

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Institut für Diabetesforschung, Helmholtz Zentrum München
Forschergruppe Diabetes der Technischen Universität München (TUM)

Das Potential der Atemgasanalyse in der Früherkennung von Typ 2 Diabetes mellitus nach einem Gestationsdiabetes mellitus

Bettina Eva Mirgeler

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

Prüfer der Dissertation: 1. Prof. Dr. Michael Hummel
2. Prof. Dr. Roland M. Schmid

Die Dissertation wurde am 31.05.2017 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 04.07.2018 angenommen

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	4
1. Einleitung	5
2. Material und Methoden	9
2.1 State-of-the-art oder Der lange Weg zum Konsens.....	9
2.2 Studiendesign und Ziele der POGO- Studie.....	10
2.3 Ablauf der Patientenuntersuchung.....	15
2.4 Messverfahren zur Atemgasanalyse.....	16
2.4.1 Proton Transfer Reaktion Massenspektrometrie (PTR-MS).....	16
2.4.1.1 Aufbau und Funktionsweise des Gerätes.....	16
2.4.1.2 Atemgassammlung.....	21
2.4.1.3 Konzentrationsänderung der VOCs während einzelner Atemzüge.....	24
2.4.1.4 Transmissionsmessung.....	25
2.4.1.5 Massenselektion.....	28
2.4.1.6 Vorläufige Zuordnung der VOC-Signale zu organischen Verbindungen...31	
2.4.2 Gaschromatographie (GC x GC TOF-MS).....	34
2.5 Ablauf der Patientenvisiten.....	34
2.5.1 Vorbereitung von Messplatz und PTR-MS.....	34
2.5.2 Ablauf der Atemgasmessung.....	36
2.6 Datenauswertung.....	37
3. Ergebnisse	44
3.1 Charakterisierung des Probandenkollektivs.....	44
3.2 Verhalten der Laborparameter im Verlauf des oGTT.....	48
3.3 Verhalten der VOC-Signale im Verlauf des oGTT.....	51
3.4 Vergleich von Atemluft- und Blutparametern.....	55
3.5 Gruppenvergleiche.....	59
3.5.1 Normoglykämische vs. dysglykämische Gruppe.....	59
3.5.2 Hoch - und Niedrigrisikogruppe nach FINDRISK.....	61

4. Diskussion.....	64
4.1 Allgemeiner Teil: Rationale für den Einsatz der Atemluftanalyse in der Früherkennung des Typ 2 Diabetes mellitus.....	64
4.2 Oxidativer Stress bei Prädiabetes- messbar in der Expirationsluft?.....	65
4.3 Methanol im Atemgas und das Mikrobiom.....	69
4.4 Klassifikation der Kohorte.....	73
4.5 Limitationen der Methode.....	78
5. Schlussfolgerungen und künftige Perspektiven.....	81
6. Zusammenfassung.....	82

Anhang

A. Abbildungsverzeichnis.....	83
B. Literaturverzeichnis.....	85
C. Fragebögen und Protokolle.....	93
1. Atemgas-Fragebogen als Beispiel vom 12.2.2013.....	93
2. Beispiel Protokoll vom 12.2.2013.....	94
3. FINDRISK-Fragebogen.....	95
4. Merkblatt zum Verhalten vor dem oGTT.....	97

Abkürzungsverzeichnis

BMI	Body mass index, Gewicht (in kg)/Größe ² (in m)
cps	counts per second, Zählrate
DDG	Deutsche Diabetes Gesellschaft
DGGG	Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe
EBL	Evidenzbasierte Leitlinie
eV	Elektronenvolt, Einheit der Energie
GC x GC – TOF-MS	Zweidimensionale Gaschromatographie mit gekoppelter Flugzeit-Massenspektrometrie
GDM	Gestationsdiabetes mellitus
HbA _{1c}	Hämoglobin A _{1c}
IFG	Impaired fasting glucose, erhöhte Nüchternplasmaglukose
IGT	Impaired glucose tolerance, gestörte Glukosetoleranz
MID	multiple ion detection
oGTT	Oraler Glukosetoleranztest
PCA	principal component analysis, Hauptkomponentenanalyse
POGO	Postpartum outcomes in mothers with gestational diabetes and their offspring
PTR-MS	Proton Transfer Reaktion Massenspektrometrie
ppbv	parts per billion volume
ppmv	parts per million volume
pptv	parts per trillion volume
SCFA	short chain fatty acid, kurzkettige Fettsäuren
sscm/min	Standardkubikzentimeter pro Minute
u	unified atomic mass unit, atomare Masseneinheit, per definitionem 1/12 der Masse eines Atoms des Kohlenstoff-Atoms ¹² C
U-Heft	Untersuchungsheft, Dokumentation der Vorsorgeuntersuchungen U1 bis J2 im Kindes- und Jugendalter
VOC	volatile organic compound, flüchtige organische Verbindung

1. Einleitung

Die Möglichkeit, diverse maligne Erkrankungen durch das Erschnüffeln tumorspezifischer Gerüche durch trainierte Hunde zu diagnostizieren, hat in den letzten Jahren breites Interesse hervorgerufen. Erstmals hatten Williams et al. 1989 in "The Lancet" die Hypothese veröffentlicht, dass Hunde in der Lage sein könnten, bestimmte Bestandteile der Luft, sogenannte VOCs (volatile organic compounds), wahrzunehmen und dadurch Melanome zu riechen (Horvath 2013). In den folgenden Jahren konnte die Theorie durch zahlreiche Arbeiten bestätigt und die Diagnostik durch Schnüffeln an verschiedenem Probenmaterial wie Urin oder Gewebeproben erweitert werden (Cornu 2011). In den unterschiedlichen Studien zeigten die Hunde eine hohe Diskriminationsfähigkeit zwischen krankhaftem und gesundem Gewebe, woraus der Schluss gezogen werden konnte, dass verschiedene Erkrankungen zur Freisetzung unterschiedlicher VOCs führen. Diese Tatsache kann zur Differentialdiagnostik genutzt werden. Es wurden zur Wahrnehmung der VOCs verschiedene Herangehensweisen gewählt, ausgebildete Hunde ebenso wie elektronische Nasen und in jüngerer Zeit auch die hochsensitive Massenspektrometrie, gekoppelt mit der Gaschromatographie. Hier führte die Entwicklung immer feinerer Technologien zur Detektion kleinster Mengen an VOCs, nämlich bis hinunter zu einem pptv-Niveau, also einem Volumenmischungsverhältnis von $1:10^{-12}$ (Lindinger 1998). Eine Ausweitung der Anwendung auch auf andere Krankheitsentitäten hielt mit der verbesserten Technologie rasch Einzug in die aktuelle Forschung und hat sich in den letzten Jahren vor allem im Bereich der Stoffwechseldiagnostik zu einem "hot topic" entwickelt (Minh 2012).

Von besonderem Interesse ist aufgrund seiner hohen Prävalenz und Inzidenz der Typ 2 Diabetes mellitus. Neuere Arbeiten von Guariguata et al. gehen von einem Zuwachs erwachsener Diabetiker (20-79 Jahre) von heute 382 Mio. auf 592 Mio. in 2035 weltweit aus (Guariguata 2014). Das entspricht einer Prävalenz von fast 8%. Eine Sonderstellung nimmt der Schwangerschaftsdiabetes ein. Die DDG (Deutsche Diabetes Gesellschaft) und die DGGG (Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe) definieren in ihren Leitlinien von 2011 den Schwangerschaftsdiabetes als *"eine Glukosetoleranzstörung, die erstmals in der Schwangerschaft mit einem 75-g oralen Glukosetoleranztest (oGTT) unter standardisierten Bedingungen und qualitätsgesicherter Glukosemessung aus venösem Plasma diagnostiziert*

wird. Die Diagnose ist bereits mit einem erhöhten Glukosewert möglich." (Kleinwechter 2011)

Die Prävalenz in Deutschland lag bei 4,4% im Jahr 2011 (absolut: rund 28.200 Fälle) (Kleinwechter 2012). Bemerkenswert ist dabei das im Vergleich zur Gesamtbevölkerung und zu glukosetoleranten Schwangeren deutlich erhöhte Erkrankungsrisiko für einen Typ 2 Diabetes nach der Schwangerschaft: Ziegler et al. belegten in der prospektiven deutschen GDM-Studie ein kumulatives 15-Jahresrisiko von durchschnittlich 63,6% mit einer mittleren erkrankungsfreien Zeitspanne von 7,9 Jahren nach der Indexschwangerschaft (Ziegler 2012).

