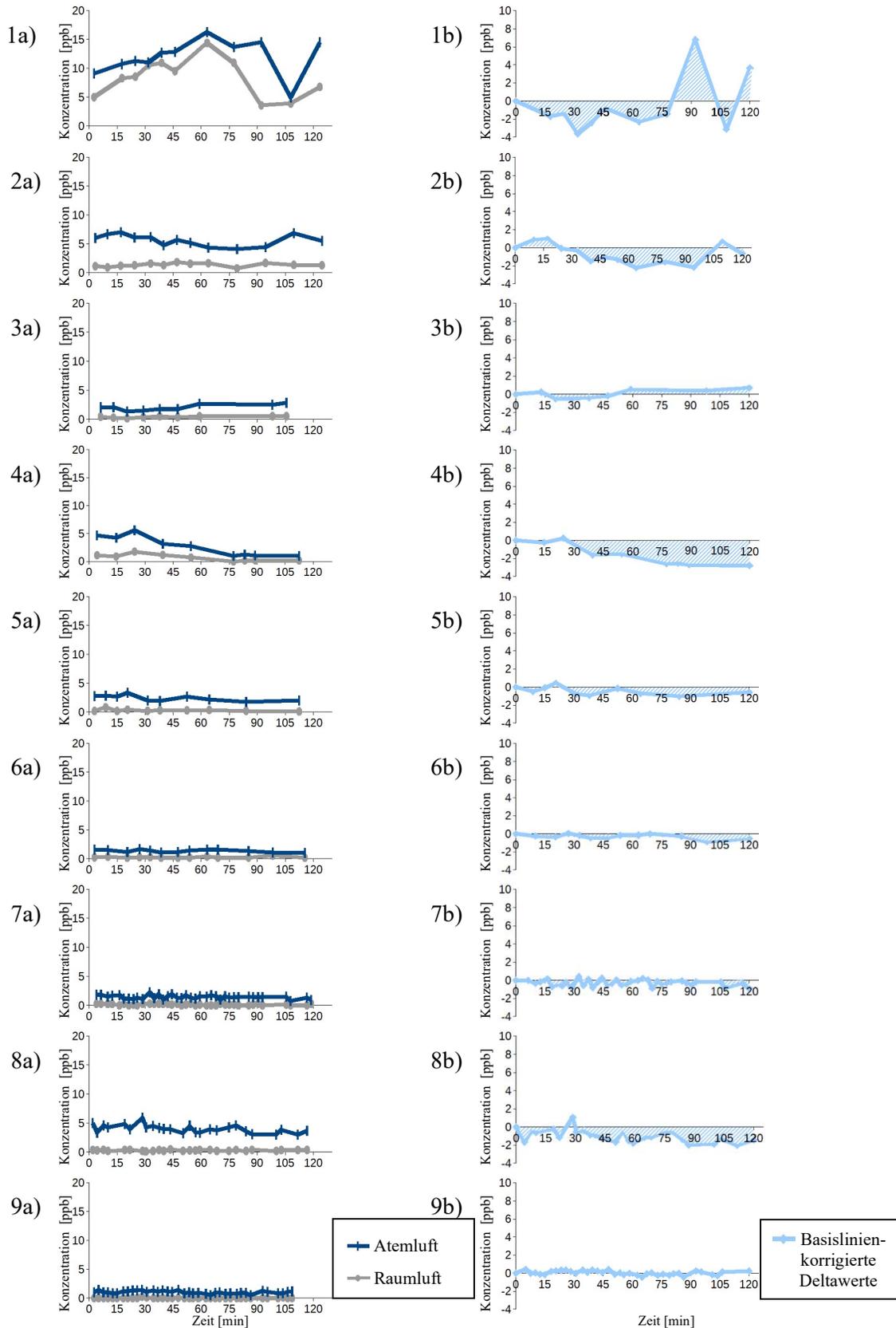
<i>Proband</i>	$\Delta$ [ppb]	<i>Raumluftanteil [%]</i>			
		initial	min.	max.	$\bar{\Delta}$
1	12	27	17	37	28
2	17	11	11	19	15
3	11	9	6	11	8
4	10	14	8	23	15
5	16	17	4	17	8
6	9	14	13	30	19
7	11	9	5	10	7
8	24	5	4	6	5
9	13	4	2	11	5

Die absolute Raumluftkonzentration von  $m/z = 63$  zu Beginn der Messungen ergibt bei Proband 1 eine etwas höhere Konzentration als bei den übrigen Studienteilnehmern. Bei der Atemluftkonzentration zu Beginn der Messungen zeigen sich bei den Probanden 2, 5 und 8 Werte über dem Niveau der anderen Probanden, bei Proband 6 liegt diese etwas niedriger als bei den übrigen Studienteilnehmern. Bei Proband 1 zeigt sich ein durchschnittlicher Raumluftkonzentrationsanteil von 28%, bei den übrigen Probanden ergeben sich niedrigere Raumluftanteile von durchschnittlich 5% bis 19%. Außer bei den Probanden 1 und 2 liegen die Raumluftkonzentrationsanteile bei allen übrigen Probanden über den Messezeitraum hinweg konstant unter 25% (vgl. Tab. 8).

Bei den Probanden 1, 2 und 4 zeigen sich bei den Atemluftkonzentrationen gering ausgeprägte Dynamiken, die sich ähnlich auch in der Dynamik der Raumluftkonzentration wiederfinden. Daraus ergeben sich bei Proband 1 Basislinien-korrigierten Deltawerten in etwa im Bereich des Ausgangsniveaus, bei Proband 2 liegen sie etwas oberhalb und bei Proband 4 etwas unterhalb des Ausgangsniveaus. Bei den übrigen Probanden zeigen sich über den Messezeitraum gleichbleibend niedrige Raumluftkonzentrationen. Die Atemluftkonzentration liegt bei Proband 5 vor allem oberhalb, bei den übrigen Probanden 3, 6, 7, 8 und 9 in etwa im Bereich des Ausgangsniveaus. Ein Vergleich aller AUC-Verläufe von  $m/z = 63$  (Abb. 12) auf Basis der Basislinien-korrigierten Deltawerten der 9 Probanden ergibt bei Proband 4 tendenziell ein Abfallen der Basislinien-korrigierten Deltawerte über den gesamten Messzeitraum mit negativer AUC-Fläche. Bei den Probanden 2 und 5 liegen die Basislinien-korrigierten Deltawerte vor allem oberhalb des Ausgangsniveaus mit positiver AUC-Fläche. Bei den übrigen Probanden liegen die Werte in etwa im Bereich des Ausgangsniveaus. Dies spiegelt sich auch in den AUC-Berechnungen zu den 4 Vergleichszeitpunkten wider (vgl. Tab. 16 im Appendix).

Insgesamt lässt sich für die Messungen von  $m/z = 63$  kein grundsätzlicher Unterschied zwischen der Gruppe mit intranasaler Insulingabe (Proband 1, 4, 6, 7, 8, 9) und der Placebogruppe (Proband 2, 3, 5) erkennen.

5.2.2.6  $m/z = 65$



**Abb. 13:** Konzentrationsmessungen von  $m/z = 65$  der 9 Probanden (1-9); dabei finden sich in der ersten Spalte a) die absolut gemessenen Massenkonzentrationen in Atemluft (dunkelblau) und Raumluft (grau) der Probanden und in der zweiten Spalte b) jeweils die entsprechenden Basislinien-korrigierten Deltawerte (hellblau) eines Probanden bis zum Zeitpunkt der 120. Minute. Symbole stellen jeweils Messzeitpunkte dar, die zur Verdeutlichung des Verlaufes mit Geraden verbunden wurden. Die „Area under the curve“ ist in den Graphiken b) jeweils schraffiert worden.

**Tab. 9:**  $m/z = 65$ : Initiales Delta zwischen Raumluftkonzentration und Atemluftkonzentration sowie initialer, minimaler, maximaler und durchschnittlicher Raumluftanteil bei den Messungen

<i>Proband</i>	$\Delta$ [ppb]	<i>Raumluftanteil [%]</i>			
		initial	min.	max.	$\bar{\Delta}$
1	4	55	25	95	71
2	5	19	13	38	25
3	2	21	13	30	20
4	4	24	0	37	22
5	3	7	5	28	12
6	1	14	14	53	20
7	2	14	9	29	11
8	5	7	2	12	8
9	1	0	0	17	1

Die absolute Raumluftkonzentration von  $m/z = 65$  zu Beginn der Messungen ergibt bei Proband 1 eine etwas höhere Konzentration als bei den übrigen Studienteilnehmern. Die Atemluftkonzentration zu Beginn der Messungen zeigt sich ebenfalls bei Proband 1 höher als bei den anderen Probanden. Bei Proband 1 beträgt der durchschnittliche Raumluftanteil 71 %, bei den übrigen Probanden ergeben sich niedrigere Raumluftanteile von durchschnittlich 1% bis 25 %. Nur bei den Probanden 8 und 9 zeigt sich über den gesamten Messzeitraum hinweg ein Raumluftkonzentrationsanteil von konstant unter 25 % (vgl. Tab. 9).

Bei Proband 1 zeigt sich bei der Atemluftkonzentration eine ausgeprägte Dynamik über den Messzeitraum, die sich ähnlich auch in den Raumluftkonzentrationen wiederfindet. Es ergibt sich ein Anstieg der Raumluftkonzentration bis zur 63. Minute, danach kommt es zu einem Abfall bis zur 92. Minute mit dezentem Wiederanstieg bis zum Ende des Messzeitraumes.

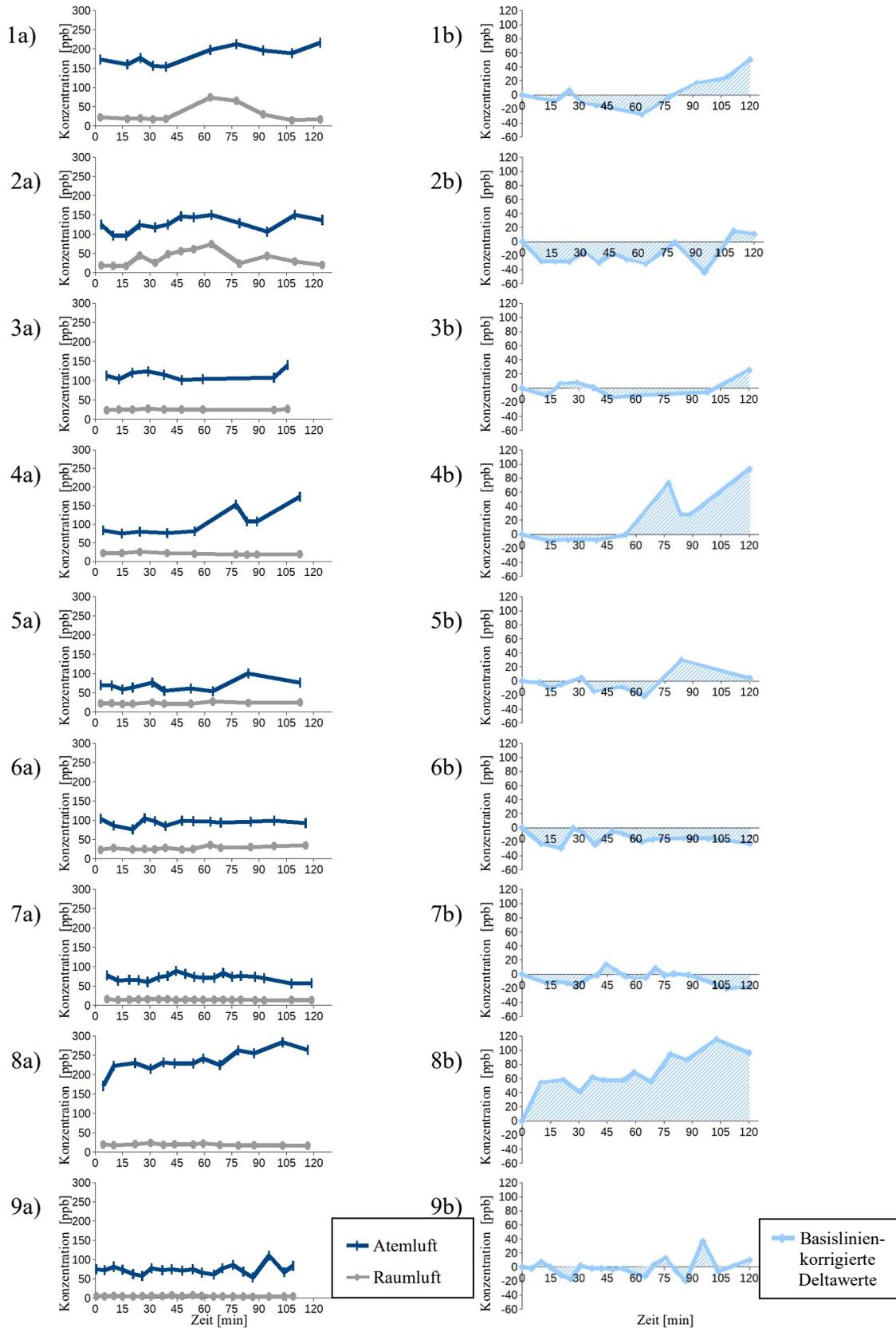
Bei der Atemluftkonzentration zeigt sich ein Anstieg bis zur 63. Minute, zur 108. Minute ergibt sich einmalig ein niedrigerer Wert, danach wird wieder eine höhere Konzentration in der Atemluft gemessen. Daraus ergeben sich bei Proband 1 Basislinien-korrigierte Deltawerte im Bereich des Ausgangsniveaus mit stärkerem positivem Ausschlag zum Zeitpunkt der 92. Minute, zu dem die Raumluftkonzentration schon deutlich niedriger als zuvor war und die Atemluftkonzentration noch nicht gefallen war. Auch bei den Probanden 2 und 4 ergeben sich bei den Raumluftkonzentrationen gering ausgeprägte Dynamiken, die sich ähnlich in der Atemluftkonzentration wiederfinden. Bei Proband 2 zeigen sich ein Anstieg der Raumluftkonzentration bis zur 64. Minute und ein Abfallen zur 79. Minute. Bis zum Messende werden danach wieder höhere Raumluftkonzentrationen gemessen. Bei der Atemluftkonzentration wird zunächst bis zur 17. Minute ein geringer Anstieg verzeichnet. Dann zeigt sich bis zur 94. Minute ein Abfallen, danach können wieder höhere Atemluftwerte gemessen werden. Die Basislinien-korrigierten Deltawerte daraus ergeben bei Proband 2 zunächst einen minimalen Anstieg bis zur 17. Minute und danach ein Abfallen. Ab der 24. Minute zeigen sich dann Werte unterhalb des Ausgangsniveaus, die bis zur 94. Minute tendenziell weiter leicht fallen. Danach kann wieder ein Anstieg auf Ausgangsniveaus verzeichnet werden. Bei Proband 4 ergibt sich sowohl bei den Atemluftkonzentrationen, als auch weniger

ausgeprägt bei den Raumluftkonzentrationen zunächst ein minimaler Anstieg bis zur 24. Minute, dann zeigt sich bis zur 77. Minute ein Abfallen und danach wieder ein konstanter Verlauf auf ungefähr diesem Niveau bis zum Messende. Daraus ergeben sich bei Proband 4 zunächst bis zur 24. Minute Basislinien-korrigierte Deltawerte in etwa im Bereich des Ausgangsniveaus, dann fallen sie bis zur 77. Minute und zeigen sich danach bis zum Messende konstant. Bei den anderen Studienteilnehmern sind sowohl die Raumluftkonzentrationen, als auch die Atemluftkonzentrationen über den Messzeitraum hinweg relativ konstant.

Ein Vergleich aller AUC-Verläufe von  $m/z = 65$  (Abb. 13) auf Basis der Basislinien-korrigierten Deltawerte der 9 Probanden zeigt bei Proband 4 ab etwa der 30. bis zur 75. Minute einen Abfall. Bei Proband 2 können von der etwa 30. bis zur ungefähr 100. Minute niedrigere Werte gemessen werden, bevor sich bis zum Messende wieder Werte im Bereich des Ausgangsniveaus ergeben. Bei Proband 1 kommt es zunächst bis zur etwa 75. Minute zu relativ konstanten Basislinien-korrigierten Deltawerte unterhalb des Ausgangsniveaus, danach ergeben sich ausgeprägte Schwankungen im Bereich des Ausgangsniveaus, die in zeitlichem Zusammenhang mit dem deutlichen Fallen der Raumluftkonzentration stehen. Bei allen übrigen Probanden zeigen sich über den gesamten Messzeitraum relativ konstante Basislinien-korrigierte Deltawerte, die bei den Probanden 3, 6, 7 und 9 im Bereich des Ausgangsniveaus liegen, bei Proband 8 liegen sie etwas unterhalb. Dies spiegelt sich auch in den AUC-Berechnungen zu den 4 Vergleichszeitpunkten wider (vgl. Tab. 17 im Appendix).

Insgesamt lässt sich für die Messungen von  $m/z = 65$  kein grundsätzlicher Unterschied zwischen der Gruppe mit intranasaler Insulingabe (Proband 1, 4, 6, 7, 8, 9) und der Placebogruppe (Proband 2, 3, 5) erkennen.

5.2.2.7  $m/z = 69$



**Abb. 14:** Konzentrationsmessungen von  $m/z = 69$  der 9 Probanden (1-9); dabei finden sich in der ersten Spalte a) die absolut gemessenen Massenkonzentrationen in Atemluft (dunkelblau) und Raumluft (grau) der Probanden und in der zweiten Spalte b) jeweils die entsprechenden Basislinien-korrigierten Deltawerte (hellblau) eines Probanden bis zum Zeitpunkt der 120. Minute. Symbole stellen jeweils Messzeitpunkte dar, die zur Verdeutlichung des Verlaufes mit Geraden verbunden wurden. Die „Area under the curve“ ist in den Graphiken b) jeweils schraffiert worden.

**Tab. 10:**  $m/z = 69$ : Initiales Delta zwischen Raumlufkonzentration und Atemlufkonzentration sowie initialer, minimaler, maximaler und durchschnittlicher Raumlufanteil bei den Messungen

<i>Proband</i>	$\Delta$ [ppb]	<i>Raumlufanteil [%]</i>			
		initial	min.	max.	$\bar{\Delta}$
1	150	13	8	38	14
2	107	15	15	49	28
3	89	21	19	25	22
4	61	27	11	32	23
5	48	32	24	51	35
6	81	22	22	37	30
7	62	21	16	26	21
8	152	11	6	11	9
9	70	7	4	10	7

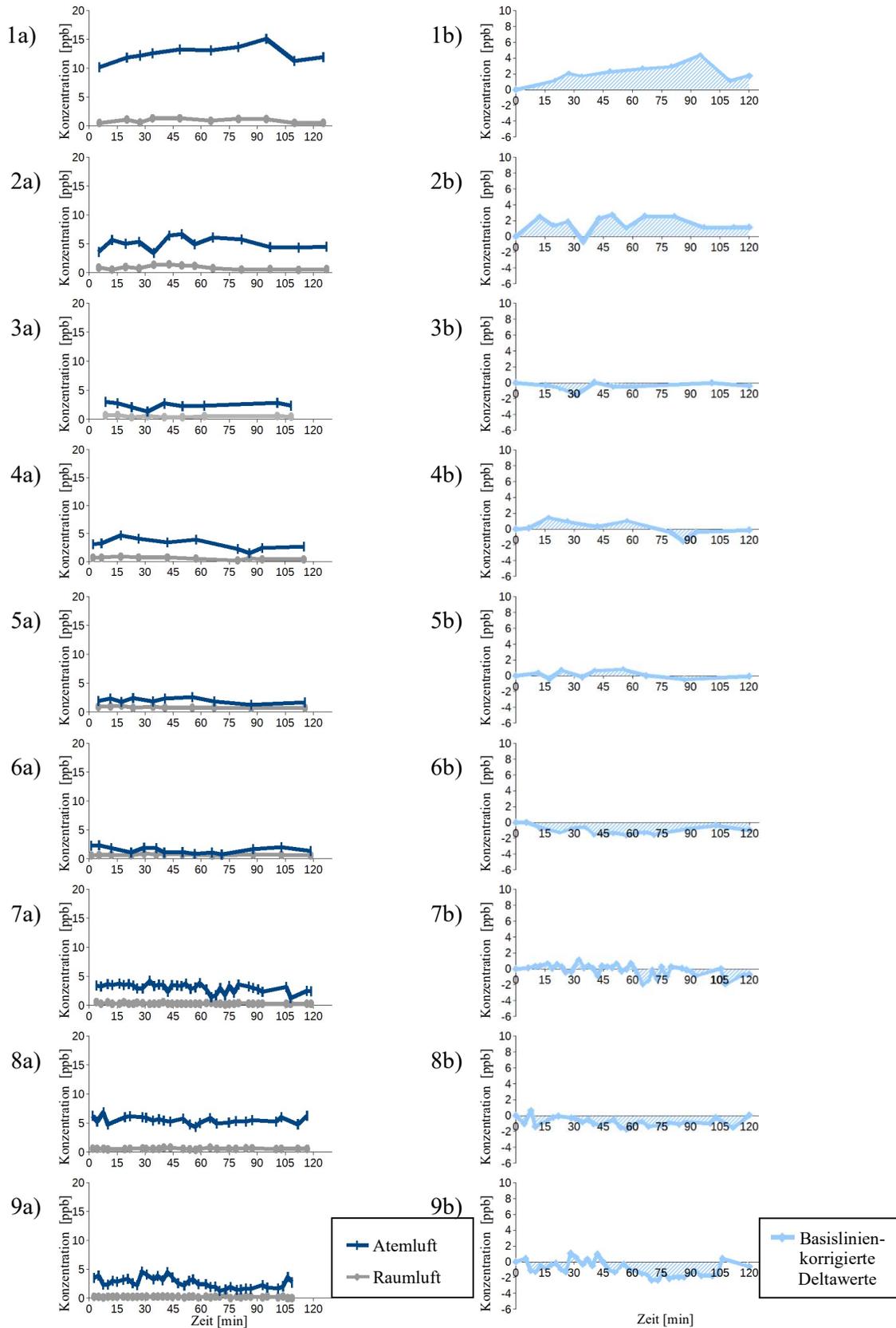
Die Raumlufkonzentration von  $m/z = 69$  zu Beginn der Messungen ergibt bei allen Probanden ähnlich niedrige Konzentrationen, bei Proband 9 fällt sie nochmal deutlich geringer aus als bei den übrigen Probanden. Die Atemlufkonzentration von  $m/z = 69$  zu Beginn der Messungen zeigt sich bei den Probanden 1 und 8 auf etwas höherem Niveau als bei den anderen Studienteilnehmern. Bei den Probanden 2, 5 und 6 ergeben sich durchschnittliche Raumlufkonzentrationsanteile von 28%, 35% bzw. 30 %. Bei den übrigen Studienteilnehmern betragen die durchschnittlichen Raumlufanteile 7 % bis 23 %. Nur bei den Probanden 3, 8 und 9 ergeben sich über den gesamten Messzeitraum Raumlufanteile von konstant unter 25 % (vgl. Tab. 10).

Bei den Probanden 1 und 2 weist die Atemlufkonzentration eine Dynamik auf, die sich ähnlich auch in den Raumlufkonzentrationen wiederfindet. Bei Proband 1 zeigt sich die Raumlufkonzentration zunächst konstant, dann ergeben sich zur 63. und 77. Minute höhere Raumlufwerte. Ab dann kommt es bis zur 108. Minute wieder zu einem Fallen auf Ausgangsniveau bis zum Messende. Bei der Atemlufkonzentration zeigt sich zur 63. Minute ein Anstieg auf ein höheres Niveau, das bis Messende bestehen bleibt. Daraus ergibt sich bei den Basislinien-korrigierten Deltawerten bei Proband 1 zunächst bis zur 63. Minute ein Verlauf ungefähr auf Ausgangsniveau und danach zeigen sich durch das Abfallen der Raumlufkonzentration bei weiterhin konstanten Atemlufkonzentrationen bis zum Messende ansteigende Basislinien-korrigierte Deltawerte. Bei Proband 2 ergibt sich ein tendenzieller Anstieg der Raumlufkonzentration bis zur 64. Minute, ab der 79. Minute zeigen sich bis zum Ende der Messzeit wieder niedrigere Raumlufwerte. Bei der Atemlufkonzentration ergibt sich eine ähnliche Dynamik, allerdings tendenziell etwas zeitversetzt. Die Basislinien-korrigierten Deltawerte bei Proband 2 liegen vor allem etwas unterhalb des Ausgangsniveaus. Bei den übrigen Probanden zeigen sich die Raumlufkonzentrationen über den Messzeitraum konstant. Die Atemlufkonzentrationen von Proband 4 befinden sich zunächst konstant auf Ausgangsniveau, ab der 77. Minute werden dann bis zum Messende höhere Konzentrationen gemessen. Bei Proband 8 zeigen sich die Atemlufkonzentrationen über den gesamten Messzeitraum hinweg ansteigend. Bei den übrigen Probanden 3, 5, 6, 7 und 9 sind die Atemlufkonzentrationen durchgehend konstant.

Ein Vergleich aller AUC-Verläufe von  $m/z=69$  (Abb. 14) auf Basis der Basislinien-korrigierten Deltawerte der 9 Probanden zeigt bei Proband 8 eine sich deutlich von den anderen Probanden unterscheidende Dynamik mit kontinuierlich ansteigenden Basislinien-korrigierten Deltawerten und deutlich positiver AUC-Fläche. Auch die Verläufe bei den Probanden 1 und 4 unterscheiden sich von denen der übrigen Probanden. Zunächst zeigen sich bei diesen beiden Probanden Basislinien-korrigierten Deltawerte im Bereich des jeweiligen Ausgangsniveaus, dann ergeben sich ab etwa der 60. Minute Anstiege der Basislinien-korrigierten Deltawerte mit zunehmend positivem AUC-Flächenwert, bei Proband 1 schwächer ausgeprägt als bei Proband 4 und bei Proband 1 außerdem nach einer Phase mit deutlichem Abfallen der Raumlufkonzentration bei weiterhin konstanter Atemluftkonzentration. Bei den anderen Studienteilnehmern ergeben sich Basislinien-korrigierte Deltawerte in etwa im Bereich des Ausgangsniveaus. Dies spiegelt sich auch in den AUC-Berechnungen zu den 4 Vergleichszeitpunkten wider (vgl. Tab. 18 im Appendix).

Insgesamt lässt sich für die Messungen von  $m/z = 69$  kein grundsätzlicher Unterschied zwischen der Gruppe mit intranasaler Insulingabe (Proband 1, 4, 6, 7, 8, 9) und der Placebogruppe (Proband 2, 3, 5) erkennen. Innerhalb der Insulingruppe fällt bei den Probanden 1 und 4 im Verlauf von  $m/z = 69$  eine sich von den übrigen Probanden unterscheidende Dynamik mit Anstiegen der Basislinien-korrigierten Deltawerte ab etwa der 60. Minute auf, bei Proband 1 aber deutlich schwächer ausgeprägt als bei Proband 4 und nach deutlichem Abfallen der Raumlufkonzentration bei weiterhin konstanter Atemluftkonzentration. Bei Proband 8 liegt die Atemluftkonzentration schon zu Messbeginn deutlich über dem durchschnittlichen Niveau der anderen Probanden und über den gesamten Messzeitraum hinweg zeigt sie sich bei konstanter Raumlufkonzentration weiter ansteigend.

5.2.2.8  $m/z = 77$



**Abb. 15:** Konzentrationsmessungen von  $m/z = 77$  der 9 Probanden (1-9); dabei finden sich in der ersten Spalte a) die absolut gemessenen Massenkonzentrationen in Atemluft (dunkelblau) und Raumluft (grau) der Probanden und in der zweiten Spalte b) jeweils die entsprechenden Basislinien-korrigierten Deltawerte (hellblau) eines Probanden bis zum Zeitpunkt der 120. Minute. Symbole stellen jeweils Messzeitpunkte dar, die zur Verdeutlichung des Verlaufes mit Geraden verbunden wurden. Die „Area under the curve“ ist in den Graphiken b) jeweils schraffiert worden.

**Tab. 11:** m/z = 77: Initiales Delta zwischen Raumluftkonzentration und Atemluftkonzentration sowie initialer, minimaler, maximaler und durchschnittlicher Raumluftanteil bei den Messungen

<i>Proband</i>	$\Delta$ [ppb]	<i>Raumluftanteil [%]</i>			
		initial	min.	max.	$\bar{\Delta}$
1	10	5	4	10	7
2	3	24	9	40	18
3	2	23	14	40	22
4	2	22	9	39	19
5	1	46	30	63	43
6	2	25	25	81	50
7	3	17	6	29	11
8	6	9	8	15	11
9	3	6	0	34	9

Die Raumluftkonzentrationen von m/z = 77 zeigen sich zu Beginn der Messungen bei allen Probanden ähnlich niedrig. Bei der Atemluftkonzentration ergibt sich zu Beginn der Messungen bei Proband 1 ein höheres Niveau als bei den übrigen Studienteilnehmern, bei den Probanden 5 und 6 liegen die Atemluftwerte zu Beginn und im Verlauf vergleichsweise niedriger. Bei den Probanden 5 und 6 zeigt sich ein deutlich höherer durchschnittlicher Anteil der Raumluftkonzentration an den Atemluftkonzentrationen von 43% bzw. 50%. Die Raumluftanteile der anderen Probanden betragen durchschnittlich 7% bis 22%. Nur bei den Probanden 1 und 8 ergeben sich über den gesamten Messzeitraum hinweg Raumluftanteile von unter 25% (vgl. Tab. 11).

Bei allen Probanden zeigen sich die Raumluftkonzentrationen über den Messzeitraum hinweg konstant. Bei Proband 1 steigt die Atemluftkonzentration bis zur 95. Minute, danach werden niedrigere Werte gemessen. Bei den anderen Studienteilnehmern ergeben sich keine größeren Änderungen der Atemluftkonzentration.

Ein Vergleich aller AUC-Verläufe von m/z=77 (Abb. 15) auf Basis der Basislinien-korrigierten Deltawerte der 9 Probanden ergibt bei Proband 1 bis zur 95. Minute einen tendenziellen Anstieg, danach zeigen sich diese etwas niedriger. Bei Proband 2 liegen die Basislinien-korrigierten Deltawerte vor allem oberhalb des Ausgangsniveaus, bei den übrigen Probanden in etwa im Bereich des Ausgangsniveaus. Dies spiegelt sich auch in den AUC-Berechnungen zu den 4 Vergleichszeitpunkten wider (vgl. Tab. 19 im Appendix).

Insgesamt lässt sich für die Messungen von m/z = 77 kein grundsätzlicher Unterschied zwischen der Gruppe mit intranasaler Insulingabe (Proband 1, 4, 6, 7, 8, 9) und der Placebogruppe (Proband 2, 3, 5) erkennen. Innerhalb der Insulingruppe unterscheidet sich die Dynamik von Proband 1 durch eine schon zu Messbeginn über dem durchschnittlichen Niveau der anderen Studienteilnehmer liegende Atemluftkonzentration mit fast kontinuierlichen Anstieg auf ein noch höheres Niveau bis zur 95. Minute deutlich von den übrigen Probanden.

### 5.2.3 Zusammenfassender Vergleich

Hinsichtlich der Raumluftkonzentration ergibt sich vor allem bei den Probanden 1 und 2 bei einigen der Massen eine Akkumulation im Verlauf der Messungen. Für m/z = 33 und m/z = 63 zeigt sich

diese deutlich bei beiden Probanden, für  $m/z = 59$  und  $m/z = 77$  ergibt sich eine verhältnismäßig geringere Akkumulation bei beiden Probanden und für  $m/z = 51$ ,  $m/z = 55$  und  $m/z = 65$  zeigt sich eine deutliche Akkumulation bei Proband 1 und eine eher nur geringe Akkumulation bei Proband 2. Dabei lassen sich die Zeiträume der Akkumulation mit den jeweiligen Zeiträumen bis zum Lüften in der 59. Minute bei Proband 1 bzw. 90. Minute bei Proband 2 korrelieren.

Für keine der untersuchten Massen lässt sich bei den Atemgasmessungen ein grundsätzlicher Unterschied zwischen der Gruppe mit intranasaler Insulingabe (Proband 1, 4, 6, 7, 8, 9) und der Placebogruppe (Proband 2, 3, 5) erkennen.

Mit Ausnahme von Proband 1 weisen aber alle Probanden der Insulingruppe mit unterschiedlicher Ausprägung ein Abfallen der Konzentration von  $m/z = 59$  zwischen der 40. und 60. Minute auf. Bei Proband 4 zeigt sich das Abfallen ausgeprägter als bei den übrigen Probanden und hält bis zur etwa 75. Minute an, bei den Probanden 7 und 8 fällt die Konzentration bis zum Messende und bei den Probanden 6 und 9 können im Verlauf ab der etwa 90. bzw. 100. Minute wieder höhere Werte gemessen werden. Bei Proband 1 zeigt sich die Konzentration von  $m/z = 59$  tendenziell über den gesamten Messzeitraum ansteigend. Auch bei Proband 4 ergibt sich bis zum Konzentrationsabfall zunächst ein starker Anstieg für  $m/z = 59$ .

Innerhalb der Insulingruppe erkennt man für die Messungen von  $m/z = 69$  bei den Probanden 1 und 4 eine sich von den übrigen Probanden unterscheidende Dynamik mit Anstieg der Basislinienkorrigierten Deltawerte ab etwa der 60. Minute, bei Proband 1 schwächer ausgeprägt als bei Proband 4 und nach deutlichem Abfallen der Raumluftkonzentration bei weiterhin konstanter Atemluftkonzentration. Bei Proband 8 zeigt sich für  $m/z = 69$  schon zu Messbeginn eine etwas über dem Durchschnitt der anderen Probanden liegende Atemluftkonzentration und es folgt ein fast kontinuierlicher Anstieg bis zum Messende.

Des Weiteren unterscheidet sich die Dynamik von Proband 4 bei den Atemluftmessungen von  $m/z = 33$  und  $m/z = 51$  durch einen Konzentrationsabfall ab etwa der 30. bis zur 75. Minute von den übrigen Probanden.

Bei Proband 1 liegt die Atemluftkonzentration von  $m/z = 77$  schon zu Messbeginn deutlich über dem Durchschnitt der anderen Probanden und die Dynamik unterscheidet sich durch einen weiteren Konzentrationsanstieg bis zur 95. Minute von den übrigen Probanden. Danach werden bei Proband 1 wieder niedrigere Atemluftwerte gemessen.

Bei den verbleiben 3 der 8 untersuchten Massen, nämlich  $m/z = 55$ ,  $m/z = 63$  und  $m/z = 65$ , ergibt sich bei keinem der Probanden eine nennenswerte Dynamik.

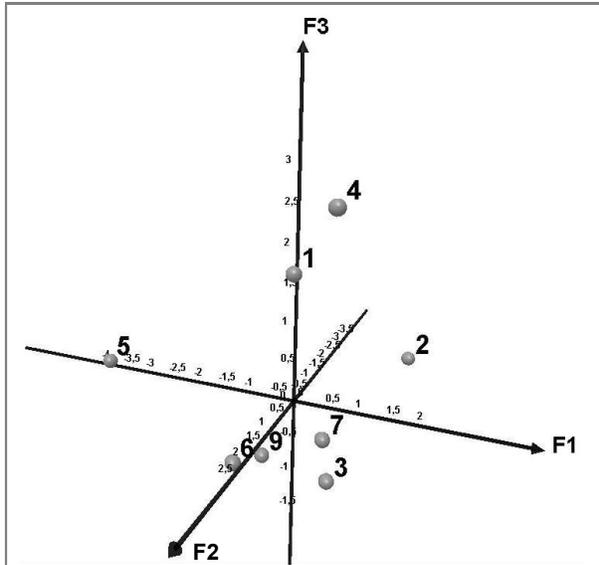
#### 5.2.4 PCA

Der multidimensionale AUC-Datensatz der 9 Probanden wurde hinsichtlich aller 8 Variablen ( $m/z = 33$ ,  $m/z = 51$ ,  $m/z = 55$ ,  $m/z = 59$ ,  $m/z = 63$ ,  $m/z = 65$ ,  $m/z = 69$  und  $m/z = 77$ ) der Zeitintervalle bis zur 30., 60., 90. und 120. Minute einer PCA unterzogen um die Daten graphisch zu veranschaulichen. Für den Datensatz dieser Studie existieren für alle untersuchten Zeitabschnitte

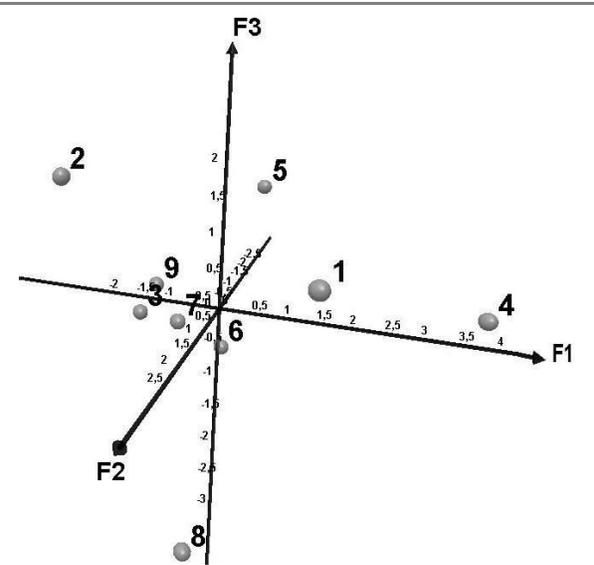
mindestens drei bis vier Hauptkomponenten mit Eigenwerten größer als eins. Diese repräsentieren zusammen jeweils 81,8 bis 87,9 % der Varianz der Daten. Um über 95 % der Datenvarianz zu erklären wären jeweils vier bis sechs Hauptkomponenten notwendig. Eine Reduktion der AUC-Daten auf nur wenige Hauptkomponenten, die einen Großteil der Datenvarianz erklären, ist also für alle untersuchten Zeitintervalle nicht gut möglich.

Soweit es die zu Grunde liegenden AUC-Daten ermöglichen, ergibt die Positionierung der Probanden entlang der Hauptkomponentenachsen mit Eigenwerten größer als eins zu keinem der untersuchten Zeitabschnitte eine Gruppentrennung in Insulin- und Placebogruppe. Man erkennt lediglich, dass die Probanden 3, 6, 7 und 9 durchgehend wenig herausragende Merkmale besitzen (Lokalisation nahe 0 im Koordinatensystem), der Rest der Probanden weist heterogen verteilte Merkmale auf. Untenstehend ist in Abb. 16 eine dreidimensionale Darstellung der Probanden entlang der jeweils ersten drei Hauptkomponentenachsen zu den 4 untersuchten Zeitabschnitten zu sehen und im Appendix findet sich in den Tabellen 20 – 23 eine Übersicht über die Eigenwerte und Faktorladungen der PCA-Untersuchungen.

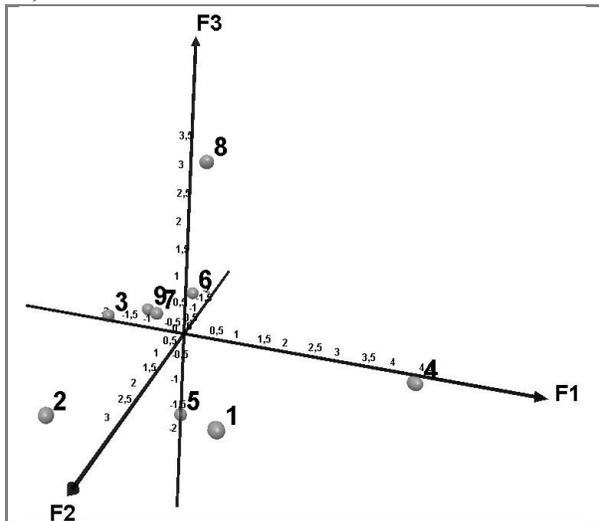
a) PCA 30 Minuten



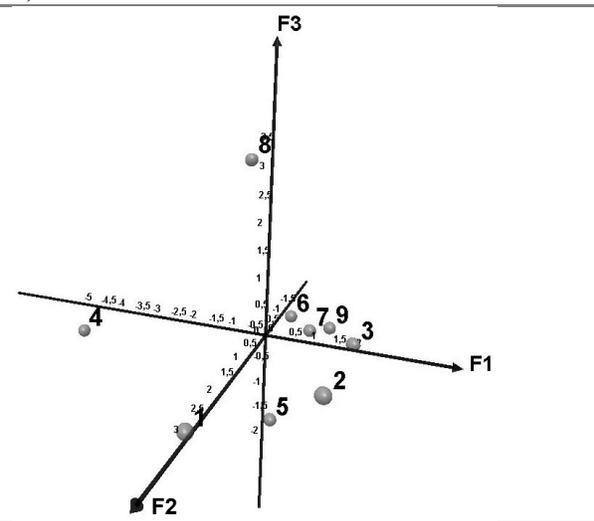
b) PCA 60 Minuten



c) PCA 90 Minuten



d) PCA 120 Minuten



**Abb. 16:** Positionierung der Probanden entlang der jeweils ersten drei Hauptkomponenten zu den untersuchten Zeitintervallen 30, 60, 90 und 120 Minuten (a-d)

## 6. Interpretation der Daten und Diskussion

### 6.1 Grundüberlegungen zur Zuordnung von Massen zu Stoffwechselprodukten und zur Interpretation von VOC-Dynamiken der INIT II-Atemgasstudie

Durch den Einsatz eines PTR-MS-Gerätes mit Quadrupol-Technik kann eine Zuordnung der gemessenen Massen zu Stoffwechselprodukten im Rahmen der vorliegenden Studie nur probatorische anhand anderer in der Literatur beschriebener Zuordnungen erfolgen. Ein PTR-MS-Gerät mit Time-of-flight (TOF)-Massenanalysator oder eine zusätzliche gaschromatographische Analyse, durch die verschiedene Stoffwechselprodukte mit gleicher Massenzahl direkt unterschieden werden können, kam bei den aktuellen Atemgasmessungen nicht zum Einsatz. Aufgrund der komplexen biochemischen Vorgänge, aus denen abgeatmete VOCs hervorgehen, lässt der derzeitige Stand der Forschung keine komplette Aufklärung der Dynamik von abgeatmeten VOC-Konzentrationen zu. Nach Zuordnung der untersuchten Massen zu Stoffwechselprodukten kann man aber versuchen anhand einiger bekannter Eigenschaften von VOCs plausible Hypothesen für das Auftreten von VOC-Dynamiken aufzustellen. Die Ausgangsbedingungen vor und während der Messungen müssen bei der Interpretation von Dynamiken mitbedacht und miteinbezogen werden. Bei den Probanden dieser Studie fand vor Messbeginn keine Kontrolle über Diät, Medikation oder Ausmaß der körperlichen Aktivität statt. Auch das individuelle Stressempfinden vor und während der Messungen blieb unbekannt. Da es den Probanden in der zweiten Stunde des Messzeitraumes im Gegensatz zur ersten Stunde gestattet war, ihren Platz im Messraum zwischen den Messungen für längere Zeit zu verlassen, kam es teilweise zu einer veränderten körperlichen Aktivität der Probanden in der zweiten Stunde. Diese Faktoren können grundsätzlich zu Veränderungen im Stoffwechsel bzw. zur Veränderung von abgeatmeten VOC-Konzentrationen führen<sup>232,236-242</sup>.

Die Zusammensetzung und der Zeitpunkt der letzten Nahrungsaufnahme am Morgen vor den Messungen wurden neben Angaben über den Gesundheitsstatus und regelmäßig bzw. am Messtag eingenommene Medikamente in einem Fragebogen erfasst. Alle Probanden gaben an, vor den Atemgasmessungen gefrühstückt zu haben. Die Menge und Zusammensetzung des Frühstücks unterschied sich zwischen den Probanden aber stark, ebenso die Zeitspanne vom Frühstück bis zum Beginn der Messungen. Alle Probanden der INIT II-Atemgasstudie hatten am Messtag vor den Messungen keine Medikamente genommen und Erkrankungen im Bereich der Lunge bzw. Atemwege oder des Mund-Rachenraumes wurden verneint.

Da das Studienprotokoll der INIT-II-Studie unabhängig vom jeweiligen Körpergewicht für alle Studienteilnehmer der Verumgruppe die gleiche Menge an intranasalem Insulin vorsah, kam es durch das unterschiedliche Körpergewicht der Probanden zu einer interindividuell unterschiedlichen gewichtsbezogenen Insulindosis.

Während der Messungen wurde bei Proband 4 aufgrund der Entwicklung einer Hypoglykämie nach der 30. Minute durch die Gabe von kohlenhydratreicher Flüssigkeit und Nahrung interveniert. Alle übrigen Studienteilnehmer blieben über den gesamten Messzeitraum hinweg nüchtern. Diese

zusätzliche Nahrungszufuhr bei Proband 4 sollte bei der Interpretation von VOC-Dynamiken ebenfalls mitbedacht werden.