Zu einem wesentlichen Teil stützen sich sowohl Diagnostik wie auch Therapie der Erkrankung auf die Analyse von Parametern, die bisher ausschließlich aus dem Blut gewonnen werden (Plasmaglukose, HbA_{1c}). Dreh- und Angelpunkt ist damit die Blutentnahme, eine Prozedur, die aufwändig, material- und kostenintensiv und schmerzhaft ist. Um jedoch Alternativen zu entwickeln, die sich auf eine nicht-invasive Analyse von abgeatmeten VOCs stützt, ist eine bessere Kenntnis der direkten Zusammenhänge zwischen VOCs und chemischen Botenstoffen des Organismus nötig. Bislang sind Herkunft, Aufnahme, Verstoffwechslung, Abbau und Ausscheidung von VOCs über Lunge und Haut größtenteils unverstanden. Arbeiten von Rieder et al. und Phillips et al. beschäftigten sich mit einigen VOCs näher (Isopren und o-Toluidin, Rieder 2010) oder beschrieben Umfang messbarer VOCs und mögliche Stoffwechselwege dazu (Phillips 1999), allerdings hat unseres Wissens noch niemand den Versuch unternommen, die Atemluftanalyse in der Früherkennung des GDM zu nutzen.

Der einzige ausgiebig erforschte Atembestandteil ist das Aceton beim ketoazidotischen Diabetiker. Hier sind Entstehungsprozess, physiologische Rolle und Abatmung des Ketonkörpers Aceton ebenso bekannt wie mit dem Massenspektrometer auch messbar (Turner 2009) (Smith 2011).

Es muss jedoch für die meisten der über 500 verschiedenen VOCs in der Ausatemluft eine intensive Interaktion und Metabolisierung im Körper angenommen werden (Phillips 1999). So können endogene VOCs ihren Ursprung in Lunge, Leber, Blut und den Mikroorganismen des Verdauungstraktes haben und auf ihrem Weg durch den Körper von denselben Geweben in Menge und Zusammensetzung beeinflusst werden. In besonderem Maße gilt dies für

pathologische Stoffwechszustände, in denen veränderte enzymatische oder nicht-enzymatische Mechanismen die exhalieren VOCs zusätzlich beeinflussen. Beispielsweise wird beim Typ 2 Diabetes sowohl eine direkt messbare Produktion bestimmter VOCs durch den Abbau der Glukose zu Methanol und Ethanol angenommen, als auch eine veränderte Zusammensetzung der VOCs durch den Einfluss der Hyperinsulinämie auf Fettstoffwechsel und Lipolyse (Galassetti 2005) (Minh 2012).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, das Verhalten von VOCs - gemessen in der Ausatemluft von ehemaligen Schwangerschaftsdiabetikerinnen - zu untersuchen und ein aussagekräftiges Set expiratorischer VOCs zu finden, welches mit Risikoparametern zur Früherkennung von Typ 2 Diabetes assoziiert ist. Hierzu wurden die Atemgasparameter mit Typ 2 Diabetes-Risikoparametern im Blut (Plasmaglukosespiegel, Insulin- und C-Peptidspiegel), sowie Insulinsensitivitätsindices verglichen. Um den Einsatz der Methode zur Risikostratifizierung in der Frühdiagnostik des Typ 2 Diabetes zu untersuchen, erfolgte der Versuch einer Separation der Kohorte in die diagnostischen Kategorien des Prädiabetes (impaired fasting glucose, IFG, impaired glucose tolerance, IGT und T2D), sowie in zwei Risikoklassen (Hoch- und Niedrigrisikogruppe), die sich am FINDRISK-Score orientieren (Schwarz 2009). Der FINDRISK-Score wurde 2007 von Peter Schwarz et al. als einfaches Screening-Instrument zur Einschätzung des 10-Jahres-Erkrankungsrisikos für T2D entwickelt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde innerhalb der POGO-Studie ("Postpartum Outcomes in women with Gestational Diabetes and their Offspring"), die Mütter mit vorausgegangenem Schwangerschaftsdiabetes und ihre Kinder nachverfolgt, eine Substudie durchgeführt, in der mütterliche end-expiratorische Atemluftproben während eines 75g-oGTT gesammelt wurden, um enthaltene VOCs qualitativ und quantitativ zu analysieren.

Die außerordentliche Menge der erhobenen Daten, insbesondere zu den Lebensstilfaktoren der Studienteilnehmerinnen (z.B. Raucherstatus, Medikamenteneinnahme, Erkältungssymptome) konnte genutzt werden, um die Interaktion konfundierender Variablen mit Atemgasparametern zu untersuchen.

Das Erscheinen zahlreicher Studien zum diagnostischen Einsatz der Atemgasanalyse auch bei metabolischen Störungen in den letzten Jahren lieferte erste Ansatzpunkte für unser Vorgehen (Galassetti 2005). Im Besonderen ist hier die GDM-Studie unseres Instituts zu nennen, die wichtige Hinweise auf mögliche Fokussierungen gab. So wurden in der GDM-Studie unter

Leitung von Privatdozent Michael Hummel in Kooperation mit der Abteilung für Medizinische Strahlenphysik und Diagnostik (AMSD) des Helmholtz Zentrums München mittels Massenspektrometrie bereits mögliche VOC-Biomarker identifiziert, mithilfe derer man im Zuge eines oralen Glukosetoleranztests (oGTT) zwischen Frauen mit Gestationsdiabetes, gestörter Glukosetoleranz, grenzwertig gestörter Glukosetoleranz und Gesunden unterscheiden konnte (Halbritter 2012).

Es wurden damals 142 VOCs untersucht, von denen 27 besonders sensitive Reaktionen auf die Glukose-Challenge zeigten, unter anderem die Substanzen Acrolein, Methacrolein und Aceton. Ziel der Untersuchungen war, die Realisierbarkeit der Methode zu zeigen und das diagnostische Potential zu ermitteln (Halbritter 2012). Die Untersuchung der Biomarker erfolgte damals ausschließlich an schwangeren Probandinnen, was die Stoffwechselsituation einheitlicher machte.

Die Probandinnen der zugrundeliegenden POGO-Studie wurden ein bis zehn Jahre postpartum mittels Atemgasanalyse, die sich besonders auf die bekannten sensitiven VOCs stützt, nachuntersucht (Hummel 2013). Metabolisch gesehen standen sie an unterschiedlichen Ausgangspunkten zu Prä-Typ 2 Diabetes (Hummel 2013). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die POGO-Studie die erste Studie an ehemaligen Gestationsdiabetikerinnen ist, die klinische Zusammenhänge zwischen diversen Risikoparametern des Typ 2 Diabetes im Blut mit abgeatmeten Substanzen untersucht, um die nicht-invasive Proton Transfer Reaktion Massenspektrometrie (PTR-MS) in der Frühdiagnostik des Typ 2 Diabetes zu etablieren.

2. Material und Methoden

2.1 State-of-the-art oder Der lange Weg zum Konsens

Der Gestationsdiabetes mellitus fand erstmals Erwähnung durch Heinrich Gottlieb Bennowitz im Jahre 1824 ("De diabete mellito graviditatis symptomate"). Er beschrieb damals ein Neuauftreten der Erkrankung während der Schwangerschaft sowie das Verschwinden der Symptome nach der Entbindung. Einige der diagnostischen Kriterien haben seit jener Fallbeschreibung von vor über 200 Jahren bis heute Bestand. Ein weltweiter Konsens zum Management der Erkrankung von der Diagnostik über therapeutische Regime bis hin zu Nachsorge und Prophylaxe der Entwicklung eines Typ 2 Diabetes allerdings konnte durch die verschiedenen beteiligten Fachgesellschaften bislang nicht erzielt werden (McIntyre 2015). Doch erst die Anwendung derselben diagnostischen Parameter erlaubt den Vergleich unterschiedlicher Test- und Therapieoptionen und ermöglicht die Durchführung großer, randomisierter Studien (Agarwal 2015).