## 6.2 Zuordnung der 8 analysierten Massen zu Stoffwechselprodukten

8 Massen der 38 gemessenen Massen wiesen über den gesamten Untersuchungszeitraum bei allen Probanden Konzentrationen in der Atemluft auf, die konstant über den jeweiligen Konzentrationen in der Raumluft lagen. Für 3 der 8 Massen, nämlich  $m/z = 55$ ,  $m/z = 63$  und  $m/z = 65$ , ergaben sich bei allen Probanden über den zweistündigen Messzeitraum relativ gleichbleibende Konzentrationen. Bei den anderen 5 der 8 Massen, nämlich  $m/z = 33$ ,  $m/z = 51$ ,  $m/z = 59$ ,  $m/z = 69$  und  $m/z = 77$ , zeigten sich bei einigen Probanden der Insulingruppe teilweise ausgeprägte Dynamiken. Für eine Interpretation dieser Dynamiken, insbesondere ob es sich dabei um Auswirkungen von intranasalem Insulin handeln könnte oder nicht, müssen die gemessenen Massen zunächst einem konkreten Stoffwechselprodukt zugeordnet werden.

Die gleichartigen Verläufe von  $m/z = 33$  und  $m/z = 51$  bei allen Probanden sprechen dafür, dass es sich, wie auch in der Literatur beschrieben<sup>243</sup>, sowohl bei  $m/z = 33$ , als auch bei  $m/z = 51$  um Methanol handelt -  $m/z = 51$  entspricht dabei Methanol, das mit einem Wassermolekül verbunden ist.  $m/z = 59$  kann dem Stoffwechselprodukt Aceton zugeordnet werden<sup>275,276,243</sup>. Bei  $m/z = 69$  handelt es sich wahrscheinlich um Isopren<sup>243,276</sup>. Bei  $m/z = 77$  könnte es sich um Propanethiol<sup>275</sup> oder um Aceton, das mit einem Wassermolekül verbunden ist<sup>243</sup> handeln - die Konzentrationsverläufe von  $m/z = 77$  und  $m/z = 59$  bei den 9 Probanden sind ähnlich, aber nicht identisch.

## 6.3 Blutglukoseveränderungen während der Atemgasmessungen

Die VOC-Messungen zu vorliegender Studie fanden in einem zweistündigen Messzeitraum nach Gabe des Studienpräparates statt. Im Falle per PTR-MS erfassbarer, systemischer Wirkungen des Studienpräparates müsste es sich im Rahmen dieser Studie um verschiedene Kurzeiteffekte von intranasalem Insulin auf den postprandialen Stoffwechsel handeln, die vor allem Veränderungen im Blutglukosehaushalt und andere anabole Stoffwechselvorgänge betreffen.

Für die Auswirkungen von intranasalem Insulin auf den Blutzuckerspiegel ist beschrieben, dass er nach ca. 10 Minuten zu fallen beginnt, nach etwa 30 - 40 Minuten tiefste Werte erreicht werden und nach etwa 80 - 100 Minuten wieder ein Blutglukoseanstieg auf Ausgangsniveau beobachtet werden kann<sup>186-190</sup>. Alle Probanden der Insulingruppe (Proband 1, 4, 6, 7, 8, 9) wiesen im Gegensatz zu den Probanden der Placebogruppe (Proband 2, 3, 5) mit unterschiedlicher Ausprägung ein Abfallen des Blutzuckerspiegels nach Spraygabe mit tiefsten Werten zwischen der 30. und 60. Minute und einen folgenden Wiederanstieges im Verlauf auf, wobei nicht bei allen das Ausgangsniveau wieder erreicht wurde. Demnach erweist sich die Blutglukosedynamik aller Probanden nach intranasaler Insulingabe in dieser Studie ähnlich wie vorbeschrieben. Proband 4, der bezogen auf sein Körpergewicht die höchste intranasale Insulindosis erhalten hatte, entwickelte eine Hypoglykämie und es ist zu bedenken, dass Blutzuckeränderungen nach der 30. Minute zusätzlich durch die

erneute Gabe von Nahrung beeinflusst waren. Bei den Probanden 1 und 7 kam es nur zu vergleichsweise geringem Abfallen der Blutzuckerkonzentration. Diese beiden Probanden erhielten bezogen auf ihr Körpergewicht aber keine niedrigere Insulinmenge als die übrigen Probanden, im Gegenteil, es gab viele andere Probanden mit ausgeprägteren Blutzuckerveränderungen, die eine geringere gewichtsbezogenen Insulindosis bekommen hatten als die Probanden 1 und 7. Es ist vorbeschrieben, dass das Antwortverhalten auf intranasales Insulin interindividuell unterschiedlich ist<sup>186,190</sup> und die Auswirkungen auf den Blutzuckerspiegel scheinen neben der Dosis auch von weiteren Faktoren abhängig zu sein.

Einige per PTR-MS messbare VOCs zeigen sich sensitiv auf Veränderungen des Blutzuckerspiegels<sup>244,254,282</sup> und es wird eine Korrelation zur Höhe der Blutglukosekonzentration beschrieben<sup>244,254</sup>. Da Blutzuckermessungen und Atemgasmessungen in dieser Studie nicht zeitgleich stattfanden, eignet sich das Design dieser Studie nicht zur Berechnung von Korrelationen zwischen Blutzuckerspiegel und VOC-Konzentrationen. Es können lediglich Dynamiken verglichen werden. Da deutlich weniger Blutzuckermessungen stattfanden als Atemgasmessungen (Proband 1-3: 4 Blutzuckermessungen, Proband 4: nur 3 Blutzuckermessungen, Proband 5 - 9: 6 Blutzuckermessungen) ist auch dies nur mit Einschränkungen möglich. Für die Stoffwechselprodukte, die den Massen in dieser Studie zugeordnet wurden, ist für Aceton<sup>248,249,251,255</sup> und Methanol<sup>254</sup> ein Zusammenhang mit dem Blutzuckerspiegel beschrieben. Korrelationsuntersuchungen<sup>244,254,283</sup> machen deutlich, dass Korrelationen zwischen Blutzuckerspiegel und VOC-Konzentration aber nicht absolut bestehen, sondern nur unter gewissen Ausgangsbedingungen Geltung haben<sup>244,254,283</sup>.

Für keine der untersuchten Massen gab es in dieser Studie eine Dynamik, die sich bei allen Probanden der Insulingruppe zeigte und sich mit der Dynamik des Blutzuckerspiegels korrelieren ließ.

Mit Ausnahme von Proband 1 ergab sich aber bei allen übrigen Probanden der Insulingruppe (Proband 4, 6, 7, 8, 9) in etwa zeitgleich zum Abfallen des Blutzuckerspiegels in den ersten 30 – 60 Minuten des Messzeitraumes in unterschiedlicher Ausprägung auch ein Konzentrationsabfall von  $m/z = 59$ . In die Zeitpanne des Blutzuckerabfalls fiel bei Proband 4 auch der Konzentrationsabfall von  $m/z = 33$  und  $m/z = 51$ . Eine genauere Diskussion der Dynamiken dieser und der übrigen Metaboliten folgt unter Einbeziehung bekannter Eigenschaften und Ausgangsbedingungen unter Punkt 6.4.

## 6.4 Interpretation und Diskussion der aufgetretenen VOC-Dynamiken

### 6.4.1 $m/z = 33$ und $m/z = 51$ mit Zuordnung zu Methanol

Für Methanol ist grundsätzlich ein Zusammenhang mit dem Blutzuckerspiegel beschrieben<sup>254</sup>. Auch in der GDM-Pilotstudie wurde Methanol als eines der Stoffwechselprodukte beschrieben, dessen Konzentration sich nach Nüchternheit durch Glukoseingestion ändert - allerdings nur schwach<sup>275</sup>. Eine Diskussion des Mechanismus, der eine solche Änderung in der GDM-Studie bewirkt haben könnte, erfolgte nicht und es gab auch keine Kontrollgruppe. Das heißt, es bleibt eigentlich unklar,

ob die in der GDM-Studie beschriebenen Methanolveränderungen auf die Glukosegabe bzw. auf die daraus resultierenden Blutzuckeränderungen zurückgeführt werden können oder nicht. Methanol ist ein üblicher Bestandteil der Atemluft<sup>284,285</sup>. Es ist in Obst<sup>286</sup> und Gemüse<sup>287</sup> enthalten. Ein Konsum dieser Nahrungsmittel führt zu einer Erhöhung der Methanolkonzentration in der Atemluft<sup>288-290</sup> - teilweise direkt, teilweise zusätzlich durch den enzymatischen Abbau von Pektin im Gastrointestinaltrakt durch Darmbakterien<sup>288-291</sup>. Auch weitere Substrate und Nahrungsbestandteile können durch Darmbakterien zu Methanol abgebaut werden<sup>255,292,293</sup>. Der Genuss von alkoholischen Getränken<sup>285</sup> und des Süßstoffes Aspartam<sup>294,295</sup> führt ebenfalls zu einem Anstieg der Methanolkonzentration. Neben exogenen Methanolquellen, die für den größten Teil des Methanolvorkommens in der Atemluft verantwortlich sind, wird Methanol wohl auch endogen produziert - der genaue Ursprung und die Funktion dessen sind noch weitgehend unerforscht<sup>255</sup>.

Bei den meisten Probanden zeigte sich die Methanolkonzentration in der Atemluft über den Messzeitraum relativ konstant. Bei Proband 5 konnte über die ersten 30 Minuten und bei Proband 6 über den gesamten Messzeitraum ein dezentes Abfallen der Methanolkonzentration verzeichnet werden. Bei Proband 4 ergaben sich im Verlauf der Messungen Konzentrationsveränderungen, die sich deutlich von denen aller übrigen Studienteilnehmer unterschieden. Zunächst kam es bis zur 24. Minute zu einem Verlauf auf kontinuierlichem, aber im Vergleich zum Durchschnitt der übrigen Probanden höherem Konzentrationsniveau. Dann ergab sich zur 39. und 55. Minute zunächst ein Abfallen auf ein etwas niedrigeres Messniveau. Zur 77. Minute konnte ein weiteres Abfallen auf eine niedrige Durchschnittskonzentration verzeichnet werden. Über den restlichen Messzeitraum hinweg wurden dann ähnlich niedrige Methanolkonzentrationen gemessen. Bei intranasaler Insulingabe kommt es nach etwa 10-20 Minuten zur höchsten Insulinkonzentration im Plasma<sup>186</sup>. Der Blutzuckerspiegel von Proband 4 sank bis zur 30. Minute auf einen hypoglykämischen Wert. Zeitlich wäre es daher durchaus plausibel, dass das Abfallen der Methanolkonzentration in der Atemluft, das ab der 39. Minute verzeichnet wurde, Folge der intranasalen Applikation von Insulin oder Folge des aus der Insulingabe resultierenden Blutzuckerabfalls war.

Da für den Hauptanteil der Methanolkonzentration in der Atemluft das Angebot an Nahrungsbestandteilen im Darm verantwortlich ist<sup>255</sup> und davon ausgegangen werden kann, dass eine Intervention durch intranasales Insulin darauf keinen Effekt hat, ist die aufgetretene Methanoldynamik bei Proband 4 wohl nicht auf die intranasale Gabe von Insulin oder auf die daraus resultierende Blutzuckeränderung zurückzuführen. Sollte Insulin nicht doch einen deutlichen Effekt auf die endogene Methanolproduktion haben<sup>255</sup>, ist die aufgetretene Methanoldynamik wahrscheinlich am ehesten Folge einer postprandialen Veränderung des Substratangebotes im Darm. Für das vergleichsweise dezente Abfallen der Methanolkonzentrationen bei den Probanden 5 und 6 könnte ebenfalls eine Veränderung des Substratangebotes im Darm die Ursache sein.

#### **6.4.2 m/z = 59 mit Zuordnung zu Aceton**

Aceton entsteht aus Acetoacetat durch Reduktion und spontane Decarboxylierung im Rahmen der Ketogenese. Dieser geht in der Regel ein gesteigertes Fettsäureangebot in der Leber voraus. Insulin

wirkt der Ketogenese entgegen, es hält Fette als anaboles Hormon in ihren Depots zurück und supprimiert die Ketonkörperproduktion<sup>250</sup>. Außerdem fördert es die Verstoffwechslung vorhandener Ketonkörper<sup>250</sup>. Abgeatmete Acetonkonzentrationen zeigen sich daher postprandial in der Regel niedriger als im Fastenzustand und für Aceton ist eine inverse Korrelation zum Blutzuckerspiegel beschrieben<sup>248,249,251</sup>. Diese Korrelation besteht postprandial jedoch nicht so stark wie nach einer nächtlichen Nüchternphase<sup>283</sup>. Eine Veränderung des Acetongehaltes in der Atemluft durch die intranasale Applikation von Insulin ist also grundsätzlich plausibel, es müsste zu einem Abfallen der Acetonkonzentration in der Atemluft kommen. Gleichzeitig bedingt das intranasale Insulin eine Senkung des Blutzuckerspiegels durch Aufnahme von Glukose aus dem Blut in die Zellen. Das heißt, anders als bei niedrigem Blutzuckerspiegel im Hungerzustand ist nach intranasaler Applikation von Insulin keine inverse Korrelation zwischen Acetongehalt in der Atemluft und Blutzuckerspiegel zu erwarten, sondern es sollte parallel zu einem Abfallen des Blutzuckerspiegels und einer Senkung des Acetongehaltes in der Atemluft kommen. Bei allen Probanden der Insulingruppe, außer bei Proband 1, konnte in unterschiedlicher Ausprägung eine solche Dynamik beobachtet werden, bei der ein Abfallen der Acetonkonzentration in der Atemluft und ein Sinken des Blutzuckerspiegels parallel auftraten. Bei Proband 4, dem Probanden mit der höchsten gewichtsbezogenen Insulindosis, zeigte sich das Abfallen der Acetonkonzentration nach einem vorherigen Anstieg deutlich, bei den übrigen Probanden 6, 7, 8, 9 eher dezent. Bei den Probanden 6 und 9 zeigten sich im Verlauf des zweistündigen Messzeitraumes gegen Ende dann wieder höhere Acetonkonzentrationen. Proband 1 ist der einzige der Insulingruppe, bei dem die Acetonkonzentration trotz postprandialer normoglykämischer Ausgangsstoffwechsellage über den gesamten Messzeitraum tendenziell weiter anstieg. Bei diesem konnte auch nur eine verhältnismäßig geringe Senkung des Blutzuckerspiegels nach intranasaler Insulingabe verzeichnet werden. Eventuell gab es bei Proband 1 schon vor Messbeginn Einflüsse auf den Stoffwechsel, die eine größere Auswirkung als das intranasale Insulin hatten bzw. die den Insulinwirkungen entgegengerichtet waren. Auch bei Proband 4 kam es initial zu einem Anstieg der Acetonkonzentration in der Atemluft. Eine mögliche Ursache für die Steigerung der Ketogenese könnte die Ausschüttung von Glucagon durch Stress sein<sup>296</sup>. Daneben fördert auch eine proteinreiche oder sehr fettreiche Nahrung die Ketonkörperproduktion. Es wurde angegeben, dass die Zusammensetzung der Nahrung, die vor den Messungen von Proband 1 zu sich genommen wurde, fettreich war. Das individuelle Stressempfinden der Probanden blieb unbekannt.

#### **6.4.3 m/z = 69 mit Zuordnung zu Isopren**

Für Isopren ist weder die exakte biochemische Herkunft, noch die genaue physiologische Rolle ausreichend bekannt, so dass sich eine Interpretation von Isoprendynamiken in der Atemluft schwierig gestaltet<sup>297,298</sup>. Isopren gilt als Marker der Cholesterin-Biosynthese<sup>299-301</sup>. Studien legen nahe, dass auch Bakterien der Darmflora Isopren produzieren können<sup>298</sup>. Neben pathologischen Ursachen, wie Leberzirrhose im fortgeschrittenen Fibrosestadium<sup>302</sup>, tritt eine erhöhte Abatmung von Isopren physiologisch vor allem bei erhöhter kardiovaskulärer<sup>239-241</sup> und respiratorischer<sup>241,242</sup>

Aktivität auf. Man nimmt an, dass durch eine gesteigerte Durchblutung potentieller Produktions- und Speicherorte vor allem zu Beginn von körperlicher Aktivität erhöhte Konzentrationen an Isopren freigesetzt und abgeatmet werden<sup>239</sup>. Auch das Atemminutenvolumen<sup>241</sup>, die Expirationstiefe und Veränderungen im Rahmen von Hyperventilation<sup>242</sup> haben einen Einfluss auf die Höhe der abgeatmeten Isoprenkonzentration.

Bei Proband 8 der Insulingruppe war die Konzentration von Isopren in der Atemluft schon zu Beginn der Messungen höher als bei den übrigen Probanden und es kam bis zum Ende der Messungen zu einem weiteren kontinuierlichen Anstieg. Ein Zusammenhang mit der Applikation von intranasalem Insulin ist daher zeitlich pharmakokinetisch nicht plausibel.

Die Probanden 1 und 4 der Insulingruppe unterschieden sich durch einen Anstieg der Isoprenkonzentration ab etwa der 60. Minute von den anderen Probanden. Da eine Induktion der Cholesterin-Biosynthese durch Insulin bekannt ist<sup>303</sup>, wäre es grundsätzlich möglich, dass es sich bei den Isoprendynamiken der Probanden 1 und 4 um Auswirkungen von intranasalem Insulin gehandelt hat - bis jetzt gibt es keine Studien, die den genauen Einfluss von intranasalem Insulin auf die Isoprenkonzentration in der Atemluft untersucht haben. Auch eine veränderte körperliche Aktivität<sup>239-242</sup> in der zweiten Stunde des Messzeitraumes, in denen es den Probanden zwischen den Messungen gestattet war ihren Platz im Messraum zu verlassen, könnte der Grund für die angestiegenen Isoprenkonzentrationen in der Atemluft gewesen sein. Bei Proband 4 ist zu bedenken, dass die Veränderung der Isoprenkonzentration ab der 60. Minute grundsätzlich auch Folge der erneuten Gabe von Nahrung im Rahmen der Hypoglykämie nach der 30. Minute sein könnte. Bei Proband 1 gestaltet sich der Anstieg deutlich schwächer als bei Proband 4 und zeigt sich nach einer Phase mit abfallenden Raumlufkonzentrationen bei weiterhin konstanten Atemluftkonzentrationen. Daher wäre auch ein erst zeitverzögert auftretender Atemluftkonzentrationsabfall als Ursache für den Anstieg der Isoprenkonzentration bei Proband 1 denkbar, da er sich gemäß der in dieser Studie festgelegten Verrechnung der Raumlufkonzentration aus dem Delta zwischen Raum- und Atemluftkonzentration ergibt. Bei fehlendem etabliertem Algorithmus zur exakten Verrechnung der Raumlufkonzentration darf die Zuverlässigkeit dieses Anstieges nicht überbewertet werden. Bei den übrigen Probanden zeigten sich für Isopren über den gesamten Messzeitraum relativ gleichbleibende Konzentrationen, wobei auch bei Proband 9 der Insulingruppe und bei den Probanden 2 und 5 der Placebogruppe in der zweiten Stunde des Messzeitraumes tendenziell etwas höhere Isoprenkonzentrationen in der Atemluft gemessen werden konnten als in der ersten Stunde.

Zusammenfassend ist ein Zusammenhang zwischen dem Anstieg der Isoprenkonzentrationen ab der 60. Minute und der intranasalen Insulingabe durch eine Induktion der Cholesterin-Biosynthese insbesondere bei Proband 4, der die höchste intranasale Insulindosis erhalten hatte, zwar möglich, um eine genaue Aussage treffen zu können sind jedoch weitere Studien notwendig. Da Isopren auch bei vermehrter respiratorischer und/oder kardiovaskulärer Aktivität in höheren Konzentrationen abgeatmet wird, könnte auch eine gesteigerte körperliche Aktivität in der zweiten Stunde des Messzeitraumes die Ursache für den Anstieg der Isoprenkonzentrationen sein.

#### **6.4.4 $m/z = 77$**

Für  $m/z = 77$ , bei dem die konkrete Zuordnung zu einem Stoffwechselprodukt nicht gelingt, ergibt sich bei Proband 1 der Insulingruppe eine Dynamik, die sich deutlich von den anderen Probanden unterscheidet. Schon zu Beginn zeigt sich bei Proband 1 eine deutlich höhere Konzentration als bei den übrigen Probanden und es kommt bis zur etwa 100. Minute zu einem weiteren kontinuierlichen Anstieg, danach werden niedrigere Konzentrationen gemessen. Ein Zusammenhang dieser Dynamik mit der Applikation von intranasalem Insulin ist zeitlich pharmakokinetisch nicht plausibel. Bei den übrigen Probanden zeigt sich die Konzentration von  $m/z = 77$  über den gesamten Messzeitraum relativ gleichbleibend.

#### **6.4.5 $m/z = 55$ , $m/z = 63$ und $m/z = 65$**

Bei den verbleibenden 3 der 8 Massen, nämlich  $m/z = 55$ ,  $m/z = 63$  und  $m/z = 65$ , die im Rahmen dieser Studie keinem konkreten Stoffwechselprodukt zugeordnet werden konnten, zeigte sich bei keinem der Probanden eine ausgeprägte Dynamik.

### **6.5 Diskussion von Methode und Studienaufbau:**

#### **6.5.1 Auftreten hoher Raumlufkonzentrationsanteile**

In dieser Pilotstudie mit jungen Probanden zeigten sich bei den Messungen der 38 Massen häufig hohe Anteile der Raumlufkonzentration an den gemessenen Atemlufkonzentrationen. Auch bei den 8 Massen, bei denen sich für alle Probanden über den gesamten Messzeitraum Atemlufkonzentrationen ergaben, die oberhalb der Raumlufkonzentration lagen, zeigten sich teilweise Raumlufkonzentrationsanteile von über 25 %. Risby und Solga beschreiben, dass Atemlufdaten mit Raumlufanteilen von über 25 % kritisch betrachtet werden sollten<sup>304</sup>. Die Atemlufkonzentrationen und die Raumlufkonzentrationen der 8 untersuchten Massen wurden deswegen zunächst separat beschrieben und analysiert.

Wie lässt sich das Auftreten von hohen Raumlufanteilen während dieser Studie erklären? In der Literatur ist bis jetzt bezüglich des Auftretens von hohen Raumlufkonzentrationsanteilen speziell bei Kindern und Jugendlichen nichts beschrieben.

Möglicherweise könnten hohe Konzentration an VOCs in der Raumluf direkt zu hohen Raumlufkonzentrationsanteilen geführt haben. Der Raum, in dem die Atemgasmessungen stattfanden, hatte nur ein Volumen von etwa 35 m<sup>3</sup>. Vor allem bei den Probanden 1 und 2, bei denen versucht wurde durch nur kurzzeitiges einmaliges Lüften nach etwa 60 bzw. 90 Minuten möglichst konstante Umgebungsbedingungen zu bieten, fiel eine starke Akkumulation von VOCs in der Raumluf auf. Aufgrund der bis zum Lüften aufgetretenen VOC-Akkumulationen wurde sich dazu entschlossen, fortan bei allen folgenden Messungen vor Messbeginn großzügig zu lüften und das Fenster auch während der Messungen je nach Witterung offen bzw. zumindest gekippt zu lassen. Auch die Tür zum Messraum blieb nun durchgehend offen. Durch dieses Vorgehen ließen sich bei allen übrigen Probanden hinsichtlich der Akkumulation von VOCs in der Raumluf gebesserte Bedingungen erreichen. Trotzdem könnte die relativ kleine Größe des Messraumes zur VOC-Akkumulation mit daraus resultierenden hohen Raumlufanteilen gewisser Metaboliten

geführt haben. Außerdem fiel bei den beiden ersten Probanden auf, dass es intraindividuell bei einigen der untersuchten Massen zu starker, bei anderen Massen zu keiner oder nur wenig Akkumulation kam. Auch interindividuell ergaben sich bei den akkumulierenden Massen grundsätzliche Unterschiede zwischen den Probanden 1 und 2. Eine Mitbeeinflussung der VOC-Konzentrationen in der Raumluft durch andere im Messraum anwesende Personen (Versuchsleiter, Angehörige) ist naheliegend und bei künftigen Studien sollten solche möglichen Störfaktoren bedacht und minimiert werden. Ferner kam auch ein Filtersystem wie der N7500-2 Acid Gas Cartridge-Filter, der von Alkhouri et al. bei PTR-MS-Messungen angewendet wird<sup>302</sup>, bei der vorliegenden Studie nicht zum Einsatz und könnte von Nutzen sein um exogene VOCs beim Einatmen von Raumluft zu eliminieren. Über die Vorteile eines solchen Filtersystems für Atemgasanalysen wurden bis jetzt allerdings noch keine Daten veröffentlicht.

Zum anderen könnten die hohen Raumluftkonzentrationsanteile aber auch durch eine verhältnismäßig niedrigere Atemluftkonzentration bedingt bzw. mitbedingt sein. Die Ursache dafür ist eventuell das junge Alter der Probanden. Zu den Besonderheiten von PTR-MS-Analysen bei Kindern und Jugendlichen sowie PTR-MS-Forschung mit jüngeren Probanden allgemein gibt es noch nicht viele Studien. Für einige VOCs ist beschrieben, dass ihre Konzentration in der Atemluft bei Kindern geringer ist als bei Erwachsenen<sup>237,305,306</sup>. Dies könnte zum einen daran liegen, dass entsprechende VOCs bei Kindern grundsätzlich in niedriger Konzentration vorkommen, zum anderen könnten aber auch Unterschiede in der Atemtechnik bei der Atemluftsammlung zwischen Kindern und Erwachsenen dazu beitragen<sup>307</sup>. Für diese Studie wurden optimale Expirationskurven bei der Atemluftsammlung durch ein möglichst tiefes, langes und gleichmäßiges Ausatmen erzielt. Eine entsprechende Atemtechnik war für die jüngeren Probanden schwieriger zu bewerkstelligen.

### 6.5.2 Raumluftkorrekturberechnung in dieser Studie

Bei der Untersuchung von VOCs in der Atemluft stellt sich grundsätzlich die Frage, ob und wie man die entsprechende Konzentration eines VOC in der Raumluft mit der gemessenen VOC-Konzentration in der Atemluft verrechnen soll. Da etablierte Algorithmen zur Raumluftkorrektur fehlen<sup>277</sup>, wurde sich bei der vorliegenden Studie dazu entschieden nach einer separaten Betrachtung der Dynamik von Atemluft- und Raumluftkonzentration der einzelnen Massen und einer deskriptiven Analyse dieser, das Delta aus Raumluft- und Atemluftkonzentration zu bilden und für die weitere Auswertung zu verwenden. Dies entspricht dem von Phillips et al. postulierten „alveolären Gradienten“, dem die Überlegung zu Grunde liegt, dass der Differenzbetrag eines protonierten VOC zwischen eingeatmeter Luft und ausgeatmeter Luft endogenen Ursprungs sein müsste<sup>278</sup>. Neuere Studien weisen jedoch darauf hin, dass der Zusammenhang zwischen der Konzentration an Metaboliten in Raumluft und Atemluft komplexer ist<sup>243,308</sup>. Dennoch ist die Entwicklung eines Algorithmus zur Raumluftkorrektur noch nicht gelungen und wäre dringend notwendig um die Zuverlässigkeit und Vergleichbarkeit von Atemgasdaten garantieren zu können. Eine Analyse der errechneten alveolären Gradienten, die für die weitere Auswertung zudem Basislinien-korrigiert wurden, zeigt hinsichtlich der Abbildung der Dynamik von Raumluft- und Atemluftkonzentrationen für diese Studie ein annehmbares Ergebnis. Lediglich in Phasen mit

schnellerer Änderung der Raumluftkonzentration scheint es teilweise durch eine gleichgerichtete, aber erst zeitverzögert folgende Konzentrationsänderung in der Atemluft zu Ungenauigkeiten zu kommen. Grund hierfür könnte eine sich erst nach und nach ergebende Anpassung der abgeatmeten VOC-Fraktion an den neuen Gradienten sein, der sich durch Änderung der Raumluftkonzentration ergibt und der ein maßgeblicher Faktor für den Anteil der abgeatmeten VOC-Fraktion ist<sup>243</sup>.

Dynamiken mit ausgeprägter und schneller Änderung der Raumluftkonzentration wurden durch Akkumulation und stoßweises Lüften vor allem bei den Probanden 1 und 2 beobachtet. Durch dauerhaftes Lüften des Messraumes ab den Messungen von Proband 3 zeigten sich die Raumluftkonzentrationen bei allen folgenden Probanden grundsätzlich niedriger und konstanter.

### **6.5.3 Basislinienkorrektur, AUC-Werte und -Intervalle zum Vergleich der VOC-Dynamiken**

Um Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten zwischen den Massenverläufen der 9 Probanden nach Spraygabe darzustellen, wurden für jede der 8 Massen aus den Deltawerten nach Basislinienkorrektur für die graphischen Veranschaulichung des Datensatzes per PCA AUC-Werte bis zu 4 Vergleichszeitpunkten errechnet. Da die Dynamik der VOC-Konzentrationen nach Gabe des Studienpräparates untersucht werden sollte, hat sich die Basislinienkorrektur als nützlich erwiesen, grundsätzliche interindividuelle Unterschiede<sup>225,226,240,309</sup> bei den abgeatmeten VOC-Konzentrationen nicht so sehr ins Gewicht fallen zu lassen und Veränderungen nach Spraygabe darzustellen. Dabei wurde das Delta aus dem jeweils ersten erhobenen Atem- und Raumluftwert einer Masse als Basislinienwert von allen folgenden Deltakonzentrationen der entsprechenden Masse abgezogen. Auch bei tendenziell gleichbleibenden Konzentrationen ergeben sich durch eine Messung per PTR-MS aber grundsätzlich eher verrauschte Massenkonzentrationsverläufe. Bei der angewendeten Basislinienkorrektur kann es daher, je nachdem, ob der Basislinienwert zu den höheren oder niedrigeren Werten innerhalb eines verrauschten Verlaufes gehört, auch bei fehlender Änderung der Dynamik zu einem Verlauf der Basislinien-korrigierten Werte eher ober- oder unterhalb des Ausgangsniveaus kommen. Dies kann einen rechnerischen Schwachpunkt für die anschließend folgende Ermittlung von AUC-Werten darstellen. Mitunter können sich so einmal zunehmend positive und einmal zunehmend negative AUC-Werte ergeben, obwohl sich tendenziell in beiden Fällen keine Änderungen zeigen. Zur genaueren Ermittlung eines Basislinienwertes wäre es daher bei künftigen Atemgasstudien sinnvoll, den Median der entsprechenden Raum- und Atemluftkonzentration nicht nur wie in dieser Studie aus zwei, sondern mehreren Expirationskurven zu bestimmen.

Das Fehlen eines etablierten Algorithmus zur Raumluftkorrektur stellt ebenfalls einen Schwachpunkt für die AUC-Berechnungen dar. Besonders in Phasen, in denen es wohl zu einer erst zeitverzögert aufgetretenen Dynamik von Raumluft- und Atemluftkonzentration kam, ergaben sich verhältnismäßig starke Ausschläge der Deltawerte, die in die AUC-Berechnungen eingingen. Das AUC-Modell kann außerdem zu einem fortgeschrittenem Vergleichszeitpunkt nicht unterscheiden, ob sich beispielweise ein negativer AUC-Wert durch Schwankungen unterhalb des Basislinienwertes ergeben hat oder zunächst das Ausgangsniveau gehalten werden konnte und sich dann nach einer gewissen Zeit ein stärkerer Abfall ereignete. Auch das gleichzeitige Auftreten eines

Anstiegs und eines Abfalls im Messverlauf wird durch die AUC-Daten nicht abgebildet, wie es bei den Messungen von Aceton bei Proband 4 der Fall war. Durch den starken Anstieg der Acetonkonzentration zu Beginn der Messungen ergaben sich für Proband 4 über den gesamten Messzeitraum positive AUC-Werte, die denen von Proband 1, bei dem sich über den gesamten Messzeitraum ein Anstieg der Acetonkonzentration zeigte, am ähnlichsten waren. Für den Vergleich wurden die Zeitintervalle von Messbeginn bis zur 30., 60., 90. und 120. Minute gewählt. Durch Gleichsetzen des jeweils nächstgelegenen Messzeitpunktes mit dem entsprechenden Vergleichszeitpunkt sind Ungenauigkeiten aufgetreten. Diese ließen sich durch feste Messintervalle für alle Probanden und somit direkt vergleichbare Zeitpunkte vermeiden.

Insgesamt hat sich gezeigt, dass das angewendete Modell trotz oben genannter Einschränkungen größtenteils dazu geeignet war, Dynamiken der Massenkonzentrationen nach Studienpräparatanwendung darzustellen. Durch Erkenntnisse aus dieser Pilotstudie ließe sich der Studienaufbau für eventuelle Folgestudien jedoch verbessern. Eine Minimierung der interindividuellen Unterschiede durch eine sinnvolle Standardisierung von Bedingungen vor Messbeginn ist ebenfalls anzustreben.

## 6.6 Ausblick

Die vorliegende Pilotstudie zeigt, dass metabolische Veränderungen nach der intranasalen Gabe von Insulin im Rahmen der INIT II-Studie durch Atemgasmessungen detektiert werden können. Bei den Metaboliten handelt es sich um Aceton und ggf. auch um Isopren. Nur bei dem Probanden, der im Vergleich zu den übrigen Studienteilnehmern eine sehr hohe gewichtsbezogene Insulindosis erhalten hatte und gleichzeitig auch die ausgeprägteste Senkung des Blutzuckerspiegels aufwies, ergaben sich entsprechende Veränderungen für beide Marker. Für Aceton ist ein Konzentrationsabfall nach intranasaler Insulingabe biochemisch leicht nachvollziehbar und zeigte sich dezent auch bei fast allen anderen Probanden der Insulingruppe. Für Isopren ist ein Anstieg im Zusammenhang mit der intranasalen Insulingabe möglich, es sind jedoch weitere Studien nötig um eine genaue Aussage treffen zu können. Auch eine veränderte körperliche Aktivität könnte Ursache für die Veränderung der abgeatmeten Isoprenkonzentration sein. Ein verbessertes Studiendesign, bei dem gerade bei jungen Probanden ein Fokus auf die Vermeidung von Raumluftakkumulation gelegt werden sollte, dürfte die Möglichkeit bieten, ein größeres VOC-Spektrum zu untersuchen. Der Einsatz von gaschromatischen Analysen zusätzlich zur PTR-MS mit Quadrupol-Technik bzw. die Verwendung eines PTR-MS- Gerätes mit TOF-Massenanalysator ließe eine Unterscheidung von unterschiedlichen Stoffwechselprodukten mit gleicher Massenzahl zu. Dadurch wäre die direkte Zuordnung einer gemessenen Massenkonzentration zu einem Stoffwechselprodukt möglich. Da kurzfristige metabolische Effekte nicht in direktem Zusammenhang mit einer langfristigen immunmodulatorischen Wirkung von intranasalem Insulin stehen, sind die sich eventuell aus dieser Studie ergebenden Marker nicht als Biomarker für die Diabetespräventionsforschung verwendbar. Allenfalls könnten sich durch die Marker, da die Ergebnisse dieser Studie dosisabhängige Effekte nahelegen, Hinweise auf die Höhe der effektiven inhalierten Insulinmenge ergeben, die wiederum Auswirkungen auf die Effektivität einer Antigentherapie haben könnte.

Besonders weil es noch nicht viele Studien zu Atemgasanalysen bei Kindern und Jugendlichen gibt, bot die vorliegende Pilotstudie den Rahmen aktuelle Möglichkeiten, Besonderheiten und Grenzen von Atemgasanalysen bei jüngeren Probanden im Rahmen einer Diabetespräventionsstudie besser kennen zu lernen. Obwohl die genaue Herkunft vieler VOCs durch die Komplexität des humanen biochemischen Milieus noch unbekannt ist, lassen sich gewisse Marker dennoch leichter aus der Atemluft detektieren als aus dem Blut<sup>46</sup> und durch die Untersuchung von VOCs in der Atemluft können viele Pathoprozesse im Körper registriert werden<sup>231,235</sup>. Es wäre daher vorstellbar, dass durch die Untersuchung eines breiteren VOC-Spektrums über einen längeren Untersuchungszeitraum volatile Biomarker gefunden werden, die z.B. Veränderungen von entzündlichen Prozessen im Rahmen einer Insulinitis oder ähnlichem widerspiegeln. So könnte die Effektivität von Präventivmaßnahmen frühzeitiger beurteilt und die Diabetespräventionsforschung dadurch unterstützt und erleichtert werden.

Durch die Studie wurde deutlich, dass Atemgasanalysen technisch auch mit Kindern und Jugendlichen gut durchführbar sind und ab einem Probandenalter von 4 Jahren durchaus über ihren Einsatz in der Forschung nachgedacht werden kann. Etwas älteren Kinder fällt die Atemluftsammlung jedoch leichter. Die Non-Invasivität von Atemgasmessungen ist gerade für Kinder von besonderem Vorteil, der auch die Akzeptanz bei den Eltern erhöht und dazu beitragen kann, dass ein vorzeitiges Ausscheiden aus einer Langzeitstudie verhindert wird. Durch die Studie bestätigt sich daher, dass Atemgasanalysen grundsätzlich ein großes Potential für die Diabetespräventionsforschung bieten.

Dennoch zeigt die Studie, dass der aktuelle Forschungsstand Einschränkungen bei Atemgasanalysen mit sich bringt, die es fraglich erscheinen lassen, ob der Aufwand einer umfangreicheren Atemgasstudie momentan schon sinnvoll ist. Um überhaupt ein größeres VOC-Spektrum untersuchen zu können muss unbedingt auf niedrige Raumlufkonzentrationen geachtet werden und um zuverlässige Atemgasdaten zu erhalten ist dringend die Entwicklung von Algorithmen zur Verrechnung der Raumlufkonzentration notwendig. Die generierten VOC-Daten fallen sehr heterogen aus, was auf vielfältige Einflüsse zurückgeführt werden kann. Neben dem Legen eines besonderen Fokus auf eine sinnvolle Standardisierung von Ausgangsbedingungen ist für den Erhalt zuverlässiger und vergleichbarer Atemgasdaten dringend die Entwicklung von allgemeinen Standards für die Atemgassammlung und -messung ebenso wie für die Datenverarbeitung notwendig.

Nach Fortschritten der Atemgasforschung in diesen Punkten und Setzen eines besonderen Fokus auf diese Punkte beim Studienaufbau, bieten Atemgasstudien sicher ein großes Potential Biomarker für die Diabetesforschung zu finden.

## 7. Zusammenfassung

Typ 1 Diabetes ist durch eine fortschreitende, selektive und irreversible autoimmune Zerstörung der Langerhans'schen Inseln des Pankreas bedingt<sup>1,2</sup>. Die Erkrankung verläuft in verschiedenen Stadien<sup>15</sup>. In der prädiabetischen asymptomatischen Phase lassen sich als Zeichen von Inselautoimmunität bereits multiple Autoantikörper, die gegen spezifische Bestandteile von  $\beta$ -Zellen gerichtet sind, im Blut nachweisen<sup>11,13</sup>. Diesem Stadium folgt nach Monaten bis Jahren die klinische Diabetesmanifestation<sup>11,15</sup>. Eine Heilung von Typ 1 Diabetes ist bis dato nicht möglich und es wird eine lebenslange Insulinsubstitution notwendig. Primär und sekundär präventive Therapien, die entweder die Entstehung der Autoimmunität oder das Fortschreiten der Autoimmunität zum Typ 1 Diabetes verhindern sollen, sind deshalb Forschungsschwerpunkte. Immunimpfungen, bei denen entsprechende Autoantigene im Sinne einer negativen Vaccination zur Reetablierung von Immuntoleranz gegenüber Inselzellen verabreicht werden, sind ein aktuell vielversprechender Ansatz in der Diabetesforschung<sup>22-25</sup>. Leider konnte bis jetzt kein erfolgreicher Therapiemodus gefunden werden und es fehlen entsprechende Biomarker, die frühzeitig die Verabreichung einer geeigneten Antigendosis oder sinnvoller Therapieintervalle anzeigen können. Da man durch Atemgasanalysen non-invasiv, schnell und kostengünstig auch eine große Anzahl an Metaboliten, die aus biochemischen Prozessen im Körper hervorgehen<sup>228,229</sup>, untersuchen kann, bietet diese Methode großes Potential für die Suche nach geeigneten Biomarkern für die Diabetespräventionsforschung. Um aktuelle Möglichkeiten, Besonderheiten und Grenzen von Atemgasanalysen bei jüngeren Probanden im Rahmen einer Diabetespräventionsstudie besser kennen zu lernen, kam diese Methode erstmals im Rahmen der vorliegenden INIT II-Atemgasstudie zur Anwendung. Darin wurden placebokontrolliert die Effekte von intranasal verabreichtem Insulin auf Metaboliten der Atemluft per Protonentransferreaktions-Massenspektrometrie (PTR-MS) untersucht. Parallel wurden Veränderungen des Blutzuckerspiegels registriert.

Es lassen sich folgende Ergebnisse zusammenfassen:

### 1. Blutzuckeränderungen

Alle Probanden der Insulingruppe wiesen nach intranasaler Insulingabe Blutzuckeränderungen ähnlich wie in der Literatur vorbeschrieben auf und es kam in unterschiedlicher Ausprägung zu einer Senkung des Blutzuckerspiegels nach Spraygabe mit tiefsten Werten zwischen der 30. und 60. Minute und folgendem Wiederanstieg im Verlauf<sup>186-190</sup>. Bei dem Probanden, der die höchste körperrgewichtbezogene intranasale Insulindosis erhalten hatte, fiel der Blutzuckerspiegel bis zur 30. Minute auf einen hypoglykämischen Wert, so dass durch die Gabe von Nahrung interveniert wurde. Die Probanden der Placebogruppe wiesen deutlich andere Blutzuckerdynamiken auf.

### 2. Dynamik der per PTR-MS untersuchten Metaboliten/Zuordnung zu Stoffwechselprodukten

Bei vielen der 38 untersuchten Massen kam es bei den jungen Probanden zu hohen Anteilen der Raumluftkonzentration an den Atemluftkonzentrationen und nur bei 8 Massen wiesen alle

Probanden über den gesamten Messzeitraum Atemluftkonzentrationen auf, die oberhalb der Raumlufkonzentration lagen und sie wurden weiter analysiert.

Hinsichtlich der Raumlufkonzentrationen ergaben sich vor allem bei zwei der Probanden für einige der Massen Akkumulationen im Verlauf der Messungen. Bei diesen zwei Probanden wurde der Raum, in dem die Messungen stattfanden, erst nach etwa 60 Minuten bzw. 90 Minuten gelüftet. Die Zeiträume der Akkumulation lassen sich mit den jeweiligen Zeiträumen bis zum Lüften korrelieren. Bei den übrigen Probanden wurde kontinuierlich gelüftet.

Für keine der untersuchten Massen ließ sich bei den Atemgasmessungen ein grundsätzlicher Unterschied zwischen Insulin- und Placebogruppe erkennen. Bei einigen der Probanden der Insulingruppe zeigte sich bei bestimmten Massen jedoch eine ausgeprägte Dynamik in den Konzentrationen. Nach Zuordnung der untersuchten Massen zu Stoffwechselprodukten könnte es sich unter Einbeziehung bekannter Eigenschaften der Stoffwechselprodukte nur bei den Dynamiken von  $m/z = 59$ , dem Aceton zugeordnet wurde<sup>243,275,276</sup>, und ggf. auch von  $m/z = 69$ , dem Isopren zugeordnet wurde<sup>243,276</sup>, um Auswirkungen von intranasalem Insulin handeln.

Für Aceton ist ein Konzentrationsabfall nach intranasaler Insulingabe durch dessen supprimierende Wirkung auf die Ketogenese und Förderung der Ketonkörperutilisation<sup>250</sup> biochemisch leicht nachvollziehbar. Mit Ausnahme von einem Probanden wiesen alle Probanden der Insulingruppe mit unterschiedlicher Ausprägung ein Fallen der Acetonkonzentration zwischen der 40. und 60. Minute auf. Dabei fiel die Acetonkonzentration bei dem Probanden, der die höchste körperrgewichtbezogene intranasale Insulindosis erhalten hatte, deutlich stärker als bei den übrigen Probanden.

Bei diesem Probanden zeigte sich ebenso wie bei einem weiteren Probanden der Insulingruppe auch ein Konzentrationsanstieg von Isopren<sup>243,276</sup> ab etwa der 60. Minute. Dieser ist bei dem Probanden, der die höchste körperrgewichtbezogene intranasale Insulindosis erhalten hatte, deutlich ausgeprägter als bei dem anderen Probanden. Da Isopren als Marker der Cholesterin-Biosynthese gilt<sup>299-301</sup> und eine Induktion der Cholesterin-Biosynthese durch Insulin bekannt ist<sup>303</sup>, ist ein Anstieg von Isopren in der Atemluft im Zusammenhang mit der intranasalen Insulingabe möglich, es sind jedoch weitere Studien notwendig um eine genaue Aussage treffen zu können. Auch eine vermehrte körperliche Aktivität könnte Ursache für die Veränderung der abgeatmeten Isoprenkonzentration sein<sup>239-242</sup> oder sie könnte bei dem Probanden, bei dem sich eine ausgeprägte Dynamik zeigte, auch mit der erneuten Gabe von Nahrung in Zusammenhang stehen.