Einen Meilenstein stellte die HAPO-Studie ("Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcomes") von 2008 dar, an der über 25.000 Frauen teilnahmen (The HAPO Study Cooperative Research Group 2008). Sie unterzogen sich einem 75g-oGTT zwischen der 24. und 28. Schwangerschaftswoche. Die Forscher um Boyd Metzger fanden einen starken kontinuierlichen Zusammenhang zwischen mütterlichem Blutzuckerspiegel, auch wenn dieser per definitionem noch unterhalb der GDM-Schwelle lag, und der Häufigkeit schwangerschaftsassoziierter Komplikationen wie fetaler Makrosomie, Hypoglykämie des Neugeborenen und der Notwendigkeit zur Sectio caesarea, ferner Frühgeburtlichkeit, Geburtsverletzungen und Präeklampsie. Zur Diskussion der wichtigen Ergebnisse dieser Studie berief die 1998 gegründete International Association of Diabetes and Pregnancy Study Group (IADPSG) ein Consensus Panel mit Mitgliedern aus über 40 Ländern ins Leben. In einem umfangreichen Reviewing-Prozess der HAPO-Ergebnisse sowie weiterer internationaler Studien (u.a. ACHOIS-Studie von Crowther et al. von 2005) ließ sich eine Einigung über die Empfehlung folgender Kriterien erzielen: Ausschluss eines Typ 2 Diabetes mellitus bereits vor Empfängnis oder im Rahmen einer ersten antenatalen Untersuchung,

Empfehlung zum 75g-oGTT, vorzugsweise einzeitige Testung zwischen der 24. und 28. Schwangerschaftswoche, einheitliche Grenzwerte für Nüchternplasmaglukose sowie 1- und 2-Stundenwert im oGTT, Vorliegen eines GDM mit bereits einem überschrittenen Grenzwert (Metzger 2010) (Crowther 2005) (Landon 2009). Damit orientieren sich die Grenzen für die Glukosetoleranz-Störung erstmals mehr am Schwangerschaftsergebnis, dem sog. "fetal outcome", als am Risiko der Mutter, postpartum einen manifesten Diabetes mellitus zu entwickeln. Die Anwendung dieser Kriterien wird von Gesellschaften wie der WHO, der American Diabetes Association und der DDG empfohlen (Ward 2013). Deutschland adaptiert mit dem "Merkblatt zum Gestationsdiabetes" vom 15.12.2011 internationalen Standard und verankert damit das GDM-Screening in den Mutterschaftsrichtlinien (Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen 2012) (Gemeinsamer Bundesausschuss 1986). Seit 3. März 2012 muss jeder Schwangeren ein oGTT angeboten werden, welcher damit erstmals eine Leistung der gesetzlichen Krankenkassen wird. Dennoch könnte es sein, dass einige GDM-Fälle übersehen werden, denn dem standardisierten 75g-oGTT ist zunächst eine orientierende Glukosebelastung mittels 50g Glukose als Suchtest im Nicht-Nüchternen-Zustand vorgeschaltet, dessen Validität nicht eindeutig belegt ist und Frauen mit isoliert erhöhtem Nüchtern-Blutzucker aktuell nicht erfasst. Ein standardisierter 75g-oGTT schließt sich nur im Fall eines pathologisch erhöhten 1-Stundenwertes an.

Die vorliegende POGO-Studie orientiert sich an den Leitlinien der DDG von 2011 (s. Tab. 2.1 und 2.2).

2.2 Studiendesign und Ziele der POGO-Studie

Die POGO-Studie ist eine großangelegte Kohortenstudie. Ziel ist es, die Einflussfaktoren in der Entwicklung vom Gestationsdiabetes mellitus zum nachfolgenden Typ 2 Diabetes sowie von Fettleibigkeit bei Mutter und Kindern genauer zu untersuchen (Hummel 2013). In die Studienergebnisse sollen sowohl genetische als auch sog. Lifestyle-Faktoren, wie Ernährung und körperliche Aktivität, einfließen.

Die Studie startete 2011 und wird bis voraussichtlich 2017 fortgesetzt. Es ist geplant, in diesem Zeitraum etwa 100 Mutter-Kind-Paare pro Jahr einzuladen. Insgesamt werden bis zu 500 Mutter-Kind-Paare in die Studie eingeschlossen werden. Dazu werden Frauen, die in vorangegangenen Schwangerschaften an Gestationsdiabetes mellitus (GDM) erkrankt waren

sowie deren Kinder rekrutiert. Die Rekrutierung der Probandenkohorte erfolgt aus dem Probandenkollektiv der Diabetesambulanz am Klinikum Schwabing, München. Die teilnehmenden Frauen waren zwischen 1998 und 2009 während einer Schwangerschaft aufgrund vorliegender Risikofaktoren (z.B. GDM in einer früheren Schwangerschaft, positive Familienanamnese für Diabetes mellitus, habituelle Aborte, erhöhte Blutglukosewerte) auf einen möglichen GDM untersucht worden. Insgesamt waren von 1829 Schwangeren Größe, Gewicht, HbA_{1c}, oGTT, Blutdruck und Familienanamnese von Diabetes mellitus erhoben worden. Bei 1226 der untersuchten Frauen war ein Gestationsdiabetes aufgetreten.

Die Diagnose des GDM anhand eines 75g-oGTT entspricht den Empfehlungen der Deutschen Diabetes Gesellschaft von 2011.

Tab. 2.1: Diagnose GDM nach Kriterien der DDG von 2011 (Kleinwechter 2011):

	Nach DDG 2011
Nüchternplasmaglukose	>95 mg/dl [5,3 mmol/l]
1-h-oGTT-Wert	> 180 mg/dl [10 mmol/l],
2-h-oGTT-Wert	> 155 mg/dl [8,6 mmol/l]

Das Vorliegen einer IFG (impaired fasting glucose) oder IGT (impaired glucose tolerance) postpartum ist nach folgenden Werten definiert:

Tab. 2.2: Diagnose von IFG und IGT nach Kriterien der DDG von (Kleinwechter 2012):

Nach DDG 2011	IFG	IGT
	Nüchternplasmaglukose 100-125 mg/dl [5,6–6,9 mmol/l]	2-h-oGTT-Wert 140-199 mg/dl [7,8-11,05 mmol/l] und Nüchternplasmaglukose <126 mg/dl [7,0 mmol/l]

Für die POGO-Studie wurden alle während der Schwangerschaft initial erfassten Frauen und ihre Kinder zu einer einmaligen Nachuntersuchung im Helmholtz-Studienzentrum in

München eingeladen. Es wurden sowohl die Kinder der Indexschwangerschaft, das heißt derjenigen Schwangerschaft, in der der Gestationsdiabetes aufgetreten war, als auch Geschwisterkinder eingeladen. Alle Studienteilnehmerinnen und –teilnehmer unterzeichneten vor Testbeginn eine Einverständniserklärung. Für minderjährige Probanden wurde von beiden Elternteilen eine Einverständniserklärung eingeholt.

Das Studienprotokoll wurde von der Ethikkommission der Technischen Universität München genehmigt (Nr. 2937).

Seit 2012 wird die Studie multizentrisch durchgeführt, es nehmen neben dem Studienzentrum in München die Partneruniversitäten in Düsseldorf, Tübingen und die Ludwig-Maximilians-Universität München teil.

Bei jedem POGO-Visit werden von Mutter und Kindern folgende Daten erhoben:

- Demographische und sozioökonomische Daten, dazu zählen Nationalität, Ausbildung, Einkommen, Wohnort, in der Familie gesprochene Sprachen, Raucherstatus der Eltern, Gewicht und Größe der Eltern und Kinder sowie Familienanamnese für Diabetes mellitus. Gewonnen werden diese Daten durch Fragebögen.
- Gynäkologische und geburtshilfliche Daten der Mutter wie BMI vor der Schwangerschaft sowie im Verlauf der Schwangerschaft, Gewichtszunahme in der Schwangerschaft, oGTT-Werte, Therapie eines eventuell diagnostizierten GDM, Geburtsmodus und Anzahl der Schwangerschaften und Geburten. Die Informationen hierüber sind im mitgebrachten Mutterpass, sowie in den Unterlagen aus dem Klinikum Schwabing verzeichnet.
- Perinatale Daten des Kindes beinhalten Geburtsgewicht und -alter, sowie Größen- und Gewichtsentwicklung in der Kindheit. Diese Daten werden dem sogenannten U-Heft entnommen.
- Anthropometrische Daten Körperhöhe und Gewicht von Mutter und Kind. Daraus errechnet sich der BMI (Gewicht in kg/Größe in m²). Außerdem werden Hüft- und Taillenumfang gemessen und eine Hautfaltenmessung an Oberarm und unterhalb der Skapula mittels Harpenden-Hautfalten-Messgerät durchgeführt.

- Ernährungsgewohnheiten der Familienmitglieder werden mittels standardisiertem Fragebogen für qualitative und semiquantitative Erfassung des Nahrungsmittelverzehrs nach Toeller von 2010 durchgeführt (Toeller 2010).
- Blutproben werden von den Studienteilnehmern im Rahmen des stets an Müttern und Kindern > zwei Jahren durchgeführten, standardisierten 75g-oGTT zu den Zeitpunkten 0, 30, 60, 90 und 120 Minuten nach dem Trinken der Glukoselösung (ACCU-CHECK® Dextro® O.G.T.; enthält 75g Glukose) abgenommen und darin folgende Parameter untersucht: Insulinspiegel, C-Peptid, Glukosekonzentration und HbA_{1c}.

Nach Befundung der Laborergebnisse durch eine Studienärztin erfolgt die Einteilung der Studienteilnehmerinnen und -teilnehmer in eine normoglykämische Gruppe und eine dysglykämische Gruppe. Zur dysglykämischen Gruppe zählen Probandinnen und Probanden mit erhöhter Nüchternglukose (IFG), gestörter Glukosetoleranz (IGT), Typ 2 Diabetes und Typ 1 Diabetes, sofern die hierfür notwendigen Autoantikörperbestimmungen positiv waren (Böhm 2011). Die aktuell gültigen Grenzwerte für die Diagnosestellung können den Tabellen 2.1 und 2.2 entnommen werden.

Um Veränderungen im metabolischen Profil während der Glukose-Challenge zu untersuchen und gegenüber bisher gesunden Frauen abzugrenzen, wird ein Teil des abgenommenen und weiterverarbeiteten Blutes zur Untersuchung des Metaboloms bereitgestellt. Hierzu zählen die Quantifizierung von Kohlenhydrat-, Lipid-, Nukleotid- und Peptidstoffwechselprodukten ebenso wie von Xenobiotika.

- Teile der Befunde (Nüchternglukosewert, Nüchterninsulinspiegel, Glukose- und Insulinspiegel zu späteren Zeitpunkten des oGTT) werden in Insulinsensitivitätsindices verrechnet, HOMA-Index (homeostasis model assessment), QUICKI (quantitative insulin sensitivity check index), ISI (insulin sensitivity index) und IGI (insulinogenic index). Alle vier Indices dienen in der Früherkennung der Einschätzung prädiabetischer Stoffwechselzustände.
- Weitere Nüchternblutproben werden entnommen und vor Ort im Labor weiterverarbeitet, Teile werden für mögliche spätere Untersuchungen in der Biobank des Helmholtz-

Zentrums München aufbewahrt. Untersucht werden Insulinsensitivität, β -Zellfunktion und Inselzellautoantikörper.

- Körperliche Aktivität im Alltag wird über Fragebögen erfasst und bei einem Teil der Studienteilnehmerinnen und –teilnehmer mit Hilfe eines Akzelerometers aufgezeichnet (Acti Graph©, GT3X Activity Monitor, USA). Dieser Bewegungsmesser wird eng am Körper getragen und zeichnet die Beschleunigung auf, die auf ihn einwirkt. Daraus kann auf den Energieverbrauch des Trägers rückgeschlossen werden. Zur besseren Interpretierbarkeit der Daten führen die Probandinnen und Probanden zusätzlich ein strukturiertes Tagebuch, in dem die jeweilige Aktivität eingetragen wird (z.B. Radfahren, Schlafen,).
- Zur mikrobiologischen Diagnostik des Mikrobioms senden die Probanden per Kurier eine gekühlte Stuhlprobe an das Studienzentrum. Diese wird auf die Zusammensetzung der enthaltenen Mikroorganismen hin untersucht. Neuere Studien belegen den Einfluss der intestinalen Mikroflora auf die Entstehung und Aufrechterhaltung des Diabetes (Xu 2014). Eine Substudie der POGO-Studie befasst sich mit dem Beitrag des Mikrobioms.
- Das aktuelle psychische Befinden über einen Zeitraum von zwei Wochen wird mit dem WHO Fragebogen zum Wohlbefinden (Version 5) abgefragt.
- Retrospektiv wurde aus den ausgefüllten Ernährungs- und Aktivitätsfragebögen der FINDRISK-Score für jede Probandin erhoben. Dieser ist eine Einschätzung für das 10-Jahres-Erkrankungsrisiko für Typ 2 Diabetes und berücksichtigt unter anderem Alter, Familienanamnese, Vorerkrankungen und Ernährungsgewohnheiten. Anhand des ermittelten Punktwertes erfolgte eine Risikoklassifizierung in fünf Gruppen, die für die vorliegende Arbeit nochmals in eine Hoch- und eine Niedrigrisikoklasse unterteilt wurden.

2.3 Ablauf der Patientenuntersuchung in der PTR-MS Substudie

Die für die vorliegende Arbeit entscheidende Messmethode ist die Atemgasanalyse mittels hochsensitiver Proton Transfer Reaktion Massenspektrometrie. In einer Substudie der POGO-Kohorte konnten wir 51 Probandinnen und Probanden einschließen (n=49 Frauen, n=2 Kinder, männlich) und ihre Atemluftprofile in Kooperation mit der Abteilung für Medizinische Strahlenphysik und Diagnostik (AMSD) am Helmholtz Zentrum München messen. Bei diesen 51 Testteilnehmern wurde in etwa drei- bis vierminütlichen Abständen die Konzentration ausgewählter VOCs (volatile organic compounds) direkt aus dem Atemstrom in Echtzeit mittels Proton Transfer Reaktion Quadrupol Massenspektrometrie (PTR-MS) bestimmt.

Die Menge der erhobenen Daten und Messungen pro Mutter-Kind-Paar in der POGO-Studie erfordert die präzise Einhaltung eines am oGTT orientierten Zeitplanes. Insbesondere Blutentnahmen und Atemgasmessungen mittels PTR-MS müssen streng standardisiert werden. Die Blutentnahmen finden zu den Zeitpunkten 0, 30, 60, 90 und 120 Minuten nach Glukoseaufnahme statt. Der Rhythmus der Atemgasmessungen wird in Kapitel 2.4.2 dargestellt. Um eine Stressreaktion bei den Probanden zu vermeiden und um Raumluftveränderungen auszuschließen, werden die Mütter gebeten, den Raum während der ersten Stunde nicht zu verlassen und ruhig sitzen zu bleiben. Außerdem werden alle Personen, die nicht am Untersuchungsgang beteiligt sind, gebeten den Raum zu verlassen. Die Blutentnahmen werden vom PTR-MS Untersucher durchgeführt. Parallel zur Atemgasmessung füllen die Mütter die Fragebögen zu Demographie, Sozioökonomie, Ernährung, körperlicher Aktivität und psychischem Zustand aus. In der zweiten Stunde nach Glukose finden weniger Messungen statt, so dass die Probanden den Raum verlassen und mit Study Nurse und Studienärztin die fehlenden Daten aufnehmen können (Anthropometrie, Vitalparameter). Nach Ablauf der 120 Minuten wird die venöse Verweilkanüle entfernt und die Probandinnen nach einem Abschlussgespräch mit der Studienärztin entlassen.