### *3. Einschätzung der Eignung von Atemgasanalysen für die Suche nach Biomarkern für die Diabetespräventionsforschung*

Da kurzfristige metabolische Effekte nicht in direktem Zusammenhang mit einer langfristigen immunmodulatorischen Wirkung von intranasalem Insulin stehen, sind die sich eventuell aus dieser Studie ergebenden Marker nicht als Biomarker für die Präventionsforschung verwendbar. Allenfalls könnten sich durch solche volatilen Marker Hinweise auf die Höhe der effektiv inhalierten Insulinmenge ergeben, da die Ergebnisse dieser Studie dosisabhängige Effekte nahelegen, die wiederum Auswirkungen auf die Effektivität einer Antigen-therapie haben könnte.

Da es noch nicht viele Studien zu Atemgasanalysen bei Kindern und Jugendlichen gibt, bot die vorliegende Pilotstudie aber den Rahmen aktuelle Möglichkeiten, Besonderheiten und Grenzen von Atemgasanalysen bei jüngeren Probanden im Rahmen einer Diabetespräventionsstudie besser kennen zu lernen. Atemgasanalysen sind technisch auch mit Kindern und Jugendlichen gut durchführbar und ab einem Probandenalter von 4 Jahren kann durchaus über ihren Einsatz in der Forschung nachgedacht werden. Etwas älteren Kindern fällt die Atemgassammlung jedoch leichter. Die Non-Invasivität der Messmethode ist gerade für Kinder von besonderem Vorteil, der sich in der Akzeptanz bei den Eltern widerspiegelt und sich auch positiv auf eine langfristige Studienteilnahme auswirken dürfte. Da durch Atemgasanalysen zudem schnell und kostengünstig viele Pathoprozesse des Körpers detektiert werden können<sup>231,235</sup>, könnten durch umfangreichere Atemgasstudien volatile Biomarker gefunden werden, die z.B. eine Veränderung von entzündlichen Prozessen im Rahmen einer Insulinitis oder ähnlichem widerspiegeln, wodurch die Effektivität von Präventivmaßnahmen frühzeitig beurteilt werden könnte.

Dennoch zeigt die Studie, dass der aktuelle Forschungsstand methodische Einschränkungen bei Atemgasanalysen mit sich bringt, die es fraglich erscheinen lassen, ob der Aufwand einer umfangreicheren Atemgasstudie momentan schon sinnvoll ist. In der vorliegenden Studie fielen hohe Anteile der Raumluftkonzentration an den Atemluftkonzentrationen auf, was in den wenigen Studien, die es über Besonderheiten von Atemgasanalysen bei Kindern und Jugendlichen gibt, bisher noch nicht beschrieben wurde. Die Ursache für die verhältnismäßig hohen Raumluftkonzentrationsanteile in dieser Studie könnte zum Teil darin liegen, dass VOCs in der Atemluft von Kindern und Jugendlichen eventuell grundsätzlich in niedrigeren Konzentrationen vorkommen als bei Erwachsenen<sup>237,305,306</sup>, eine im Vergleich zu Erwachsenen andere Atemtechnik bei der Atemluftsammlung zur Messung niedrigerer VOC-Konzentrationen bei jüngeren Probanden beiträgt<sup>307</sup> oder sie auch direkt durch das Vorkommen hoher Konzentrationen gewisser VOCs in der Raumluft bedingt waren. Da es keinen allgemeingültigen und etablierten Algorithmus zur Verrechnung der Raumluftkonzentration gibt und Atemluftdaten ab einem Raumluftkonzentrationsanteil von 25 % an der Atemluftkonzentration kritisch betrachtet werden müssen<sup>304</sup>, sollten hohe VOC-Konzentrationen in der Raumluft bzw. VOC-Akkumulationen besonders bei jüngeren Probanden vermieden werden. Zudem fehlen Standards für die Atemgassammlung und -messung ebenso wie für die Datenverarbeitung, die die Zuverlässigkeit und Vergleichbarkeit von Atemgasdaten verschiedener Forschergruppen und Studien gewährleisten. Die bisher in primär- und sekundärpräventiven Diabetesstudien beobachteten immunmodulatorischen Effekte<sup>41-43</sup> geben Hoffnung, dass durch weitere Präventionsstudien, wie die gegenwärtig durchgeführten Studien PINIT und POINT<sup>310,310</sup>, in denen die Effekte von oralem bzw. intranasalem Insulin bei gesunden Kindern mit genetischen Risiko untersucht werden, ein Therapiemodus zur erfolgreichen Prävention von Typ 1 Diabetes gefunden werden kann. Nach Fortschritten der Atemgasforschung in den oben genannten Punkten, bieten parallel zu solchen Studien durchgeführte Atemgasanalysen ein großes Potential Biomarker für die Diabetesforschung zu finden.

## 8. Appendix

**Tab. 12:**  $m/z = 33$ : „Area under the curve“-Berechnung der Basislinien-korrigierten Deltawerte bis zu den 4 Vergleichszeitpunkten

<b>Proband</b>	30 Minuten	60 Minuten	90 Minuten	120 Minuten
1	-93	-747	-2097	-2077
2	-195	-583	-198	-463
3	-57	-313	-102	91
4	-819	-4739	-12353	-21138
5	-729	-1695	-3076	-4904
6	-777	-2134	-4229	-6794
7	-329	-723	-1283	-2188
8	-550	-1672	-3044	-4424
9	-362	-901	-1959	-2893

**Tab. 13:**  $m/z = 51$ : „Area under the curve“-Berechnung der Basislinien-korrigierten Deltawerte bis zu den 4 Vergleichszeitpunkten

<b>Proband</b>	30 Minuten	60 Minuten	90 Minuten	120 Minuten
1	-40	-182	-299	-409
2	54	115	160	214
3	5	23	63	95
4	-28	-265	-667	-1118
5	-95	-221	-365	-516
6	-39	-134	-272	-424
7	17	15	-13	-80
8	14	-21	-71	-128
9	-18	-50	-130	-199

**Tab. 14:**  $m/z = 55$ : „Area under the curve“-Berechnung der Basislinien-korrigierten Deltawerte bis zu den 4 Vergleichszeitpunkten

<b>Proband</b>	30 Minuten	60 Minuten	90 Minuten	120 Minuten
1	-36	-88	1035	1069
2	577	1409	2042	2916
3	-34	-1097	-1116	-967
4	443	-1606	-3631	-5582
5	-1383	-3492	-5378	-7605
6	-167	-1054	-2026	-3238
7	-632	-1566	-3058	-5603
8	792	314	1478	1245
9	-299	-706	-2632	-4252

**Tab. 15:**  $m/z = 59$ : „Area under the curve“-Berechnung der Basislinien-korrigierten Deltawerte bis zu den 4 Vergleichszeitpunkten

<b>Proband</b>	30 Minuten	60 Minuten	90 Minuten	120 Minuten
1	3140	10303	21198	31122
2	-3691	-6453	-10733	-16949
3	-1352	-4429	-6991	-9413
4	12302	26558	30180	31215
5	-3701	-4507	-5737	-5869
6	-3159	-9700	-17120	-21814
7	-896	-3411	-8347	-16567
8	-1095	-4677	-11366	-18684
9	-2517	-4370	-14579	-22282

**Tab. 16:**  $m/z = 63$ : „Area under the curve“-Berechnung der Basislinien-korrigierten Deltawerte bis zu den 4 Vergleichszeitpunkten

<b>Proband</b>	30 Minuten	60 Minuten	90 Minuten	120 Minuten
<i>1</i>	10	-15	-7	15
<i>2</i>	15	53	86	132
<i>3</i>	-4	4	35	64
<i>4</i>	-12	-63	-109	-186
<i>5</i>	43	89	140	240
<i>6</i>	-19	-46	-81	-113
<i>7</i>	-28	-46	-52	-95
<i>8</i>	-22	-59	-69	-133
<i>9</i>	12	34	19	11

**Tab. 17:**  $m/z = 65$ : „Area under the curve“-Berechnung der Basislinien-korrigierten Deltawerte bis zu den 4 Vergleichszeitpunkten

<b>Proband</b>	30 Minuten	60 Minuten	90 Minuten	120 Minuten
<i>1</i>	-39	-98	-96	-58
<i>2</i>	13	-22	-78	-98
<i>3</i>	-4	-8	5	20
<i>4</i>	-2	-44	-115	-198
<i>5</i>	-5	-21	-45	-69
<i>6</i>	-6	-14	-18	-40
<i>7</i>	-8	-15	-21	-32
<i>8</i>	-14	-45	-78	-131
<i>9</i>	4	8	3	5

**Tab. 18:**  $m/z = 69$ : „Area under the curve“-Berechnung der Basislinien-korrigierten Deltawerte bis zu den 4 Vergleichszeitpunkten

<b>Proband</b>	30 Minuten	60 Minuten	90 Minuten	120 Minuten
1	-93	372	316	1102
2	-654	-1338	-1930	-2111
3	-24	-204	-448	-302
4	-197	-354	982	2826
5	-91	-388	-352	224
6	-488	-853	-1323	-1848
7	-290	-297	-305	-735
8	1331	3048	5352	8487
9	-114	-194	-322	-43

**Tab. 19:**  $m/z = 77$ : „Area under the curve“-Berechnung der Basislinien-korrigierten Deltawerte bis zu den 4 Vergleichszeitpunkten

<b>Proband</b>	30 Minuten	60 Minuten	90 Minuten	120 Minuten
1	25	89	178	249
2	45	87	152	190
3	-13	-27	-35	-41
4	23	39	34	25
5	4	19	16	8
6	-18	-53	-90	-108
7	5	11	-2	-25
8	-13	-42	-72	-96
9	-11	-20	-72	-97

**Tab. 20:** Übersicht über Eigenwerte, Anteile der erklärten Varianz und Faktorladungen der Hauptkomponenten (HK) der AUC-Daten des untersuchten Zeitabschnittes 30 Minuten  
(Bei den Faktorladungen stehen positive Werte für einen positiven Beitrag und negative Werte für einen negativen Beitrag einer Variablen zur entsprechenden Hauptkomponente.)

30 Minuten

	Hauptkomponenten							
	HK 1	HK 2	HK 3	HK 4	HK 5	HK 6	HK 7	HK 8
<b>Eigenwert</b>	2,320	1,853	1,472	1,243	0,674	0,254	0,184	0,001
<b>Anteil der erklärten Varianz [%]</b>	28,996	23,166	18,401	15,534	8,424	3,176	2,295	0,009
<b>Faktorladung m/z = 33</b>	0,340	-0,489	-0,234	-0,713	-0,146	0,245	-0,001	-0,009
<b>Faktorladung m/z = 51</b>	0,854	-0,389	-0,313	0,054	-0,025	-0,038	-0,130	0,017
<b>Faktorladung m/z = 55</b>	0,896	0,032	0,139	0,093	0,271	-0,026	0,305	-0,003
<b>Faktorladung m/z = 59</b>	0,284	0,250	0,855	0,157	-0,089	0,296	-0,072	0,005
<b>Faktorladung m/z = 63</b>	-0,683	-0,457	0,106	-0,225	0,492	0,118	0,086	0,011
<b>Faktorladung m/z = 65</b>	0,008	-0,476	-0,346	0,760	0,183	0,192	-0,067	-0,009
<b>Faktorladung m/z = 69</b>	0,301	0,713	-0,205	-0,244	0,513	0,032	-0,187	-0,004
<b>Faktorladung m/z = 77</b>	0,184	-0,675	0,629	-0,094	0,179	-0,229	-0,146	-0,008

**Tab. 21:** Übersicht über Eigenwerte, Anteile der erklärten Varianz und Faktorladungen der Hauptkomponenten (HK) der AUC-Daten des untersuchten Zeitabschnittes 60 Minuten  
(Bei den Faktorladungen stehen positive Werte für einen positiven Beitrag und negative Werte für einen negativen Beitrag einer Variablen zur entsprechenden Hauptkomponente.)

60 Minuten

	Hauptkomponenten							
	HK 1	HK 2	HK 3	HK 4	HK 5	HK 6	HK 7	HK 8
<b>Eigenwert</b>	2,978	1,833	1,732	0,808	0,326	0,219	0,090	0,014
<b>Anteil der erklärten Varianz [%]</b>	37,230	22,914	21,645	10,104	4,069	2,739	1,122	0,177
<b>Faktorladung m/z = 33</b>	-0,811	0,312	0,156	0,326	-0,283	0,117	0,142	0,025
<b>Faktorladung m/z = 51</b>	-0,837	0,397	-0,085	-0,271	0,039	0,218	-0,096	-0,061
<b>Faktorladung m/z = 55</b>	-0,285	0,849	-0,051	-0,326	0,182	-0,217	0,099	0,018
<b>Faktorladung m/z = 59</b>	0,902	0,120	0,182	-0,198	0,085	0,252	0,167	-0,020
<b>Faktorladung m/z = 63</b>	-0,467	-0,263	0,679	0,368	0,331	-0,046	0,051	-0,033
<b>Faktorladung m/z = 65</b>	-0,638	-0,634	-0,129	-0,348	0,177	0,129	0,034	0,065
<b>Faktorladung m/z = 69</b>	0,159	0,392	-0,716	0,476	0,249	0,132	-0,033	0,026
<b>Faktorladung m/z = 77</b>	0,274	0,468	0,820	-0,010	0,021	0,105	-0,134	0,055

**Tab. 22:** Übersicht über Eigenwerte, Anteile der erklärten Varianz und Faktorladungen der Hauptkomponenten (HK) der AUC-Daten des untersuchten Zeitabschnittes 90 Minuten  
(Bei den Faktorladungen stehen positive Werte für einen positiven Beitrag und negative Werte für einen negativen Beitrag einer Variablen zur entsprechenden Hauptkomponente.)

90 Minuten

	Hauptkomponenten							
	HK 1	HK 2	HK 3	HK 4	HK 5	HK 6	HK 7	HK 8
<b>Eigenwert</b>	3,418	2,047	1,567	0,573	0,223	0,096	0,075	0,001
<b>Anteil der erklärten Varianz [%]</b>	42,722	25,591	19,582	7,159	2,790	1,202	0,937	0,017
<b>Faktorladung m/z = 33</b>	-0,908	0,317	0,065	0,061	0,208	-0,029	0,154	-0,016
<b>Faktorladung m/z = 51</b>	-0,866	0,309	0,294	-0,100	0,034	0,196	-0,137	-0,003
<b>Faktorladung m/z = 55</b>	-0,185	0,717	0,610	-0,182	-0,093	-0,187	-0,053	0,002
<b>Faktorladung m/z = 59</b>	0,869	0,304	-0,199	-0,055	0,310	-0,036	-0,112	-0,011
<b>Faktorladung m/z = 63</b>	-0,536	0,337	-0,556	0,521	-0,073	-0,072	-0,091	-0,001
<b>Faktorladung m/z = 65</b>	-0,771	-0,556	-0,135	-0,140	0,218	-0,095	-0,048	0,020
<b>Faktorladung m/z = 69</b>	0,350	-0,091	0,789	0,478	0,132	0,030	0,013	0,010
<b>Faktorladung m/z = 77</b>	0,230	0,902	-0,338	-0,057	0,060	0,075	0,079	0,022

**Tab. 23:** Übersicht über Eigenwerte, Anteile der erklärten Varianz und Faktorladungen der Hauptkomponenten (HK) der AUC-Daten des untersuchten Zeitabschnittes 120 Minuten (Bei den Faktorladungen stehen positive Werte für einen positiven Beitrag und negative Werte für einen negativen Beitrag einer Variablen zur entsprechenden Hauptkomponente.)

*120 Minuten*

	<b>Hauptkomponenten</b>							
	<b>HK 1</b>	<b>HK 2</b>	<b>HK 3</b>	<b>HK 4</b>	<b>HK 5</b>	<b>HK 6</b>	<b>HK 7</b>	<b>HK 8</b>
<b>Eigenwert</b>	3,525	1,860	1,479	0,564	0,405	0,119	0,044	0,004
<b>Anteil der erklärten Varianz [%]</b>	44,064	23,255	18,484	7,046	5,063	1,492	0,545	0,051
<b>Faktorladung m/z = 33</b>	0,949	0,130	0,136	0,055	0,191	-0,121	-0,089	0,036
<b>Faktorladung m/z = 51</b>	0,910	0,065	0,351	-0,025	-0,084	-0,110	0,156	-0,004
<b>Faktorladung m/z = 55</b>	0,337	0,605	0,661	-0,177	-0,072	0,216	-0,024	0,003
<b>Faktorladung m/z = 59</b>	-0,672	0,595	-0,249	-0,099	0,338	0,023	0,090	0,025
<b>Faktorladung m/z = 63</b>	0,590	0,325	-0,465	0,559	-0,046	0,124	0,021	0,000
<b>Faktorladung m/z = 65</b>	0,805	-0,274	-0,264	-0,215	0,392	0,084	-0,003	-0,029
<b>Faktorladung m/z = 69</b>	-0,485	-0,051	0,720	0,395	0,291	-0,040	-0,005	-0,018
<b>Faktorladung m/z = 77</b>	0,018	0,968	-0,183	-0,063	-0,041	-0,146	-0,047	-0,031

## 9. Literaturverzeichnis

- 1 Eisenbarth GS. Type I diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease. *N. Engl. J. Med.* 1986; 314: 1360–1368.
- 2 Atkinson MA, Eisenbarth GS. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet* 2001; 358: 221–229.
- 3 Prasad S, Kohm AP, McMahon JS, Luo X, Miller SD. Pathogenesis of NOD diabetes is initiated by reactivity to the insulin B chain 9-23 epitope and involves functional epitope spreading. *J. Autoimmun.* 2012; 39: 347–353.
- 4 Nakayama M. Insulin as a key autoantigen in the development of type 1 diabetes. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 2011; 27: 773–777.
- 5 Zhang L, Nakayama M, Eisenbarth GS. Insulin as an autoantigen in NOD/human diabetes. *Curr. Opin. Immunol.* 2008; 20: 111–118.
- 6 Wong FS. Insulin--a primary autoantigen in type 1 diabetes? *Trends Mol Med* 2005; 11: 445–448.
- 7 Ziegler AG, Hummel M, Schenker M, Bonifacio E. Autoantibody appearance and risk for development of childhood diabetes in offspring of parents with type 1 diabetes: the 2-year analysis of the German BABYDIAB Study. *Diabetes* 1999; 48: 460–468.
- 8 Ilonen J, Hammais A, Laine A-P, Lempainen J, Vaarala O, Veijola R, Simell O, Knip M. Patterns of  $\beta$ -cell autoantibody appearance and genetic associations during the first years of life. *Diabetes* 2013; 62: 3636–3640.
- 9 Di Lorenzo TP, Peakman M, Roep BO. Translational mini-review series on type 1 diabetes: Systematic analysis of T cell epitopes in autoimmune diabetes. *Clin. Exp. Immunol.* 2007; 148: 1–16.
- 10 Krishnamurthy B, Dudek NL, McKenzie MD, Purcell AW, Brooks AG, Gellert S, Colman PG, Harrison LC, Lew AM, Thomas HE, Kay TWH. Responses against islet antigens in NOD mice are prevented by tolerance to proinsulin but not IGRP. *J. Clin. Invest.* 2006; 116: 3258–3265.
- 11 Ziegler AG, Rewers M, Simell O, Simell T, Lempainen J, Steck A, Winkler C, Ilonen J, Veijola R, Knip M, Bonifacio E, Eisenbarth GS. Seroconversion to multiple islet autoantibodies and risk of progression to diabetes in children. *JAMA* 2013; 309: 2473–2479.
- 12 Knip M, Korhonen S, Kulmala P, Veijola R, Reunanen A, Raitakari OT, Viikari J, Akerblom HK. Prediction of type 1 diabetes in the general population. *Diabetes Care* 2010; 33: 1206–1212.
- 13 Hummel M, Bonifacio E, Schmid S, Walter M, Knopff A, Ziegler A-G. Brief communication: early appearance of islet autoantibodies predicts childhood type 1 diabetes in offspring of diabetic parents. *Ann. Intern. Med.* 2004; 140: 882–886.
- 14 Giannopoulou EZ, Winkler C, Chmiel R, Matzke C, Scholz M, Beyerlein A, Achenbach P, Bonifacio E, Ziegler A-G. Islet autoantibody phenotypes and incidence in children at increased risk for type 1 diabetes. *Diabetologia* 2015; 58: 2317–2323.

- 15 Hummel M, Achenbach P. Diabetes mellitus Typ 1. Früherkennung und Prävention. *Der Internist* 2015; 56: 475–483.
- 16 MacFarlane AJ, Strom A, Scott FW. Epigenetics: deciphering how environmental factors may modify autoimmune type 1 diabetes. *Mamm. Genome* 2009; 20: 624–632.
- 17 Mehers KL, Gillespie KM. The genetic basis for type 1 diabetes. *Br. Med. Bull.* 2008; 88: 115–129.
- 18 Achenbach P, Bonifacio E, Koczwara K, Ziegler A-G. Natural history of type 1 diabetes. *Diabetes* 2005; 54 Suppl 2: S25-31.
- 19 Knip M, Veijola R, Virtanen SM, Hyöty H, Vaarala O, Akerblom HK. Environmental triggers and determinants of type 1 diabetes. *Diabetes* 2005; 54 Suppl 2: S125-36.
- 20 Knip M. Descriptive epidemiology of type 1 diabetes--is it still in? *Diabetologia* 2012; 55: 1227–1230.
- 21 Patterson CC, Dahlquist GG, Gyürüs E, Green A, Soltész G. Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989-2003 and predicted new cases 2005-20: a multicentre prospective registration study. *Lancet* 2009; 373: 2027–2033.
- 22 Wang X, Sherman A, Liao G, Leong KW, Daniell H, Terhorst C, Herzog RW. Mechanism of oral tolerance induction to therapeutic proteins. *Advanced drug delivery reviews* 2013; 65: 759–773.
- 23 Harrison LC, Wentworth JM, Zhang Y, Bandala-Sanchez E, Böhmer RM, Neale AM, Stone NL, Naselli G, Bosco JJ, Auyeung P, Rashidi M, Augstein P, Morahan G. Antigen-based vaccination and prevention of type 1 diabetes. *Curr. Diab. Rep.* 2013; 13: 616–623.
- 24 Harrison LC. Vaccination against self to prevent autoimmune disease: the type 1 diabetes model. *Immunol. Cell Biol.* 2008; 86: 139–145.
- 25 Harrison LC, Hafler DA. Antigen-specific therapy for autoimmune disease. *Curr. Opin. Immunol.* 2000; 12: 704–711.
- 26 Xu XJ, Gearon C, Stevens E, Vergani D, Baum H, Peakman M. Spontaneous T-cell proliferation in the non-obese diabetic mouse to a peptide from the unique class II MHC molecule, I-Ag7, which is also protective against the development of autoimmune diabetes. *Diabetologia* 1999; 42: 560–565.
- 27 Daniel D, Wegmann DR. Protection of nonobese diabetic mice from diabetes by intranasal or subcutaneous administration of insulin peptide B-(9-23). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1996; 93: 956–960.
- 28 Bercovici N, Delon J, Cambouris C, Escriou N, Debré P, Liblau RS. Chronic intravenous injections of antigen induce and maintain tolerance in T cell receptor-transgenic mice. *Eur. J. Immunol.* 1999; 29: 345–354.
- 29 Zhang ZJ, Davidson L, Eisenbarth G, Weiner HL. Suppression of diabetes in nonobese diabetic mice by oral administration of porcine insulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1991; 88: 10252–10256.

- 30 Bergerot I, Fabien N, Maguer V, Thivolet C. Oral administration of human insulin to NOD mice generates CD4<sup>+</sup> T cells that suppress adoptive transfer of diabetes. *J. Autoimmun.* 1994; 7: 655–663.
- 31 Sai P, Damage C, Rivereau AS, Hoeltzel A, Gouin E. Prophylactic oral administration of metabolically active insulin entrapped in isobutylcyanoacrylate nanocapsules reduces the incidence of diabetes in nonobese diabetic mice. *Journal of autoimmunity* 1996; 9: 713–722.
- 32 Harrison LC, Dempsey-Collier M, Kramer DR, Takahashi K. Aerosol insulin induces regulatory CD8 gamma delta T cells that prevent murine insulin-dependent diabetes. *J. Exp. Med.* 1996; 184: 2167–2174.
- 33 Tian J, Atkinson MA, Clare-Salzler M, Herschenfeld A, Forsthuber T, Lehmann PV, Kaufman DL. Nasal administration of glutamate decarboxylase (GAD65) peptides induces Th2 responses and prevents murine insulin-dependent diabetes. *J. Exp. Med.* 1996; 183: 1561–1567.
- 34 Bai XF, Link H. Nasal tolerance induction as a potential means of immunotherapy for autoimmune diseases: implications for clinical medicine. *Clin. Exp. Allergy* 2000; 30: 1688–1696.
- 35 Falb D, Briner TJ, Sunshine GH, Bourque CR, Luqman M, Geftter ML, Kamradt T. Peripheral tolerance in T cell receptor-transgenic mice: evidence for T cell anergy. *Eur. J. Immunol.* 1996; 26: 130–135.
- 36 Friedman A. Induction of anergy in Th1 lymphocytes by oral tolerance. Importance of antigen dosage and frequency of feeding. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1996; 778: 103–110.
- 37 Chen Y, Inobe J, Marks R, Gonnella P, Kuchroo VK, Weiner HL. Peripheral deletion of antigen-reactive T cells in oral tolerance. *Nature* 1995; 376: 177–180.
- 38 Liblau RS, Tisch R, Shokat K, Yang X, Dumont N, Goodnow CC, McDevitt HO. Intravenous injection of soluble antigen induces thymic and peripheral T-cells apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1996; 93: 3031–3036.
- 39 Miller A, Lider O, Weiner HL. Antigen-driven bystander suppression after oral administration of antigens. *J. Exp. Med.* 1991; 174: 791–798.
- 40 Tian J, Lehmann PV, Kaufman DL. Determinant spreading of T helper cell 2 (Th2) responses to pancreatic islet autoantigens. *J. Exp. Med.* 1997; 186: 2039–2043.
- 41 Bonifacio E, Ziegler A-G, Klingensmith G, Schober E, Bingley PJ, Rottenkolber M, Theil A, Eugster A, Puff R, Peplow C, Buettner F, Lange K, Hasford J, Achenbach P. Effects of high-dose oral insulin on immune responses in children at high risk for type 1 diabetes: the Pre-POINT randomized clinical trial. *JAMA* 2015; 313: 1541–1549.
- 42 Skyler JS, Krischer JP, Wolfsdorf J, Cowie C, Palmer JP, Greenbaum C, Cuthbertson D, Rafkin-Mervis LE, Chase HP, Leschek E. Effects of oral insulin in relatives of patients with type 1 diabetes: The Diabetes Prevention Trial--Type 1. *Diabetes Care* 2005; 28: 1068–1076.
- 43 Harrison LC, Honeyman MC, Steele CE, Stone NL, Saruger E, Bonifacio E, Couper JJ, Colman PG. Pancreatic beta-cell function and immune responses to insulin after administration of intranasal insulin to humans at risk for type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2004; 27: 2348–2355.

- 44 Staeva TP, Chatenoud L, Insel R, Atkinson MA. Recent lessons learned from prevention and recent-onset type 1 diabetes immunotherapy trials. *Diabetes* 2013; 62: 9–17.
- 45 van Belle TL, Coppieters KT, Herrath MG von. Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. *Physiol. Rev.* 2011; 91: 79–118.
- 46 Kim K-H, Jahan SA, Kabir E. A review of breath analysis for diagnosis of human health. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2012; 33: 1–8.
- 47 Redondo MJ, Eisenbarth GS. Genetic control of autoimmunity in Type I diabetes and associated disorders. *Diabetologia* 2002; 45: 605–622.
- 48 Barrett JC, Clayton DG, Concannon P, Akolkar B, Cooper JD, Erlich HA, Julier C, Morahan G, Nerup J, Nierras C, Plagnol V, Pociot F, Schuilenburg H, Smyth DJ, Stevens H, Todd JA, Walker NM, Rich SS. Genome-wide association study and meta-analysis find that over 40 loci affect risk of type 1 diabetes. *Nature genetics* 2009; 41: 703–707.
- 49 Morahan G, Mehta M, James I, Chen W-M, Akolkar B, Erlich HA, Hilner JE, Julier C, Nerup J, Nierras C, Pociot F, Todd JA, Rich SS. Tests for genetic interactions in type 1 diabetes: linkage and stratification analyses of 4,422 affected sib-pairs. *Diabetes* 2011; 60: 1030–1040.
- 50 Villaseñor J, Benoist C, Mathis D. AIRE and APECED: molecular insights into an autoimmune disease. *Immunol. Rev.* 2005; 204: 156–164.
- 51 Bussone G, Mouthon L. Autoimmune manifestations in primary immune deficiencies. *Autoimmun Rev* 2009; 8: 332–336.
- 52 Bacchetta R, Passerini L, Gambineri E, Dai M, Allan SE, Perroni L, Dagna-Bricarelli F, Sartirana C, Matthes-Martin S, Lawitschka A, Azzari C, Ziegler SF, Levings MK, Roncarolo MG. Defective regulatory and effector T cell functions in patients with FOXP3 mutations. *J. Clin. Invest.* 2006; 116: 1713–1722.
- 53 Ounissi-Benkhalha H, Polychronakos C. The molecular genetics of type 1 diabetes: new genes and emerging mechanisms. *Trends Mol Med* 2008; 14: 268–275.
- 54 Knip M, Kukko M, Kulmala P, Veijola R, Simell O, Akerblom HK, Ilonen J. Humoral beta-cell autoimmunity in relation to HLA-defined disease susceptibility in preclinical and clinical type 1 diabetes. *American journal of medical genetics* 2002; 115: 48–54.
- 55 Nerup J, Platz P, Andersen OO, Christy M, Lyngsoe J, Poulsen JE, Ryder LP, Nielsen LS, Thomsen M, Svejgaard A. HL-A antigens and diabetes mellitus. *Lancet (London, England)* 1974; 2: 864–866.
- 56 Risch N. Genetics of IDDM: evidence for complex inheritance with HLA. *Genetic epidemiology* 1989; 6: 143–148.
- 57 Aly TA, Ide A, Jahromi MM, Barker JM, Fernando MS, Babu SR, Yu L, Miao D, Erlich HA, Fain PR, Barriga KJ, Norris JM, Rewers MJ, Eisenbarth GS. Extreme genetic risk for type 1A diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006; 103: 14074–14079.
- 58 Walter M, Albert E, Conrad M, Keller E, Hummel M, Ferber K, Barratt BJ, Todd JA, Ziegler A-G, Bonifacio E. IDDM2/insulin VNTR modifies risk conferred by IDDM1/HLA for development of Type 1 diabetes and associated autoimmunity. *Diabetologia* 2003; 46: 712–720.

- 59 Pugliese A, Boulware D, Yu L, Babu S, Steck AK, Becker D, Rodriguez H, DiMeglio L, Evans-Molina C, Harrison LC, Schatz D, Palmer JP, Greenbaum C, Eisenbarth GS, Sosenko JM. HLA-DRB1\*15:01-DQA1\*01:02-DQB1\*06:02 Haplotype Protects Autoantibody-Positive Relatives From Type 1 Diabetes Throughout the Stages of Disease Progression. *Diabetes* 2016; 65: 1109–1119.
- 60 Erlich H, Valdes AM, Noble J, Carlson JA, Varney M, Concannon P, Mychaleckyj JC, Todd JA, Bonella P, Fear AL, Lavant E, Louey A, Moonsamy P. HLA DR-DQ haplotypes and genotypes and type 1 diabetes risk: analysis of the type 1 diabetes genetics consortium families. *Diabetes* 2008; 57: 1084–1092.
- 61 Hermann R, Knip M, Veijola R, Simell O, Laine A-P, Akerblom HK, Groop P-H, Forsblom C, Pettersson-Fernholm K, Ilonen J. Temporal changes in the frequencies of HLA genotypes in patients with Type 1 diabetes--indication of an increased environmental pressure? *Diabetologia* 2003; 46: 420–425.
- 62 Rewers M, Zimmet P. The rising tide of childhood type 1 diabetes--what is the elusive environmental trigger? *Lancet* 2004; 364: 1645–1647.
- 63 Eringsmark Regnell S, Lernmark A. The environment and the origins of islet autoimmunity and Type 1 diabetes. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association* 2013; 30: 155–160.
- 64 Knip M. Pathogenesis of type 1 diabetes: implications for incidence trends. *Hormone research in paediatrics* 2011; 76 Suppl 1: 57–64.
- 65 Elboudwarej E, Cole M, Briggs FBS, Fouts A, Fain PR, Quach H, Quach D, Sinclair E, Criswell LA, Lane JA, Steck AK, Barcellos LF, Noble JA. Hypomethylation within gene promoter regions and type 1 diabetes in discordant monozygotic twins. *Journal of autoimmunity* 2016; 68: 23–29.
- 66 Cepek P, Zajacova M, Kotrbova-Kozak A, Silhova E, Cerna M. DNA methylation and mRNA expression of HLA-DQA1 alleles in type 1 diabetes mellitus. *Immunology* 2016; 148: 150–159.
- 67 Stefan M, Zhang W, Concepcion E, Yi Z, Tomer Y. DNA methylation profiles in type 1 diabetes twins point to strong epigenetic effects on etiology. *Journal of autoimmunity* 2014; 50: 33–37.
- 68 Patterson CC, Gyürüs E, Rosenbauer J, Cinek O, Neu A, Schober E, Parslow RC, Joner G, Svensson J, Castell C, Bingley PJ, Schoenle E, Jarosz-Chobot P, Urbonaité B, Rothe U, Krzysnik C, Ionescu-Tirgoviste C, Weets I, Kocova M, Stipancic G, Samardzic M, Beaufort CE de, Green A, Dahlquist GG, Soltész G. Trends in childhood type 1 diabetes incidence in Europe during 1989-2008: evidence of non-uniformity over time in rates of increase. *Diabetologia* 2012; 55: 2142–2147.
- 69 Variation and trends in incidence of childhood diabetes in Europe. EURODIAB ACE Study Group. *Lancet* 2000; 355: 873–876.

- 70 Serrano-Rios M, Goday A, Martinez Larrad T. Migrant populations and the incidence of type 1 diabetes mellitus: an overview of the literature with a focus on the Spanish-heritage countries in Latin America. *Diabetes/metabolism research and reviews* 1999; 15: 113–132.
- 71 Tull ES, Jordan OW, Simon L, Laws M, Smith DO, Vanterpool H, Butler C. Incidence of childhood-onset IDDM in black African-heritage populations in the Caribbean. The Caribbean African Heritage IDDM Study (CAHIS) Group. *Diabetes care* 1997; 20: 309–310.
- 72 Evaluation of epidemiology and immunogenetics of IDDM in Spanish- and Portuguese-heritage registries. A key to understanding the etiology of IDDM? *Diabetes Epidemiology Research International Group*. *Diabetes care* 1989; 12: 487–493.
- 73 Colle E, Lounamaa R, Tuomilehto J, de Beaufort, Balzano E, Bruno G, Cacciari E, Cerutti F, Chiarelli F, Chiumello G. The epidemiology and immunogenetics of IDDM in Italian-heritage populations. *Diabetes Epidemiology Research International (DERI) Study Group*. *Diabetes/metabolism reviews* 1990; 6: 63–69.
- 74 Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ (Clinical research ed.)* 1989; 299: 1259–1260.
- 75 Stiemsma LT, Reynolds LA, Turvey SE, Finlay BB. The hygiene hypothesis: current perspectives and future therapies. *ImmunoTargets and therapy* 2015; 4: 143–157.
- 76 Loke P, Lim YAL. Helminths and the microbiota: parts of the hygiene hypothesis. *Parasite immunology* 2015; 37: 314–323.
- 77 Gale EAM. A missing link in the hygiene hypothesis? *Diabetologia* 2002; 45: 588–594.
- 78 Bach J-F. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N. Engl. J. Med.* 2002; 347: 911–920.
- 79 Gulden E, Wong FS, Wen L. The gut microbiota and Type 1 Diabetes. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* 2015; 159: 143–153.
- 80 Li Y, Liu Y, Chu C-Q. Th17 Cells in Type 1 Diabetes: Role in the Pathogenesis and Regulation by Gut Microbiome. *Mediators of inflammation* 2015; 2015: 638470.
- 81 Vaarala O. Gut microbiota and type 1 diabetes. *The review of diabetic studies : RDS* 2012; 9: 251–259.
- 82 Zipris D. The interplay between the gut microbiota and the immune system in the mechanism of type 1 diabetes. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity* 2013; 20: 265–270.
- 83 Atarashi K, Tanoue T, Shima T, Imaoka A, Kuwahara T, Momose Y, Cheng G, Yamasaki S, Saito T, Ohba Y, Taniguchi T, Takeda K, Hori S, Ivanov II, Umesaki Y, Itoh K, Honda K. Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species. *Science (New York, N.Y.)* 2011; 331: 337–341.
- 84 Wen L, Ley RE, Volchkov PY, Stranges PB, Avanesyan L, Stonebraker AC, Hu C, Wong FS, Szot GL, Bluestone JA, Gordon JI, Chervonsky AV. Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes. *Nature* 2008; 455: 1109–1113.
- 85 Mejia-Leon ME, La Barca AMCd. Diet, Microbiota and Immune System in Type 1 Diabetes Development and Evolution. *Nutrients* 2015; 7: 9171–9184.

- 86 Brown K, Godovanyi A, Ma C, Zhang Y, Ahmadi-Vand Z, Dai C, Gorzelak MA, Chan Y, Chan JM, Lochner A, Dutz JP, Vallance BA, Gibson DL. Prolonged antibiotic treatment induces a diabetogenic intestinal microbiome that accelerates diabetes in NOD mice. *The ISME journal* 2016; 10: 321–332.
- 87 Candon S, Perez-Arroyo A, Marquet C, Valette F, Foray A-P, Pelletier B, Milani C, Ventura M, Bach J-F, Chatenoud L. Antibiotics in early life alter the gut microbiome and increase disease incidence in a spontaneous mouse model of autoimmune insulin-dependent diabetes. *PloS one* 2015; 10: e0125448.
- 88 Dolpady J, Sorini C, Di Pietro C, Cosorich I, Ferrarese R, Saita D, Clementi M, Canducci F, Falcone M. Oral Probiotic VSL#3 Prevents Autoimmune Diabetes by Modulating Microbiota and Promoting Indoleamine 2,3-Dioxygenase-Enriched Tolerogenic Intestinal Environment. *Journal of diabetes research* 2016; 2016: 7569431.
- 89 Calcinaro F, Dionisi S, Marinaro M, Candeloro P, Bonato V, Marzotti S, Corneli RB, Ferretti E, Gulino A, Grasso F, Simone C de, Di Mario U, Falorni A, Boirivant M, Dotta F. Oral probiotic administration induces interleukin-10 production and prevents spontaneous autoimmune diabetes in the non-obese diabetic mouse. *Diabetologia* 2005; 48: 1565–1575.
- 90 Rutayisire E, Huang K, Liu Y, Tao F. The mode of delivery affects the diversity and colonization pattern of the gut microbiota during the first year of infants' life: a systematic review. *BMC gastroenterology* 2016; 16: 86.
- 91 Neu J, Rushing J. Cesarean versus vaginal delivery: long-term infant outcomes and the hygiene hypothesis. *Clinics in perinatology* 2011; 38: 321–331.
- 92 Miniello VL, Colasanto A, Cristofori F, Diaferio L, Ficele L, Lieggi MS, Santoiemma V, Francavilla R. Gut microbiota biomodulators, when the stork comes by the scalp. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 2015; 451: 88–96.
- 93 Munyaka PM, Khafipour E, Ghia J-E. External influence of early childhood establishment of gut microbiota and subsequent health implications. *Frontiers in pediatrics* 2014; 2: 109.
- 94 Li M, Wang M, Donovan SM. Early development of the gut microbiome and immune-mediated childhood disorders. *Seminars in reproductive medicine* 2014; 32: 74–86.
- 95 Jost T, Lacroix C, Braegger C, Chassard C. Impact of human milk bacteria and oligosaccharides on neonatal gut microbiota establishment and gut health. *Nutrition reviews* 2015; 73: 426–437.
- 96 Jost T, Lacroix C, Braegger CP, Rochat F, Chassard C. Vertical mother-neonate transfer of maternal gut bacteria via breastfeeding. *Environmental microbiology* 2014; 16: 2891–2904.
- 97 Jost T, Lacroix C, Braegger C, Chassard C. Assessment of bacterial diversity in breast milk using culture-dependent and culture-independent approaches. *The British journal of nutrition* 2013; 110: 1253–1262.
- 98 Hunt KM, Foster JA, Forney LJ, Schutte UME, Beck DL, Abdo Z, Fox LK, Williams JE, McGuire MK, McGuire MA. Characterization of the diversity and temporal stability of bacterial communities in human milk. *PloS one* 2011; 6: e21313.

- 99 Chmiel R, Beyerlein A, Knopff A, Hummel S, Ziegler A-G, Winkler C. Early infant feeding and risk of developing islet autoimmunity and type 1 diabetes. *Acta diabetologica* 2015; 52: 621–624.
- 100 Ziegler A-G, Schmid S, Huber D, Hummel M, Bonifacio E. Early infant feeding and risk of developing type 1 diabetes-associated autoantibodies. *JAMA* 2003; 290: 1721–1728.
- 101 Norris JM, Barriga K, Klingensmith G, Hoffman M, Eisenbarth GS, Erlich HA, Rewers M. Timing of initial cereal exposure in infancy and risk of islet autoimmunity. *JAMA* 2003; 290: 1713–1720.
- 102 Akerblom HK, Virtanen SM, Ilonen J, Savilahti E, Vaarala O, Reunanen A, Teramo K, Hämäläinen A-M, Paronen J, Riikjäv M-A, Ormiston A, Ludvigsson J, Dosch H-M, Hakulinen T, Knip M. Dietary manipulation of beta cell autoimmunity in infants at increased risk of type 1 diabetes: a pilot study. *Diabetologia* 2005; 48: 829–837.
- 103 Knip M, Åkerblom HK, Becker D, Dosch H-M, Dupre J, Fraser W, Howard N, Ilonen J, Krischer JP, Kordonouri O, Lawson ML, Palmer JP, Savilahti E, Vaarala O, Virtanen SM. Hydrolyzed infant formula and early  $\beta$ -cell autoimmunity: a randomized clinical trial. *JAMA* 2014; 311: 2279–2287.
- 104 Hayes CE, Hubler SL, Moore JR, Barta LE, Praska CE, Nashold FE. Vitamin D Actions on CD4(+) T Cells in Autoimmune Disease. *Frontiers in immunology* 2015; 6: 100.
- 105 Saggese G, Federico G, Balestri M, Toniolo A. Calcitriol inhibits the PHA-induced production of IL-2 and IFN-gamma and the proliferation of human peripheral blood leukocytes while enhancing the surface expression of HLA class II molecules. *Journal of endocrinological investigation* 1989; 12: 329–335.
- 106 Mathieu C, Gysemans C, Giulietti A, Bouillon R. Vitamin D and diabetes. *Diabetologia* 2005; 48: 1247–1257.
- 107 Cantorna MT, Mahon BD. D-hormone and the immune system. *The Journal of rheumatology. Supplement* 2005; 76: 11–20.
- 108 Wolden-Kirk H, Overbergh L, Christesen HT, Brusgaard K, Mathieu C. Vitamin D and diabetes: its importance for beta cell and immune function. *Molecular and cellular endocrinology* 2011; 347: 106–120.
- 109 Dong J-Y, Zhang W-G, Chen JJ, Zhang Z-L, Han S-F, Qin L-Q. Vitamin D intake and risk of type 1 diabetes: a meta-analysis of observational studies. *Nutrients* 2013; 5: 3551–3562.
- 110 Hyponen E, Laara E, Reunanen A, Jarvelin MR, Virtanen SM. Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study. *Lancet (London, England)* 2001; 358: 1500–1503.
- 111 Vitamin D supplement in early childhood and risk for Type I (insulin-dependent) diabetes mellitus. The EURODIAB Substudy 2 Study Group. *Diabetologia* 1999; 42: 51–54.
- 112 Norris JM, Yin X, Lamb MM, Barriga K, Seifert J, Hoffman M, Orton HD, Barón AE, Clare-Salzler M, Chase HP, Szabo NJ, Erlich H, Eisenbarth GS, Rewers M. Omega-3 polyunsaturated fatty acid intake and islet autoimmunity in children at increased risk for type 1 diabetes. *JAMA* 2007; 298: 1420–1428.