2.4 Messverfahren zur Atemgasanalyse

2.4.1 Proton Transfer Reaktion Massenspektrometrie (PTR-MS)

2.4.1.1 Geräteaufbau und Funktionsweise

Die hochsensitive Massenspektrometrie bedient sich der Proton Transfer Reaktion. Die Analyse flüchtiger Substanzen in ausgeatmeter Luft kann damit in Echtzeit erfolgen. Das von uns für die Atemgasanalyse genutzte Gerät wird von der Firma Ionicon (Ionicon Analytik GmbH, Innsbruck, Österreich) hergestellt und vertrieben. Die Analyse der gelösten Substanzen in Luft (volatile organic compounds, VOC) ist damit in einem Konzentrationsbereich von 100 ppmv (parts per million volume) bis 1 pptv (parts per trillion volume) möglich (Lindinger 1998). Das Umweltbundesamt definiert VOCs als *"gas- und dampfförmige Stoffe organischen Ursprungs in der Luft. Dazu gehören zum Beispiel Kohlenwasserstoffe, Alkohole, Aldehyde und organische Säuren."* (Umweltbundesamt 2013). Es existieren weit über 500 verschiedene VOCs. Ihr Ursprung kann sowohl endogener als auch exogener Natur sein. Ihre jeweiligen Konzentrationen in der Ausatemluft variieren im Bereich von nmol/l bis pmol/l (ppbv – pptv) (Miekisch 2004).

Physikalische Grundlage für die Detektion verschiedener Substanzen ist ein selektiver Ladungstransfer von einem geladenen Primärion, in diesem Fall Oxoniumion (H_3O^+), zu organischen Verbindungen. Kollidieren Oxoniumionen mit VOCs, so übertragen sie ihr Proton in einem exothermen Prozess auf die Substanz und ionisieren diese. Anschließend findet eine Auftrennung nach dem Masse-zu-Ladung-Verhältnis (m/z-ratio, mass-to-charge-ratio) statt. Dieser Vorgang gehört zu „soft ionization“-Methoden, das heißt, in den meisten Fällen führt die Reaktion nicht zur Fragmentierung und Zerstörung der untersuchten Moleküle (Taipale 2008). Voraussetzung für die Ionisierung ist eine höhere Protonenaffinität [in Elektronenvolt eV] der Substanz als diejenige von H_2O (7,2 eV). Bei den meisten organischen Verbindungen in der Luft liegt diese zwischen sieben und neun eV. Einzelne Protonenaffinitäten sind der Tabelle 2.3 zu entnehmen. Nach der Ionisierung sind die Moleküle detektierbar, somit ist eine Auftrennung und exakte Quantifizierung der Substanzen möglich. Detektierbare Moleküle sind zum Beispiel Schwefelwasserstoff (H_2S), Benzol (C_6H_6), Methanol (CH_4O) und Aceton ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$). Aufgrund zu geringer Protonenaffinitäten sind die Hauptluftbestandteile wie Stickstoff (N_2), Sauerstoff (O_2), Argon (Ar) und Kohlendioxid (CO_2) nicht protonierbar und damit nicht detektierbar (siehe Tab. 2.3, linke Spalte).

Tab. 2.3: Protonenaffinitäten (PA) verschiedener VOCs und Luftbestandteile (Halbritter 2011):

Component	PA in kcal/mol	PA in eV	Component	PA in kcal/mol	PA in eV
He	42.5	1.8	H ₂ S	170.2	7.4
Ne	48.1	2.1	HCN	171.4	7.4
Ar	88.6	3.8	C ₆ H ₆	181.9	7.8
O ₂	100.9	4.4	C ₃ H ₆	179.8	7.8
N ₂	118.2	5.1	HCOOH	178.8	7.8
CO ₂	130.9	5.7	CH ₃ OH	181.9	7.9
CH ₄	132.0	5.7	CH ₃ CN	188.0	8.1
N ₂ O	136.5	5.9	CH ₃ COH	186.6	8.1
CO	141.9	6.2	C ₂ H ₅ OH	188.3	8.2
C ₄ H ₁₀	163.3	7.1	CH ₃ COCH ₃	196.7	8.5
H₂O	166.5	7.2	NH ₃	204.0	8.8

Ein Protonentransfer ist möglich bei allen Substanzen in der rechten Hälfte der Tabelle und bei H₂O.

Der grundsätzliche Aufbau eines Proton Transfer Massenspektrometers (PTRMS) besteht aus folgenden drei Teilen:

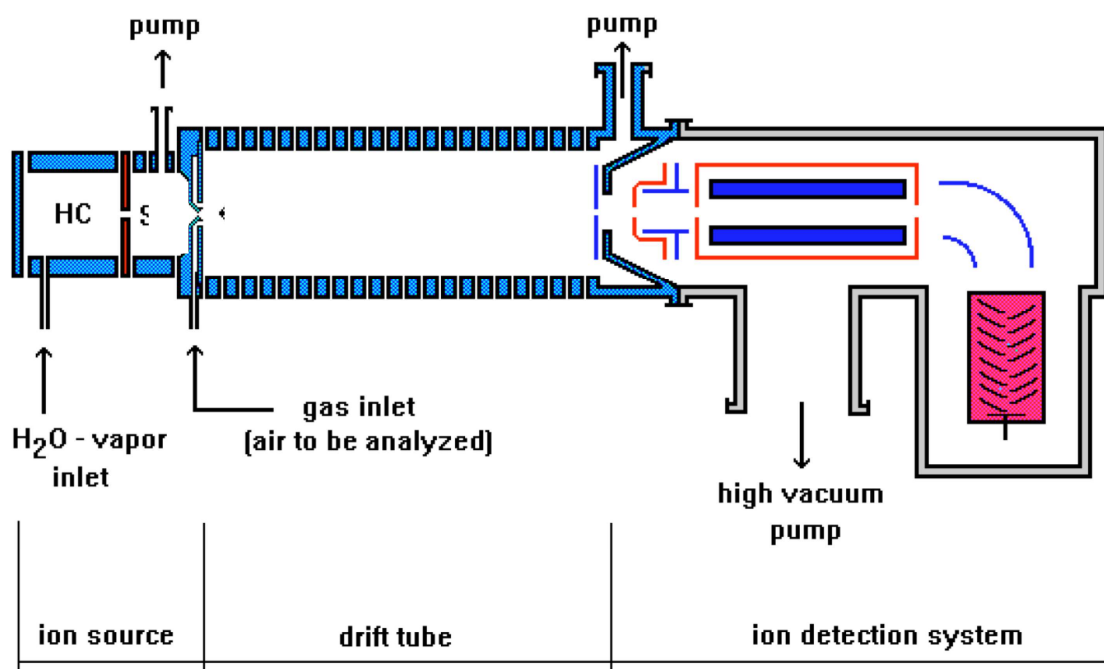
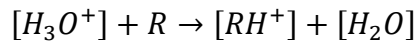


Abb. 2.1: Schematischer Aufbau des PTR-MSs; *HC*: hollow cathode, Hohlkathode (Lindinger 1998)

1. Einer Ionenquelle (ion source), die der Erzeugung der Oxoniumionen dient. Durch eine Hohlkathodenladung entstehen aus Wasserdampf (H₂O-vapor) H₃O⁺-Ionen, die Primärionen.

2. In der sich anschließenden Driftröhre reagieren die zuvor produzierten Oxoniumionen mit dem zu analysierenden Gas (air to be analyzed). Dieses wird über ein Messgaseinlassventil (gas inlet) in die Driftröhre gebracht. Dort kollidieren die H_3O^+ -Ionen mit den VOCs und protonieren sie nach folgender Gleichung:



Gl. 1

R : organische Substanz

RH^+ : protonierte organische Substanz

Das hierfür notwendige Vakuum in der Driftröhre wird von einer angeschlossenen Vakuumpumpe (pump) erzeugt.

3. Die nun ionisierten VOCs gelangen von der Driftröhre in die Detektionskammer, die sich aus zwei Bestandteilen zusammensetzt: Massenanalysator und Ionendetektor. Auch hier wird ein Vakuum durch eine potente Pumpe (high vacuum pump) erzeugt.

Als Massenanalysator wird ein Quadrupol verwendet. Die Auftrennung der ionisierten Massen geschieht anhand eines elektrischen Feldes, das durch vier parallel angeordnete Stabelektroden (Quadrupol) aufgebaut wird. Es können nur Ionen eines bestimmten Masse-zu-Ladung-Verhältnisses (m/z -ratio, mass-to-charge-ratio) das Feld zentral durchfliegen.