- 113 Miller MR, Yin X, Seifert J, Clare-Salzler M, Eisenbarth GS, Rewers M, Norris JM. Erythrocyte membrane omega-3 fatty acid levels and omega-3 fatty acid intake are not associated with conversion to type 1 diabetes in children with islet autoimmunity: the Diabetes Autoimmunity Study in the Young (DAISY). *Pediatric diabetes* 2011; 12: 669–675.
- 114 Beyerlein A, Wehweck F, Ziegler A-G, Pflueger M. Respiratory infections in early life and the development of islet autoimmunity in children at increased type 1 diabetes risk: evidence from the BABYDIET study. *JAMA pediatrics* 2013; 167: 800–807.
- 115 Oikarinen M, Tauriainen S, Oikarinen S, Honkanen T, Collin P, Rantala I, Mäki M, Kaukinen K, Hyöty H. Type 1 diabetes is associated with enterovirus infection in gut mucosa. *Diabetes* 2012; 61: 687–691.
- 116 Tauriainen S, Oikarinen S, Oikarinen M, Hyöty H. Enteroviruses in the pathogenesis of type 1 diabetes. *Semin Immunopathol* 2011; 33: 45–55.
- 117 Oikarinen M, Tauriainen S, Honkanen T, Oikarinen S, Vuori K, Kaukinen K, Rantala I, Mäki M, Hyöty H. Detection of enteroviruses in the intestine of type 1 diabetic patients. *Clin. Exp. Immunol.* 2008; 151: 71–75.
- 118 Dotta F, Censini S, van Halteren AGS, Marselli L, Masini M, Dionisi S, Mosca F, Boggi U, Muda AO, Del Prato S, Elliott JF, Covacci A, Rappuoli R, Roep BO, Marchetti P. Coxsackie B4 virus infection of beta cells and natural killer cell insulinitis in recent-onset type 1 diabetic patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007; 104: 5115–5120.
- 119 Hyöty H. Enterovirus infections and type 1 diabetes. *Ann. Med.* 2002; 34: 138–147.
- 120 Bluestone JA, Herold K, Eisenbarth G. Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. *Nature* 2010; 464: 1293–1300.
- 121 Gepts W. Pathologic anatomy of the pancreas in juvenile diabetes mellitus. *Diabetes* 1965; 14: 619–633.
- 122 Pugliese A. Insulinitis in the pathogenesis of type 1 diabetes. *Pediatric diabetes* 2016; 17 Suppl 22: 31–36.
- 123 Voskoboinik I, Dunstone MA, Baran K, Whisstock JC, Trapani JA. Perforin: structure, function, and role in human immunopathology. *Immunol. Rev.* 2010; 235: 35–54.
- 124 Zhou F. Perforin: more than just a pore-forming protein. *Int. Rev. Immunol.* 2010; 29: 56–76.
- 125 Bolitho P, Voskoboinik I, Trapani JA, Smyth MJ. Apoptosis induced by the lymphocyte effector molecule perforin. *Curr. Opin. Immunol.* 2007; 19: 339–347.
- 126 Zhou F. Expression of multiple granzymes by cytotoxic T lymphocyte implies that they activate diverse apoptotic pathways in target cells. *Int. Rev. Immunol.* 2010; 29: 38–55.
- 127 Graham KL, Sutherland RM, Mannering SI, Zhao Y, Chee J, Krishnamurthy B, Thomas HE, Lew AM, Kay TWH. Pathogenic mechanisms in type 1 diabetes: the islet is both target and driver of disease. *Rev Diabet Stud* 2012; 9: 148–168.
- 128 McKenzie MD, Dudek NL, Mariana L, Chong MM, Trapani JA, Kay TW, Thomas HE. Perforin and Fas induced by IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$  mediate beta cell death by OT-I CTL. *Int. Immunol.* 2006; 18: 837–846.

- 129 Dudek NL, Thomas HE, Mariana L, Sutherland RM, Allison J, Estella E, Angstetra E, Trapani JA, Santamaria P, Lew AM, Kay TWH. Cytotoxic T-cells from T-cell receptor transgenic NOD8.3 mice destroy beta-cells via the perforin and Fas pathways. *Diabetes* 2006; 55: 2412–2418.
- 130 Kägi D, Odermatt B, Seiler P, Zinkernagel RM, Mak TW, Hengartner H. Reduced incidence and delayed onset of diabetes in perforin-deficient nonobese diabetic mice. *J. Exp. Med.* 1997; 186: 989–997.
- 131 Phillips JM, Parish NM, Raine T, Bland C, Sawyer Y, La Peña H de, Cooke A. Type 1 diabetes development requires both CD4+ and CD8+ T cells and can be reversed by non-depleting antibodies targeting both T cell populations. *Rev Diabet Stud* 2009; 6: 97–103.
- 132 Hedman M, Faresjö M, Axelsson S, Ludvigsson J, Casas R. Impaired CD4 and CD8 T cell phenotype and reduced chemokine secretion in recent-onset type 1 diabetic children. *Clin. Exp. Immunol.* 2008; 153: 360–368.
- 133 Jin Y, Chen X, Podolsky R, Hopkins D, Makala LHC, Muir A, She J-X. APC dysfunction is correlated with defective suppression of T cell proliferation in human type 1 diabetes. *Clin. Immunol.* 2009; 130: 272–279.
- 134 Chen X, Makala LHC, Jin Y, Hopkins D, Muir A, Garge N, Podolsky RH, She J-X. Type 1 diabetes patients have significantly lower frequency of plasmacytoid dendritic cells in the peripheral blood. *Clin. Immunol.* 2008; 129: 413–418.
- 135 Driver JP, Scheuplein F, Chen Y-G, Grier AE, Wilson SB, Serreze DV. Invariant natural killer T-cell control of type 1 diabetes: a dendritic cell genetic decision of a silver bullet or Russian roulette. *Diabetes* 2010; 59: 423–432.
- 136 Wong FS, Wen L. B cells in autoimmune diabetes. *Rev Diabet Stud* 2005; 2: 121–135.
- 137 Serreze DV, Silveira PA. The role of B lymphocytes as key antigen-presenting cells in the development of T cell-mediated autoimmune type 1 diabetes. *Curr. Dir. Autoimmun.* 2003; 6: 212–227.
- 138 Serreze DV, Fleming SA, Chapman HD, Richard SD, Leiter EH, Tisch RM. B lymphocytes are critical antigen-presenting cells for the initiation of T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J. Immunol.* 1998; 161: 3912–3918.
- 139 Jun HS, Yoon CS, Zbytniuk L, van Rooijen N, Yoon JW. The role of macrophages in T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J. Exp. Med.* 1999; 189: 347–358.
- 140 O'Brien BA, Geng X, Orteu CH, Huang Y, Ghoreishi M, Zhang Y, Bush JA, Li G, Finegood DT, Dutz JP. A deficiency in the in vivo clearance of apoptotic cells is a feature of the NOD mouse. *J. Autoimmun.* 2006; 26: 104–115.
- 141 Willcox A, Richardson SJ, Bone AJ, Foulis AK, Morgan NG. Analysis of islet inflammation in human type 1 diabetes. *Clin. Exp. Immunol.* 2009; 155: 173–181.
- 142 Pearl-Yafe M, Kaminitz A, Yolcu ES, Yaniv I, Stein J, Askenasy N. Pancreatic islets under attack: cellular and molecular effectors. *Current pharmaceutical design* 2007; 13: 749–760.

- 143 Nakayama M, Nagata M, Yasuda H, Arisawa K, Kotani R, Yamada K, Chowdhury SA, Chakrabarty S, Jin ZZ, Yagita H, Yokono K, Kasuga M. Fas/Fas ligand interactions play an essential role in the initiation of murine autoimmune diabetes. *Diabetes* 2002; 51: 1391–1397.
- 144 Uno S, Imagawa A, Okita K, Sayama K, Moriwaki M, Iwahashi H, Yamagata K, Tamura S, Matsuzawa Y, Hanafusa T, Miyagawa J, Shimomura I. Macrophages and dendritic cells infiltrating islets with or without beta cells produce tumour necrosis factor-alpha in patients with recent-onset type 1 diabetes. *Diabetologia* 2007; 50: 596–601.
- 145 Yoon JW, Jun HS. Cellular and molecular pathogenic mechanisms of insulin-dependent diabetes mellitus. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2001; 928: 200–211.
- 146 Meyenburg M von. Ueber “Insulitis” bei Diabetes. *Schweiz Med Wochenschr.* 1940: 554–557.
- 147 Ziegler A-G, Nepom GT. Prediction and pathogenesis in type 1 diabetes. *Immunity* 2010; 32: 468–478.
- 148 Palmer JP, Asplin CM, Clemons P, Lyen K, Tatpati O, Raghu PK, Paquette TL. Insulin antibodies in insulin-dependent diabetics before insulin treatment. *Science* 1983; 222: 1337–1339.
- 149 Baekkeskov S, Aanstoot HJ, Christgau S, Reetz A, Solimena M, Cascalho M, Folli F, Richter-Olesen H, Camilli P de, Camilli PD. Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature* 1990; 347: 151–156.
- 150 Rabin DU, Pleasic SM, Shapiro JA, Yoo-Warren H, Oles J, Hicks JM, Goldstein DE, Rae PM. Islet cell antigen 512 is a diabetes-specific islet autoantigen related to protein tyrosine phosphatases. *J. Immunol.* 1994; 152: 3183–3188.
- 151 Lu J, Li Q, Xie H, Chen ZJ, Borovitskaya AE, Maclaren NK, Notkins AL, Lan MS. Identification of a second transmembrane protein tyrosine phosphatase, IA-2beta, as an autoantigen in insulin-dependent diabetes mellitus: precursor of the 37-kDa tryptic fragment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1996; 93: 2307–2311.
- 152 Wenzlau JM, Juhl K, Yu L, Moua O, Sarkar SA, Gottlieb P, Rewers M, Eisenbarth GS, Jensen J, Davidson HW, Hutton JC. The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007; 104: 17040–17045.
- 153 Colman PG, Steele C, Couper JJ, Beresford SJ, Powell T, Kewming K, Pollard A, Gellert S, Tait B, Honeyman M, Harrison LC. Islet autoimmunity in infants with a Type I diabetic relative is common but is frequently restricted to one autoantibody. *Diabetologia* 2000; 43: 203–209.
- 154 Herold KC, Brooks-Worrell B, Palmer J, Dosch HM, Peakman M, Gottlieb P, Reijonen H, Arif S, Spain LM, Thompson C, Lachin JM. Validity and reproducibility of measurement of islet autoreactivity by T-cell assays in subjects with early type 1 diabetes. *Diabetes* 2009; 58: 2588–2595.
- 155 Atkinson M, Honeyman M, Peakman M, Roep B. T-cell markers in type I diabetes: progress, prospects and realistic expectations. *Diabetologia* 2000; 43: 819–820.

- 156 Faria AMC, Weiner HL. Oral tolerance: therapeutic implications for autoimmune diseases. *Clinical & developmental immunology* 2006; 13: 143–157.
- 157 Worbs T, Bode U, Yan S, Hoffmann MW, Hintzen G, Bernhardt G, Forster R, Pabst O. Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* 2006; 203: 519–527.
- 158 Niedergang F, Kweon M-N. New trends in antigen uptake in the gut mucosa. *Trends in microbiology* 2005; 13: 485–490.
- 159 Alpan O, Rudomen G, Matzinger P. The role of dendritic cells, B cells, and M cells in gut-oriented immune responses. *J. Immunol.* 2001; 166: 4843–4852.
- 160 Iwasaki A, Kelsall BL. Freshly isolated Peyer's patch, but not spleen, dendritic cells produce interleukin 10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells. *J. Exp. Med.* 1999; 190: 229–239.
- 161 Brandtzaeg P. Development and basic mechanisms of human gut immunity. *Nutrition reviews* 1998; 56: S5-18.
- 162 Wolvers DA, Coenen-de Roo CJ, Mebius RE, van der Cammen MJ, Tirion F, Miltenburg AM, Kraal G. Intranasally induced immunological tolerance is determined by characteristics of the draining lymph nodes: studies with OVA and human cartilage gp-39. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 1999; 162: 1994–1998.
- 163 Kelsall BL, Leon F. Involvement of intestinal dendritic cells in oral tolerance, immunity to pathogens, and inflammatory bowel disease. *Immunological reviews* 2005; 206: 132–148.
- 164 Sato A, Iwasaki A. Peyer's patch dendritic cells as regulators of mucosal adaptive immunity. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2005; 62: 1333–1338.
- 165 MacPherson G, Milling S, Yrlid U, Cousins L, Turnbull E, Huang F-P. Uptake of antigens from the intestine by dendritic cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2004; 1029: 75–82.
- 166 Shiokawa A, Tanabe K, Tsuji NM, Sato R, Hachimura S. IL-10 and IL-27 producing dendritic cells capable of enhancing IL-10 production of T cells are induced in oral tolerance. *Immunology letters* 2009; 125: 7–14.
- 167 Weiner HL, da Cunha AP, Quintana F, Wu H. Oral tolerance. *Immunological reviews* 2011; 241: 241–259.
- 168 Weiner HL. Oral tolerance, an active immunologic process mediated by multiple mechanisms. *J. Clin. Invest.* 2000; 106: 935–937.
- 169 Pham MN, Gibson C, Ryden AKE, Perdue N, Boursalian TE, Pagni PP, Coppieters K, Skonberg C, Porsgaard T, Herrath M von, Vela JL. Oral insulin (human, murine, or porcine) does not prevent diabetes in the non-obese diabetic mouse. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* 2016; 164: 28–33.
- 170 Newman SP, Steed KP, Hardy JG, Wilding IR, Hooper G, Sparrow RA. The distribution of an intranasal insulin formulation in healthy volunteers: effect of different administration techniques. *J. Pharm. Pharmacol.* 1994; 46: 657–660.

- 171 Taams LS, van Rensen AJ, Poelen MC, van Els CA, Besseling AC, Wagenaar JP, van Eden W, Wauben MH. Anergic T cells actively suppress T cell responses via the antigen-presenting cell. *European journal of immunology* 1998; 28: 2902–2912.
- 172 Rocha B, Tanchot C, Boehmer H von. Clonal anergy blocks in vivo growth of mature T cells and can be reversed in the absence of antigen. *J. Exp. Med.* 1993; 177: 1517–1521.
- 173 Hanninen A. Prevention of autoimmune type 1 diabetes via mucosal tolerance: is mucosal autoantigen administration as safe and effective as it should be? *Scandinavian journal of immunology* 2000; 52: 217–225.
- 174 Faria AMC, Weiner HL. Oral tolerance. *Immunological reviews* 2005; 206: 232–259.
- 175 Boehmer H von. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nature immunology* 2005; 6: 338–344.
- 176 Roncarolo MG, Levings MK. The role of different subsets of T regulatory cells in controlling autoimmunity. *Curr. Opin. Immunol.* 2000; 12: 676–683.
- 177 Shevach EM. From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. *Immunity* 2006; 25: 195–201.
- 178 Maron R, Melican NS, Weiner HL. Regulatory Th2-type T cell lines against insulin and GAD peptides derived from orally- and nasally-treated NOD mice suppress diabetes. *Journal of autoimmunity* 1999; 12: 251–258.
- 179 Stockinger B, Barthlott T, Kassiotis G. T cell regulation: a special job or everyone's responsibility? *Nature immunology* 2001; 2: 757–758.
- 180 Weiner HL. Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells. *Microbes and infection* 2001; 3: 947–954.
- 181 Tisch R, Wang B, Serreze DV. Induction of glutamic acid decarboxylase 65-specific Th2 cells and suppression of autoimmune diabetes at late stages of disease is epitope dependent. *J. Immunol.* 1999; 163: 1178–1187.
- 182 Shoda LKM, Young DL, Ramanujan S, Whiting CC, Atkinson MA, Bluestone JA, Eisenbarth GS, Mathis D, Rossini AA, Campbell SE, Kahn R, Kreuwel HTC. A comprehensive review of interventions in the NOD mouse and implications for translation. *Immunity* 2005; 23: 115–126.
- 183 Monetini L, Cavallo MG, Sarugeri E, Sentinelli F, Stefanini L, Bosi E, Thorpe R, Pozzilli P. Cytokine profile and insulin antibody IgG subclasses in patients with recent onset type 1 diabetes treated with oral insulin. *Diabetologia* 2004; 47: 1795–1802.
- 184 Fourlanos S, Perry C, Gellert SA, Martinuzzi E, Mallone R, Butler J, Colman PG, Harrison LC. Evidence that nasal insulin induces immune tolerance to insulin in adults with autoimmune diabetes. *Diabetes* 2011; 60: 1237–1245.
- 185 Ergun-Longmire B, Marker J, Zeidler A, Rapaport R, Raskin P, Bode B, Schatz D, Vargas A, Rogers D, Schwartz S, Malone J, Krischer J, Maclaren NK. Oral insulin therapy to prevent progression of immune-mediated (type 1) diabetes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2004; 1029: 260–277.

- 186 Leary AC, Dowling M, Cussen K, O'Brien J, Stote RM. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of intranasal insulin spray (Nasulin) administered to healthy male volunteers: influence of the nasal cycle. *J Diabetes Sci Technol* 2008; 2: 1054–1060.
- 187 Haruta S, Hanafusa T, Fukase H, Miyajima H, Oki T. An effective absorption behavior of insulin for diabetic treatment following intranasal delivery using porous spherical calcium carbonate in monkeys and healthy human volunteers. *Diabetes Technol. Ther.* 2003; 5: 1–9.
- 188 Drejer K, Vaag A, Bech K, Hansen P, Sørensen AR, Mygind N. Intranasal administration of insulin with phospholipid as absorption enhancer: pharmacokinetics in normal subjects. *Diabet. Med.* 1992; 9: 335–340.
- 189 Paquot N, Scheen AJ, Franchimont P, Lefebvre PJ. The intra-nasal administration of insulin induces significant hypoglycaemia and classical counterregulatory hormonal responses in normal man. *Diabete Metab* 1988; 14: 31–36.
- 190 Moses AC, Gordon GS, Carey MC, Flier JS. Insulin administered intranasally as an insulin-bile salt aerosol. Effectiveness and reproducibility in normal and diabetic subjects. *Diabetes* 1983; 32: 1040–1047.
- 191 Sinay IR, Schlimovich S, Damilano S, Cagide AL, Faingold MC, Facco EB, Gurfinkiel MS, Arias P. Intranasal insulin administration in insulin dependent diabetes: reproducibility of its absorption and effects. *Horm. Metab. Res.* 1990; 22: 307–308.
- 192 Salzman R, Manson JE, Griffing GT, Kimmerle R, Ruderman N, McCall A, Stoltz EI, Mullin C, Small D, Armstrong J. Intranasal aerosolized insulin. Mixed-meal studies and long-term use in type I diabetes. *N. Engl. J. Med.* 1985; 312: 1078–1084.
- 193 Pontiroli AE, Alberetto M, Secchi A, Dossi G, Bosi I, Pozza G. Insulin given intranasally induces hypoglycaemia in normal and diabetic subjects. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1982; 284: 303–306.
- 194 Shah RB, Patel M, Maahs DM, Shah VN. Insulin delivery methods: Past, present and future. *International journal of pharmaceutical investigation* 2016; 6: 1–9.
- 195 Hinchcliffe, Illum. Intranasal insulin delivery and therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1999; 35: 199–234.
- 196 Sara VR, Hall K, Holtz H von, Humbel R, Sjögren B, Wetterberg L. Evidence for the presence of specific receptors for insulin-like growth factors 1 (IGF-1) and 2 (IGF-2) and insulin throughout the adult human brain. *Neurosci. Lett.* 1982; 34: 39–44.
- 197 Begg DP. Insulin transport into the brain and cerebrospinal fluid. *Vitamins and hormones* 2015; 98: 229–248.
- 198 Woods SC, Seeley RJ, Baskin DG, Schwartz MW. Insulin and the blood-brain barrier. *Curr. Pharm. Des.* 2003; 9: 795–800.
- 199 Unger JW, Livingston JN, Moss AM. Insulin receptors in the central nervous system: localization, signalling mechanisms and functional aspects. *Prog. Neurobiol.* 1991; 36: 343–362.

- 200 Schwartz MW, Sipols A, Kahn SE, Lattemann DF, Taborsky GJ, Bergman RN, Woods SC, Porte D. Kinetics and specificity of insulin uptake from plasma into cerebrospinal fluid. *Am. J. Physiol.* 1990; 259: E378-83.
- 201 Mittal D, Ali A, Md S, Baboota S, Sahni JK, Ali J. Insights into direct nose to brain delivery: current status and future perspective. *Drug delivery* 2014; 21: 75–86.
- 202 Dhuria SV, Hanson LR, Frey WH2. Intranasal delivery to the central nervous system: mechanisms and experimental considerations. *Journal of pharmaceutical sciences* 2010; 99: 1654–1673.
- 203 Lee S-H, Zabolotny JM, Huang H, Lee H, Kim Y-B. Insulin in the nervous system and the mind: Functions in metabolism, memory, and mood. *Molecular metabolism* 2016; 5: 589–601.
- 204 Banks WA. Blood-brain barrier and energy balance. *Obesity (Silver Spring, Md.)* 2006; 14 Suppl 5: 234S-237S.
- 205 Benedict C, Brede S, Schiöth HB, Lehnert H, Schultes B, Born J, Hallschmid M. Intranasal insulin enhances postprandial thermogenesis and lowers postprandial serum insulin levels in healthy men. *Diabetes* 2011; 60: 114–118.
- 206 Heni M, Kullmann S, Ketterer C, Guthoff M, Linder K, Wagner R, Stingl KT, Veit R, Staiger H, Häring H-U, Preissl H, Fritsche A. Nasal insulin changes peripheral insulin sensitivity simultaneously with altered activity in homeostatic and reward-related human brain regions. *Diabetologia* 2012; 55: 1773–1782.
- 207 Edgerton DS, Cherrington AD. Is brain insulin action relevant to the control of plasma glucose in humans? *Diabetes* 2015; 64: 696–699.
- 208 Carey M, Kehlenbrink S, Hawkins M. Evidence for central regulation of glucose metabolism. *The Journal of biological chemistry* 2013; 288: 34981–34988.
- 209 Pocai A, Lam TKT, Gutierrez-Juarez R, Obici S, Schwartz GJ, Bryan J, Aguilar-Bryan L, Rossetti L. Hypothalamic K(ATP) channels control hepatic glucose production. *Nature* 2005; 434: 1026–1031.
- 210 Obici S, Zhang BB, Karkanias G, Rossetti L. Hypothalamic insulin signaling is required for inhibition of glucose production. *Nat. Med.* 2002; 8: 1376–1382.
- 211 Ott V, Lehnert H, Staub J, Wonne K, Born J, Hallschmid M. Central nervous insulin administration does not potentiate the acute glucoregulatory impact of concurrent mild hyperinsulinemia. *Diabetes* 2015; 64: 760–765.
- 212 Begg DP, Woods SC. The central insulin system and energy balance. *Handbook of experimental pharmacology* 2012: 111–129.
- 213 Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature* 2000; 404: 661–671.
- 214 Benedict C, Kern W, Schultes B, Born J, Hallschmid M. Differential sensitivity of men and women to anorexigenic and memory-improving effects of intranasal insulin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2008; 93: 1339–1344.
- 215 Hallschmid M, Benedict C, Schultes B, Fehm H-L, Born J, Kern W. Intranasal insulin reduces body fat in men but not in women. *Diabetes* 2004; 53: 3024–3029.