Im Anschluss treffen sie auf den Detektor (Sekundärelektronenvervielfacher) mit Messverstärker auf. Es wird pulsverarbeitende Elektronik eingesetzt, um die auftreffenden Ionen zu zählen. Hieraus wird die Zählrate der ionisierten Massen in cps (counts per second) ermittelt.

Bei bekannter H_3O^+ - Zählrate kann die genaue Konzentration der einzelnen, im Analysat enthaltenen VOCs bestimmt werden. Ist die Dichte der Oxoniumionen entsprechend hoch, so gilt:

$$[RH^+] = [H_3O^+]_0 \cdot (1 - e^{-k[R]t})$$

vereinfacht: $[RH^+] \approx [H_3O^+]_0 \cdot [R] \cdot k \cdot t$

falls: $[RH^+] \ll [H_3O^+] \approx [H_3O^+] = \text{const.}$

Gl. 2

$[H_3O^+]_0$: Konzentration der Primärionen in Abwesenheit von Reaktionspartnern

$[R]$: Konzentration des neutralen VOCs

$[RH^+]$: Konzentration des protonierten VOCs

t : Zeit, die die Ionen zur Durchquerung der Driftröhre benötigen

k : Reaktionskoeffizient (reaction rate constant), kann aus Literatur oder experimentell bestimmt werden, typisch $\sim 2 \cdot 10^{-9} \text{ cm}^3/\text{s}$

Um aus der Zählrate (in cps) der einzelnen Substanzen die absolute Konzentration der VOCs in ppbv zu bestimmen, setzt man in die Gleichung ein:

$$[RH^+]_{ppbv} = c \cdot [RH^+]_{cps} / [H_3O^+]$$

Gl. 3

c : Konstante, die k , t , einen Umrechnungsfaktor, sowie den Transmissionsfaktor (siehe Abschnitt 2.2.1.2) enthält (IONICON Analytik GmbH 2013); (Halbritter 2011)

Typische technische Betriebsparameter sind in **Tab. 2.4** aufgelistet.

Tab. 2.3: Technische Details und Einstellungen am PTR-MS

Flussrate des Bypass-Ventils	>300 ml/min
Stromstärke der Ionenquelle	0,44 – 0,6 mA

Druck in der Driftröhre	2,17 – 2,19 mbar
Temperatur in der Driftröhre	60 °C
Druck im Reaktionsraum	$<2 \times 10^{-5}$ mbar
Detektorspannung	1950V, ab 16.07.2012 2000V, ab 13.09.2012 2100V
Driftröhrenspannung	600 V
$c(\text{H}_3\text{O}^+)$	$>3 \times 10^4$ cps
$c(\text{O}_2)/c(\text{H}_3\text{O}^+)$	$<1\%$

2.4.1.2 Atemgassammlung

Wichtiger Bestandteil der VOC-Messung ist die Atemluftsammlung. Goldstandard seit 2008 ist das sogenannte buffered end-tidal online sampling device (BET), ein Atemluftsammler, dessen Herzstück eine beheizbare Teflon®-Röhre darstellt, aus der über eine Kapillare die Ausatemluft des Probanden direkt zur Driftröhre des PTR-MS abgesaugt werden kann (Herbig 2008). Abbildung 2.2 zeigt den Aufbau des Gerätes.

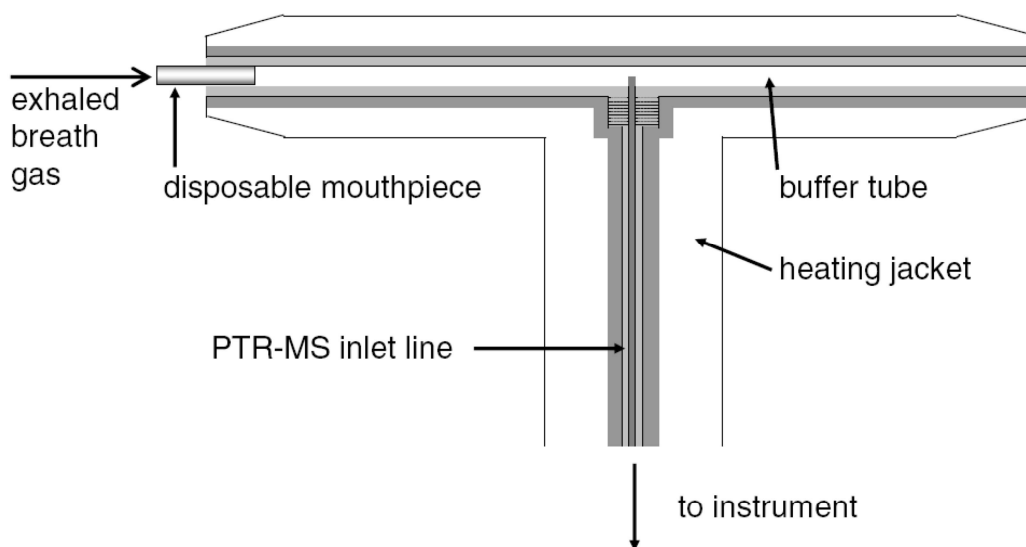


Abb. 2.2: Schematischer Aufbau des Atemluftsammlers (BET) (Herbig 2008)

Die Länge der Teflon®-Röhre (buffer tube) beträgt 30cm, das Speichervolumen im Röhreninneren beträgt 40ml. In der Mitte befindet sich die Ansaugkapillare mit dem Anschluss an das PTR-MS (PTR-MS inlet line). Hierüber wird konstant eine kleine Menge des Luftstroms (typisch 60sscm/min) abgesaugt. Beide Enden der Röhre sind frei zugänglich und offen. Dadurch befindet sich im Röhreninneren Raumluft.

An einem Ende kann ein hygienisches, austauschbares Plastikmundstück (disposable mouthpiece) angebracht werden, am anderen kann die abgeatmete Luft (exhaled breath gas), die nicht angesaugt wurde, entweichen. Die Heizvorrichtung (heating jacket) umfasst sowohl das Teflon®-Rohr als auch den Verbindungsschlauch. Beide werden auf etwa 80°C erhitzt, um ein Kondensieren der in der Atemluft enthaltenen Feuchtigkeit zu verhindern (Herbig 2008). Um die Sicherheit der Probanden zu gewährleisten, befindet sich am Röhrenende im Mundstück zusätzlich ein Rückschlagventil, so dass selbst bei versehentlicher oder absichtlicher Inspiration am Atemgassammler keine erwärmte Luft eingeatmet werden kann.

Eine der Schwierigkeiten der Atemgassammlung besteht darin, auf unkomplizierte, praktikable Art alveoläre Ausatemluft, die in der Analyse von Interesse ist -und Raumluft-direkt, in Echtzeit zu messen. In der Vergangenheit sind Methoden zum Einsatz gekommen, die lediglich eine off-line Analyse ermöglichen, das heißt, nach vorheriger Sammlung der Ausatemluft in Tedlar®-Beuteln mittels CO₂- oder auch flow-kontrollierter Steuerung kann der Beutelinhalt im PTR-MS untersucht werden (Beauchamp 2008).

Die Idee hinter der direkten BET-Atemgasmessung ist, dass das Teflon®-Rohr des BET als Reservoir dient, in dem sich am Ende der Exhalation bis zu 40 ml endexpiratorischer Luft befinden. Durch ein Monitoring der exhalieren Feuchtigkeit ($\text{H}_3\text{O}^+\cdot\text{H}_2\text{O}$, $m/z = 37$) eine Begutachtung des Expirationsvorgangs erfolgen, da der in normaler Raumluft enthaltene Feuchtigkeitsgehalt wesentlich niedriger ist (Herbig 2008). Abbildung 2.3 zeigt exemplarisch ein Ausatemstromprofil am Beispiel von $m/z = 37$.