- 216 Benedict C, Hallschmid M, Hatke A, Schultes B, Fehm HL, Born J, Kern W. Intranasal insulin improves memory in humans. *Psychoneuroendocrinology* 2004; 29: 1326–1334.
- 217 Benedict C, Hallschmid M, Schultes B, Born J, Kern W. Intranasal insulin to improve memory function in humans. *Neuroendocrinology* 2007; 86: 136–142.
- 218 Freiherr J, Hallschmid M, Frey WH2, Brunner YF, Chapman CD, Holscher C, Craft S, Felice FG de, Benedict C. Intranasal insulin as a treatment for Alzheimer's disease: a review of basic research and clinical evidence. *CNS drugs* 2013; 27: 505–514.
- 219 Benedict C, Frey WH2, Schioth HB, Schultes B, Born J, Hallschmid M. Intranasal insulin as a therapeutic option in the treatment of cognitive impairments. *Experimental gerontology* 2011; 46: 112–115.
- 220 Schioth HB, Craft S, Brooks SJ, Frey WH2, Benedict C. Brain insulin signaling and Alzheimer's disease: current evidence and future directions. *Molecular neurobiology* 2012; 46: 4–10.
- 221 Talbot K, Wang H-Y, Kazi H, Han L-Y, Bakshi KP, Stucky A, Fuino RL, Kawaguchi KR, Samoyedny AJ, Wilson RS, Arvanitakis Z, Schneider JA, Wolf BA, Bennett DA, Trojanowski JQ, Arnold SE. Demonstrated brain insulin resistance in Alzheimer's disease patients is associated with IGF-1 resistance, IRS-1 dysregulation, and cognitive decline. *J. Clin. Invest.* 2012; 122: 1316–1338.
- 222 Hallschmid M, Schultes B. Central nervous insulin resistance: a promising target in the treatment of metabolic and cognitive disorders? *Diabetologia* 2009; 52: 2264–2269.
- 223 Anthony K, Reed LJ, Dunn JT, Bingham E, Hopkins D, Marsden PK, Amiel SA. Attenuation of insulin-evoked responses in brain networks controlling appetite and reward in insulin resistance: the cerebral basis for impaired control of food intake in metabolic syndrome? *Diabetes* 2006; 55: 2986–2992.
- 224 Tschritter O, Preissl H, Hennige AM, Stumvoll M, Porubská K, Frost R, Marx H, Klösel B, Lutzenberger W, Birbaumer N, Häring H-U, Fritsche A. The cerebrocortical response to hyperinsulinemia is reduced in overweight humans: a magnetoencephalographic study. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006; 103: 12103–12108.
- 225 Phillips M, Herrera J, Krishnan S, Zain M, Greenberg J, Cataneo RNKTKC-MSKKC. Variation in volatile organic compounds in the breath of normal humans. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 1999; 729: 75–88.
- 226 Fenske JD, Paulson SE. Human breath emissions of VOCs. *Journal of the Air & Waste Management Association* (1995) 1999; 49: 594–598.
- 227 West JB, Mathieu-Costello OKKK-ABKKKC. Strength of the pulmonary blood-gas barrier. *Respir Physiol* 1992; 88: 141–148.
- 228 Minh TDC, Blake DR, Galassetti PR. The clinical potential of exhaled breath analysis for diabetes mellitus. *Diabetes research and clinical practice* 2012; 97: 195–205.
- 229 Miekisch W, Schubert JK, Noeldge-Schomburg GFE. Diagnostic potential of breath analysis--focus on volatile organic compounds. *Clin. Chim. Acta* 2004; 347: 25–39.

- 230 Pleil JD, Stiegel MA, Risby TH. Clinical breath analysis: discriminating between human endogenous compounds and exogenous (environmental) chemical confounders. *Journal of breath research* 2013; 7: 17107.
- 231 Das S, Pal S, Mitra M. Significance of Exhaled Breath Test in Clinical Diagnosis: A Special Focus on the Detection of Diabetes Mellitus. *Journal of medical and biological engineering* 2016; 36: 605–624.
- 232 Lourenco C, Turner C. Breath analysis in disease diagnosis: methodological considerations and applications. *Metabolites* 2014; 4: 465–498.
- 233 Pauling L, Robinson AB, Teranishi R, Cary P. Quantitative analysis of urine vapor and breath by gas-liquid partition chromatography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1971; 68: 2374–2376.
- 234 Manolis A. The diagnostic potential of breath analysis. *Clinical chemistry* 1983; 29: 5–15.
- 235 Pereira J, Porto-Figueira P, Cavaco C, Taunk K, Rapole S, Dhakne R, Nagarajaram H, Camara JS. Breath analysis as a potential and non-invasive frontier in disease diagnosis: an overview. *Metabolites* 2015; 5: 3–55.
- 236 Kistler M, Szymczak W, Fedrigo M, Fiamoncini J, Hollriegel V, Hoeschen C, Klingenspor M, Hrabe de Angelis M, Rozman J. Effects of diet-matrix on volatile organic compounds in breath in diet-induced obese mice. *Journal of breath research* 2014; 8: 16004.
- 237 Taucher J, Hansel A, Jordan A, Fall R, Futrell JH, Lindinger W. Detection of isoprene in expired air from human subjects using proton-transfer-reaction mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM* 1997; 11: 1230–1234.
- 238 Wilson HK. Breath analysis. Physiological basis and sampling techniques. *Scandinavian journal of work, environment & health* 1986; 12: 174–192.
- 239 King J, Koc H, Unterkofler K, Mochalski P, Kupferthaler A, Teschl G, Teschl S, Hinterhuber H, Amann A. Physiological modeling of isoprene dynamics in exhaled breath. *Journal of theoretical biology* 2010; 267: 626–637.
- 240 Pabst F, Miekisch W, Fuchs P, Kischkel S, Schubert JK. Monitoring of oxidative and metabolic stress during cardiac surgery by means of breath biomarkers: an observational study. *Journal of cardiothoracic surgery* 2007; 2: 37.
- 241 Schubert R, Schwoebel H, Mau-Moeller A, Behrens M, Fuchs P, Sklorz M, Schubert JK, Bruhn S, Miekisch W. Metabolic monitoring and assessment of anaerobic threshold by means of breath biomarkers. *Metabolomics* 2012; 8: 1069–1080.
- 242 Herbig J, Titzmann T, Beauchamp J, Kohl I, Hansel A. Buffered end-tidal (BET) sampling-a novel method for real-time breath-gas analysis. *Journal of breath research* 2008; 2: 37008.
- 243 Spanel P, Dryahina K, Smith D. A quantitative study of the influence of inhaled compounds on their concentrations in exhaled breath. *Journal of breath research* 2013; 7: 17106.
- 244 Leopold JH, van Hooijdonk RTM, Sterk PJ, Abu-Hanna A, Schultz MJ, Bos LDJ. Glucose prediction by analysis of exhaled metabolites - a systematic review. *BMC anesthesiology* 2014; 14: 46.

- 245 Yan K, Zhang D, Wu D, Wei H, Lu G. Design of a breath analysis system for diabetes screening and blood glucose level prediction. *IEEE transactions on bio-medical engineering* 2014; 61: 2787–2795.
- 246 Turner C. Potential of breath and skin analysis for monitoring blood glucose concentration in diabetes. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2011; 11: 497–503.
- 247 Girardin CM, Huot C, Gonthier M, Delvin E. Continuous glucose monitoring: a review of biochemical perspectives and clinical use in type 1 diabetes. *Clinical biochemistry* 2009; 42: 136–142.
- 248 Turner C, Parekh B, Walton C, Spanel P, Smith D, Evans M. 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.* 2008; 22: 526–532.
- 249 Galassetti PR, Novak B, Nemet D, Rose-Gottron C, Cooper DM, Meinardi S, Newcomb R, Zaldivar F, Blake DR. Breath ethanol and acetone as indicators of serum glucose levels: an initial report. *Diabetes Technol. Ther.* 2005; 7: 115–123.
- 250 Keller U, Lustenberger M, Stauffacher W. Effect of insulin on ketone body clearance studied by a ketone body "clamp" technique in normal man. *Diabetologia* 1988; 31: 24–29.
- 251 Rydosz A. A Negative Correlation Between Blood Glucose and Acetone Measured in Healthy and Type 1 Diabetes Mellitus Patient Breath. *Journal of diabetes science and technology* 2015; 9: 881–884.
- 252 Spanel P, Dryahina K, Rejskova A, Chippendale TWE, Smith D. Breath acetone concentration; biological variability and the influence of diet. *Physiological measurement* 2011; 32: N23-31.
- 253 Novak BJ, Blake DR, Meinardi S, Rowland FS, Pontello A, Cooper DM, Galassetti PR. Exhaled methyl nitrate as a noninvasive marker of hyperglycemia in type 1 diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007; 104: 15613–15618.
- 254 Minh TDC, Oliver SR, Ngo J, Flores R, Midyett J, Meinardi S, Carlson MK, Rowland FS, Blake DR, Galassetti PR. Noninvasive measurement of plasma glucose from exhaled breath in healthy and type 1 diabetic subjects. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2011; 300: E1166-75.
- 255 Dorokhov YL, Shindyapina AV, Sheshukova EV, Komarova TV. Metabolic methanol: molecular pathways and physiological roles. *Physiological reviews* 2015; 95: 603–644.
- 256 Cope K, Risby T, Diehl AM. Increased gastrointestinal ethanol production in obese mice: implications for fatty liver disease pathogenesis. *Gastroenterology* 2000; 119: 1340–1347.
- 257 Paredi P, Biernacki W, Invernizzi G, Kharitonov SA, Barnes PJ. Exhaled carbon monoxide levels elevated in diabetes and correlated with glucose concentration in blood: a new test for monitoring the disease? *Chest* 1999; 116: 1007–1011.
- 258 Lee J, Ngo J, Blake D, Meinardi S, Pontello AM, Newcomb R, Galassetti PR. Improved predictive models for plasma glucose estimation from multi-linear regression analysis of exhaled volatile organic compounds. *J. Appl. Physiol.* 2009; 107: 155–160.
- 259 Hansel A, Jordan A, Holzinger R, Prazeller P, Vogel W, Lindinger W. Proton transfer reaction mass spectrometry. On-line trace gas analysis at the ppb level. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* 1995; 149-150: 609–619.

- 260 Hayward S, Hewitt CN, Sartin JH, Owen SM. Performance characteristics and applications of a proton transfer reaction-mass spectrometer for measuring volatile organic compounds in ambient air. *Environmental science & technology* 2002; 36: 1554–1560.
- 261 Hansel A, Jordan A, Warneke C, Holzinger R, Wisthaler A, Lindinger W. Proton-transfer-reaction mass spectrometry (PTR-MS): on-line monitoring of volatile organic compounds at volume mixing ratios of a few pptv. *Plasma Sources Science and Technology* 1999; 8: 332.
- 262 Zhan X, Duan J, Duan Y. Recent developments of proton-transfer reaction mass spectrometry (PTR-MS) and its applications in medical research. *Mass spectrometry reviews* 2013; 32: 143–165.
- 263 Jordan A, Haidacher S, Hanel G, Hartungen E, Herbig J, Märk L, Schottkowsky R, Seehauser H, Sulzer P, Märk TD. An online ultra-high sensitivity Proton-transfer-reaction mass-spectrometer combined with switchable reagent ion capability (PTR+SRI-MS). *International Journal of Mass Spectrometry* 2009; 286: 32–38.
- 264 Ellis AM, Mayhew CA. *Proton Transfer Reaction Mass Spectrometry*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK 2014: 17.
- 265 Hunter EPL, Lias SG. Evaluated Gas Phase Basicities and Proton Affinities of Molecules. An Update. *Journal of Physical and Chemical Reference Data* 1998; 27: 413–656.
- 266 Munson MSB, Field FH. *Chemical Ionization Mass Spectrometry. I. General Introduction*. J. Am. Chem. Soc. 1966; 88: 2621–2630.
- 267 Schwarz K, Filipiak W, Amann A. Determining concentration patterns of volatile compounds in exhaled breath by PTR-MS. *Journal of breath research* 2009; 3: 27002.
- 268 Ellis AM, Mayhew CA. *Proton Transfer Reaction Mass Spectrometry*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK 2014: 81ff.
- 269 Ellis AM, Mayhew CA. *Proton Transfer Reaction Mass Spectrometry*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK 2014: 81.
- 270 Taipale R, Ruuskanen TM, Rinne J, Kajos MK, Hakola H, Pohja T, Kulmala M. Technical Note. Quantitative long-term measurements of VOC concentrations by PTR-MS &ndash; measurement, calibration, and volume mixing ratio calculation methods. *Atmos. Chem. Phys.* 2008; 8: 6681–6698.
- 271 Ellis AM, Mayhew CA. *Proton Transfer Reaction Mass Spectrometry*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK 2014: 79f.
- 272 Miekisch W, Kischkel S, Sawacki A, Liebau T, Mieth M, Schubert JK. Impact of sampling procedures on the results of breath analysis. *Journal of breath research* 2008; 2: 26007.
- 273 Smith D, Spanel P, Herbig J, Beauchamp J. Mass spectrometry for real-time quantitative breath analysis. *Journal of breath research* 2014; 8: 27101.
- 274 Herbig J, Muller M, Schallhart S, Titzmann T, Graus M, Hansel A. On-line breath analysis with PTR-TOF. *Journal of breath research* 2009; 3: 27004.
- 275 Halbritter S, Fedrigo M, Hollriegl V, Szymczak W, Maier JM, Ziegler A-G, Hummel M. Human breath gas analysis in the screening of gestational diabetes mellitus. *Diabetes technology & therapeutics* 2012; 14: 917–925.

- 276 Keller S. Fraktionierte Analyse von VOC's in der Ausatemluft mittels Protonen-Transfer-Reaktion Massenspektrometrie [Unveröffentlichte Bachelorarbeit], Fakultät für Mechatronik und Medizintechnik der Hochschule Ulm, Ulm 2012.
- 277 Ellis AM, Mayhew CA. Proton Transfer Reaction Mass Spectrometry. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK 2014: 269.
- 278 Phillips M, Greenberg J, Sabas M. Alveolar gradient of pentane in normal human breath. Free radical research 1994; 20: 333–337.
- 279 Tai MM. A mathematical model for the determination of total area under glucose tolerance and other metabolic curves. Diabetes care 1994; 17: 152–154.
- 280 Backhaus K, Erichson B, Plinke W, Weiber R. Multivariate Analysemethoden. Eine anwendungsorientierte Einführung. 13 Springer-Verlag Berlin and Heidelberg GmbH & Co. KG, Berlin 2010: 329ff.
- 281 Backhaus K, Erichson B, Plinke W, Weiber R. Multivariate Analysemethoden. Eine anwendungsorientierte Einführung. 13 Springer-Verlag Berlin and Heidelberg GmbH & Co. KG, Berlin 2010: 359.
- 282 Shaham O, Wei R, Wang TJ, Ricciardi C, Lewis GD, Vasan RS, Carr SA, Thadhani R, Gerszten RE, Mootha VK. Metabolic profiling of the human response to a glucose challenge reveals distinct axes of insulin sensitivity.
- 283 Righettoni M, Schmid A, Amann A, Pratsinis SE. Correlations between blood glucose and breath components from portable gas sensors and PTR-TOF-MS. Journal of breath research 2013; 7: 37110.
- 284 Turner C, Spanel P, Smith D. A longitudinal study of ammonia, acetone and propanol in the exhaled breath of 30 subjects using selected ion flow tube mass spectrometry, SIFT-MS. Physiol Meas 2006; 27: 321–337.
- 285 Shindyapina AV, Petrunia IV, Komarova TV, Sheshukova EV, Kosorukov VS, Kiryanov GI, Dorokhov YL. Dietary methanol regulates human gene activity. PloS one 2014; 9: e102837.
- 286 Lund ED, Kirkland CL, Shaw PE. Methanol, ethanol and acetaldehyde contents of citrus products. J. Agric. Food Chem 1981; 29: 361–366.
- 287 Farneti B, Cristescu SM, Costa G, Harren FJM, Woltering EJ. Rapid tomato volatile profiling by using proton-transfer reaction mass spectrometry (PTR-MS). Journal of food science 2012; 77: C551-9.
- 288 Dorokhov YL, Komarova TV, Petrunia IV, Kosorukov VS, Zinovkin RA, Shindyapina AV, Frolova OY, Gleba YY. Methanol may function as a cross-kingdom signal. PloS one 2012; 7: e36122.
- 289 Lindinger W, Taucher J, Jordan A, Hansel A, Vogel W. Endogenous production of methanol after the consumption of fruit. Alcoholism, clinical and experimental research 1997; 21: 939–943.
- 290 Taucher J, Lagg A, Hansel A, Vogel W, Lindinger W. Methanol in human breath. Alcoholism, clinical and experimental research 1995; 19: 1147–1150.

- 291 Siragusa RJ, Cerda JJ, Baig MM, Burgin CW, Robbins FL. Methanol production from the degradation of pectin by human colonic bacteria. *The American journal of clinical nutrition* 1988; 47: 848–851.
- 292 Bunge M, Araghipour N, Mikoviny T, Dunkl J, Schnitzhofer R, Hansel A, Schinner F, Wisthaler A, Margesin R, Mark TD. On-line monitoring of microbial volatile metabolites by proton transfer reaction-mass spectrometry. *Applied and environmental microbiology* 2008; 74: 2179–2186.
- 293 Mayr D, Margesin R, Klingsbichel E, Hartungen E, Jenewein D, Schinner F, Mark TD. Rapid detection of meat spoilage by measuring volatile organic compounds by using proton transfer reaction mass spectrometry. *Applied and environmental microbiology* 2003; 69: 4697–4705.
- 294 Davoli E, Cappellini L, Airoidi L, Fanelli R. Serum methanol concentrations in rats and in men after a single dose of aspartame. *Food and Chemical Toxicology* 1986; 24: 187–189.
- 295 Stegink LD, Brummel MC, McMartin K, Martin-Amat G, Filer LJ, JR, Baker GL, Tephly TR. Blood methanol concentrations in normal adult subjects administered abuse doses of aspartame. *Journal of toxicology and environmental health* 1981; 7: 281–290.
- 296 Schade DS, Woodside W, Eaton RP. The role of glucagon in the regulation of plasma lipids. *Metabolism: clinical and experimental* 1979; 28: 874–886.
- 297 Koc H, King J, Teschl G, Unterkofler K, Teschl S, Mochalski P, Hinterhuber H, Amann A. The role of mathematical modeling in VOC analysis using isoprene as a prototypic example. *Journal of breath research* 2011; 5: 37102.
- 298 Salerno-Kennedy R, Cashman KD. Potential applications of breath isoprene as a biomarker in modern medicine: a concise overview. *Wiener klinische Wochenschrift* 2005; 117: 180–186.
- 299 Hyspler R, Crhova S, Gasparic J, Zadak Z, Cizkova M, Balasova V. Determination of isoprene in human expired breath using solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications* 2000; 739: 183–190.
- 300 Stone BG, Besse TJ, Duane WC, Evans CD, DeMaster EG. Effect of regulating cholesterol biosynthesis on breath isoprene excretion in men. *Lipids* 1993; 28: 705–708.
- 301 Deneris ES, Stein RA, Mead JF. In vitro biosynthesis of isoprene from mevalonate utilizing a rat liver cytosolic fraction. *Biochemical and biophysical research communications* 1984; 123: 691–696.
- 302 Alkhouri N, Singh T, Alsabbagh E, Guirguis J, Chami T, Hanouneh I, Grove D, Lopez R, Dweik R. Isoprene in the Exhaled Breath is a Novel Biomarker for Advanced Fibrosis in Patients with Chronic Liver Disease: A Pilot Study. *Clinical and translational gastroenterology* 2015; 6: e112.
- 303 Tong X, Li P, Zhang D, VanDommelen K, Gupta N, Rui L, Omary MB, Yin L. E4BP4 is an insulin-induced stabilizer of nuclear SREBP-1c and promotes SREBP-1c-mediated lipogenesis. *Journal of lipid research* 2016; 57: 1219–1230.
- 304 Risby TH, Solga SF. Current status of clinical breath analysis. *Appl. Phys. B* 2006; 85: 421–426.

- 305 Smith D, Spanel P, Enderby B, Lenney W, Turner C, Davies SJ. Isoprene levels in the exhaled breath of 200 healthy pupils within the age range 7-18 years studied using SIFT-MS. *Journal of breath research* 2010; 4: 17101.
- 306 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, Amann A. Breath acetone-aspects of normal physiology related to age and gender as determined in a PTR-MS study. *Journal of breath research* 2009; 3: 27003.
- 307 Thekedar B, Oeh U, Szymczak W, Hoeschen C, Paretzke HG. Influences of mixed expiratory sampling parameters on exhaled volatile organic compound concentrations. *Journal of breath research* 2011; 5: 16001.
- 308 Schubert JK, Miekisch W, Birken T, Geiger K, Noldge-Schomburg GFE. Impact of inspired substance concentrations on the results of breath analysis in mechanically ventilated patients. *Biomarkers : biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals* 2005; 10: 138–152.
- 309 Diskin AM, Spanel P, Smith D. Time variation of ammonia, acetone, isoprene and ethanol in breath: a quantitative SIFT-MS study over 30 days. *Physiological measurement* 2003; 24: 107–119.
- 310 Ziegler AG, Danne T, Dunger DB, Berner R, Puff R, Kiess W, Agiostratidou G, Todd JA, Bonifacio E. Primary prevention of beta-cell autoimmunity and type 1 diabetes - The Global Platform for the Prevention of Autoimmune Diabetes (GPPAD) perspectives. *Molecular metabolism* 2016; 5: 255–262.

## 10. Danksagung

Abschließend möchte ich mich herzlich für die erfahrene Hilfe und Unterstützung bedanken, durch die das Gelingen der Arbeit möglich wurde.

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Prof. Dr. Anette-Gabriele Ziegler, die mir die Durchführung meiner Promotion ermöglichte und mir mit konstruktiven Anregungen zur Seite stand. Für konstruktive Anregungen möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Peter Achenbach bedanken.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Dr. Florian Haupt für die ausgezeichnete Betreuung meiner Arbeit bedanken. Er stand mir immer mit Rat und Tat zur Seite, gab mir wertvolle Hilfestellungen und Unterstützung und hat so wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Des Weiteren möchte ich mich bei der Arbeitsgruppe des Projects Breath Gas Analysis, Research Unit Medical Radiation Physics and Diagnostics des Helmholtz Zentrums München für die Einführung in die Methode und Technik der PTR-MS sowie die Unterstützung bei den Messungen bedanken, insbesondere bei Stefan Keller.

Bei statistischen Fragen stand mir Dr. Stephan Haug vom Lehrstuhl für Mathematische Statistik der Technischen Universität München zur Seite, dem ich ebenfalls meinen Dank aussprechen möchte.

Schließlich möchte ich mich noch ganz herzlich bei meiner Familie bedanken, die mich während meiner gesamten Ausbildung unterstützt und immer an mich geglaubt hat. Ebenso möchte ich meinen Partnern für ihre Unterstützung danken.