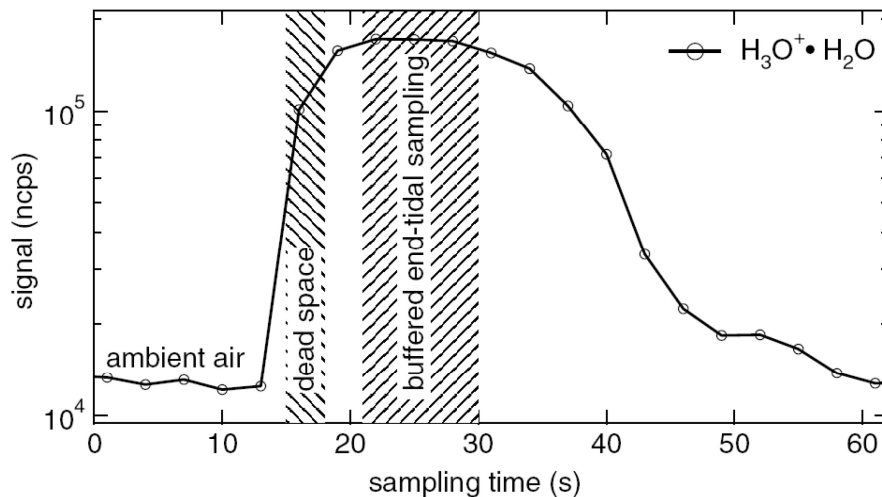


Abb. 2.3: Typisches Ausatemstromprofil am Beispiel von $m/z = 37$ (Herbig 2008); *ambient air*: Raumluft; *dead space*: Totraum; *buffered end-tidal sampling*: gespeicherte, end-expiratorische Probe; *sampling time*: Zeit seit Messbeginn in s; *signal*: Zählrate in ncps (normalized counts per second)

Atmet der Proband für die Atemluftmessung nach einer Inspiration die gesamte Expirationsluft über den Atemluftsammler aus, so durchströmen das Teflon®-Rohr Luftströme verschiedener Zusammensetzung: zunächst wird Luft aus dem anatomischen Totraum (*dead space*) abgeatmet, die im BET enthaltene Raumluft (*ambient air*) wird verdrängt, die Zählrate von $m/z = 37$ steigt jetzt an. Danach folgt Luft aus den Alveolen (*end-tidal sampling*) die Zählrate erreicht ihr Maximum. Die Plateauform des Maximums entsteht durch die Speicherwirkung des Teflon®-Rohres. Da der anatomische Totraum (Mund, Rachen, Trachea, Bronchien) des Atmungssystems nicht am Gasaustausch teilnimmt, enthält die hieraus expirierete Luft weniger CO_2 und Feuchtigkeit als alveoläre Luft und damit niedrigere Zählraten. Nachdem die alveoläre Luftsäule abgesaugt wurde fällt die Zählrate ab und es wird wieder Raumluft gemessen (Herbig 2008) (siehe auch Kap. 2.3.1.3). Entsprechend der Konzentration der VOCs im Expirationsgemisch lässt sich in Echtzeit der Verlauf der Zählraten einzelner, vorselektierter Massen beobachten.

2.4.1.3 Konzentrationsänderung der VOCs während einzelner Atemzüge

Der unmittelbar beobachtbare Zählratenanstieg von VOCs während jeder Expiration ist auch in Abbildung 2.4 am Beispiel der Masse $m/z = 75$ gezeigt. Hier wird deutlich, dass pro Messblock 120 Sekunden zur Verfügung standen, während derer zwei Atemzüge von den Probandinnen absolviert wurden. Auf diese Weise konnte die Zählrate vorausgewählter Massen zweimal erfasst werden.

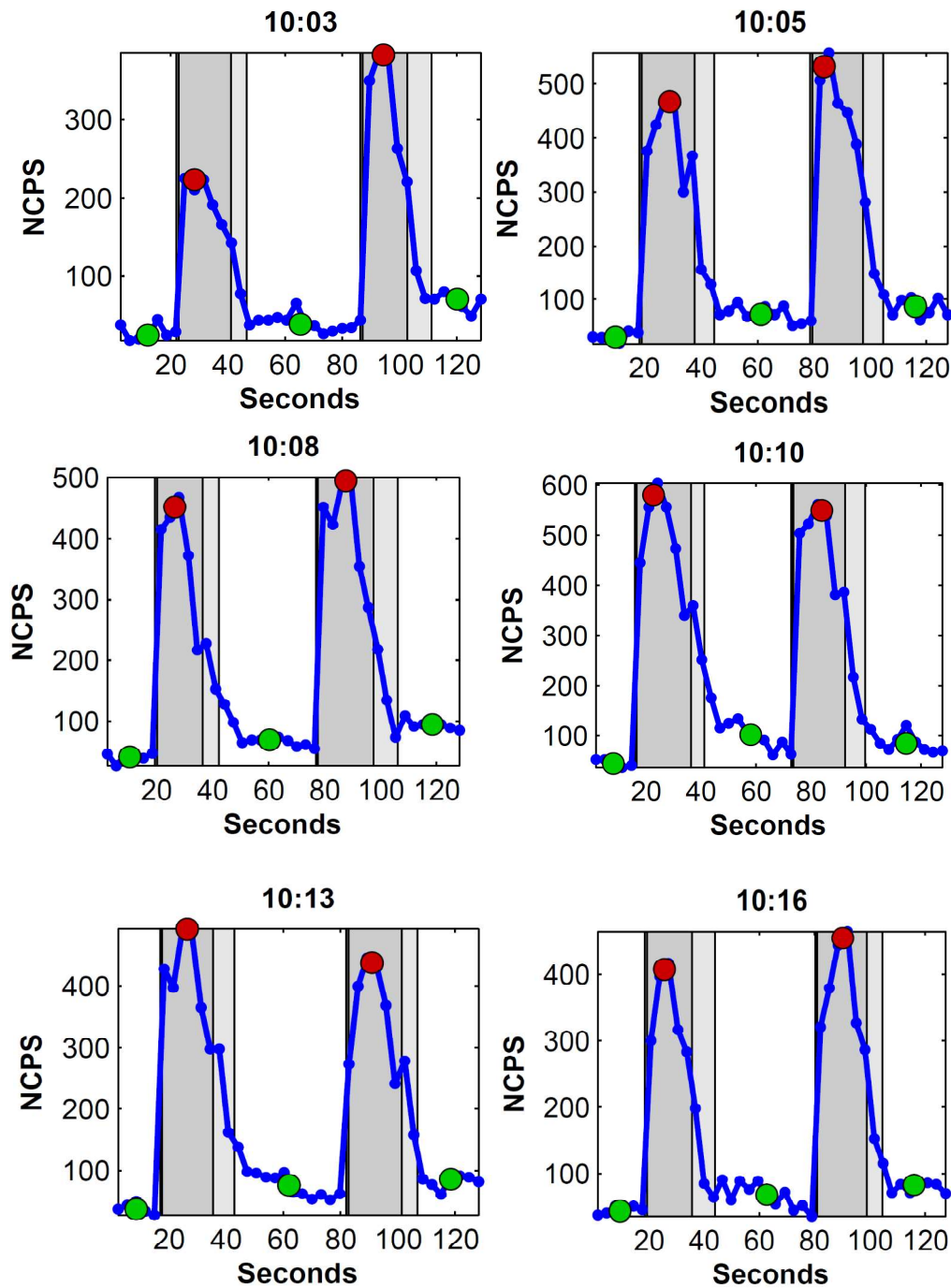


Abb. 2.4: Zeitverlauf der ncps-Zählraten (auf 10^6 Primärionen normiert) von 2 aufeinanderfolgenden Exhalationen am Beispiel von $m/z = 75$. Gezeigt sind die Zeitverläufe von sechs aufeinanderfolgenden Messzeitpunkten im Abstand von zwei bis drei Minuten während des oGTT

Die VOCs zeigten einen spezifischen zeitlichen Verlauf. Die nacheinander aufgezeichneten Atemzüge werden gemittelt und ergeben ein typisches Ausatemstromprofil, ähnlich **Abb. 2.3**. Um zwischen Raumluftkonzentration und alveolärer Konzentration einzelner VOCs zu unterscheiden, nutzten wir bereits für die GDM-Studie entwickelte Scripte, die mit dem Software Programm MATLAB R2010a (MathWorks, Natick, USA) ausgeführt wurden.

2.4.1.4 Transmissionsmessung

Alle durchgeführten VOC-Messungen fanden über einen Zeitraum von einem Jahr und zwei Monaten statt (9.3.2012 bis 2.5.2013). Um über einen derart langen Zeitraum Reproduzierbarkeit und Präzision der Messungen zu gewährleisten, sind in regelmäßigen Abständen Qualitätskontrollen in Form von Transmissionsmessungen am PTR-MS notwendig. Die Transmission für Ionen beschreibt die Anzahl der Ionen, die den Detektor erreicht, in Bezug auf die in der Quelle gebildete Ionenanzahl. Die Transmission ist also eine Empfindlichkeitsmessung (siehe **Abb. 2.5**). Haupteinflussfaktoren sind die Ionisierungswahrscheinlichkeit in der Driftröhre, die Bauart des Massenfilters und die Detektorempfindlichkeit. Transmissionsmessungen werden notwendig bei längerem Betrieb, nach Wartung oder nach Transport des Gerätes.

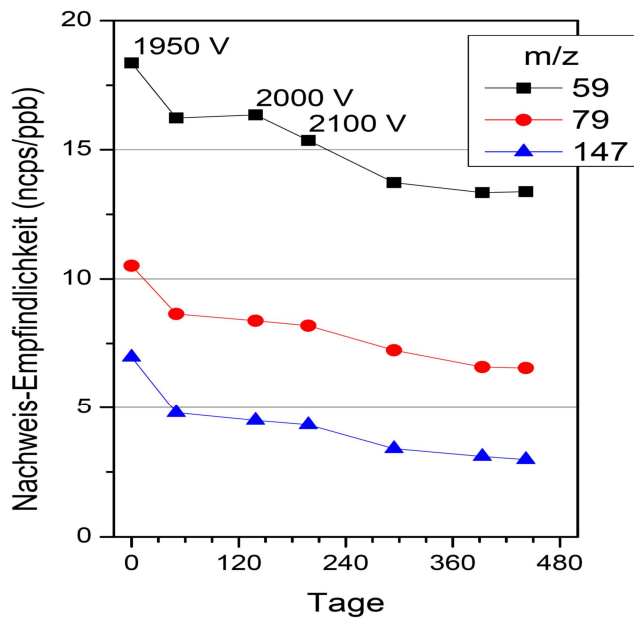


Abb. 2.5: Detektorempfindlichkeit für drei verschiedene Massen im Messzeitraum

Abbildung 2.6 zeigt die im Messzeitraum ermittelten Transmissionskurven: Auffallend ist ein Ansteigen der relativen Transmission für Massen $m/z < 70$ mit der Betriebszeit.

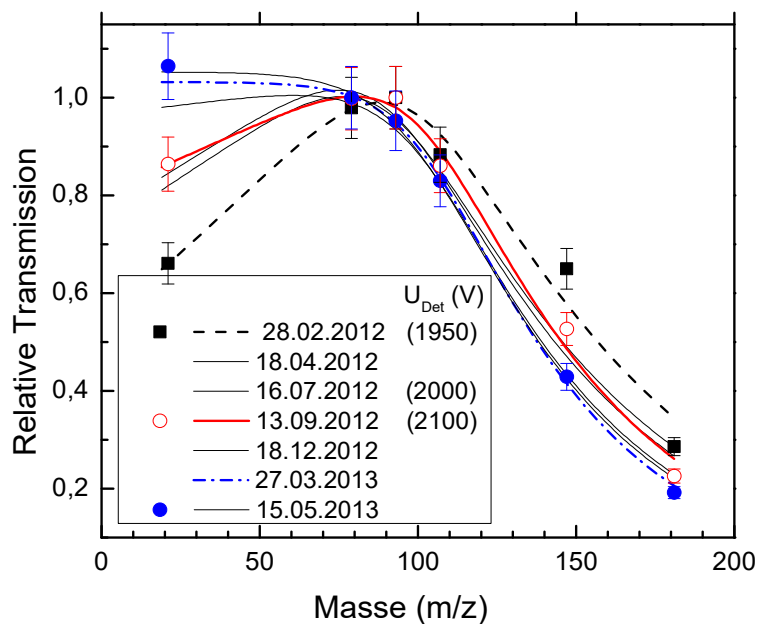


Abb. 2.6: Transmissionskurven des PTR-MS im Messzeitraum

Durchgeführt wird die Transmissionsmessung mittels einer gas calibration unit (Ionicon Analytik GmbH, Innsbruck, Österreich). Diese wird direkt am Atemgassammler des PTR-MS

angebracht. Es wird dann N₂ als Trägergas mit 6 verschiedenen Kontrollsubstanzen mit bekannter Konzentration, den sogenannten Kalibriermassen, in ansteigender Konzentration eingeleitet und die jeweiligen Zählraten aufgezeichnet. Die relativen Transmissionsfaktoren der Kalibriermassen ergeben sich aus dem Verhältnis der berechneten Konzentration gemäß Gleichung 3 zu der tatsächlichen Konzentration im Gasgemisch. Nach Anpassung einer analytischen Funktion an die berechneten Transmissionswerte der Kalibriermassen kann für jede Masse der Transmissionswert bestimmt werden.

Wir führten im Messzeitraum monatliche Transmissionsmessungen durch. Als Ergebnis dieser Messungen erhöhten wir zur Konstanthaltung der Messgenauigkeit die Detektorspannung mehrfach (siehe **Tab. 2.1**). Da sich im Laufe der Meßkampagne die Transmission für Massen $m/z < 70$ monoton mit der Zeit änderte, wurde für den Zeitpunkt eines Visits die Transmission durch Interpolation bestimmt.

2.4.1.5 Massenselektion

Die Vorselektion der Massen basiert vor allem auf den Ergebnissen der GDM-Studie von 2011/12 (Halbritter 2012). In dieser Pilotstudie konnten aus 142 untersuchten VOCs 16 identifiziert werden, die im Verlauf eines parallel durchgeführten oGTT eine besonders sensitive Reaktion zeigten. Das so entstandene, charakteristische VOC-Profil wurde für die POGO-Studie zunächst in leicht modifizierter Form übernommen, im Verlauf der Untersuchungen dann weiter verfeinert. Tabelle 2.5 gibt einen Überblick über die in der POGO-Studie gescannten Massen.

Tab. 2.5: VOCs (m/z) ab 10.08.2012 (Keller 2013)

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

Niedriger Takt: zehn Massen (blau) und zehn Massen (orange hinterlegt), die nur in Block 1 oder in Block 2 gemessen werden

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
Gesamt Mess-Zeit (s)	2.9		2.9

Hoher Takt	20 Massen
Niedriger Takt	20 Massen

Wie aus obenstehender Tabelle ersichtlich, ist die Auswahl der beobachteten Massen während eines Atemzuges auf zunächst 40, später 30 beschränkt. Eine derartige Vorauswahl wird in der PTR-MS mittels MID-Modus (multiple ion detection) gemessen. Die vorausgewählten Massen werden in zwei Messblöcken eingeteilt. Pro Block werden 30 Massen 30 mal nacheinander gescannt. Jede Masse hat dabei eine Messzeit (dwell time) von 100 ms, mit Ausnahme von $m/z = 21$ (Primärionen) und $m/z = 37$ ($\text{H}_3\text{O}^+ \cdot \text{H}_2\text{O}$), also Wasserstoffionen und Wasserstoffcluster, die in je 50 ms gemessen werden. Insgesamt werden also für jeden Block 90 s benötigt. Dadurch wurde ein zeitlicher Abstand der einzelnen Atemmessungen von drei bis vier Minuten möglich. Weitere Details zur Rhythmik der Atemgasmessung sind in Abbildung 2.7 und im Kapitel 2.4.2 zu finden.

Im Oktober 2012 zeichnete sich ab, dass zehn Massen aus dem Messvorgang genommen werden können. Gründe dafür lagen entweder in der zu geringen Signalintensität der einzelnen Massen (nah am Rauschen), an fehlender Differenz zwischen Raumluft- und Expirationsluft, oder an der Identifikation eines natürlichen Isotops. Um die Messzeiten vergleichbar zu halten, wurden ab diesem Zeitpunkt zehn besonders responsive Massen doppelt gemessen (z.B. $m/z = 59$, Aceton, $m/z = 61$; siehe **Tab. 2.4**, **Abb. 2.7**).

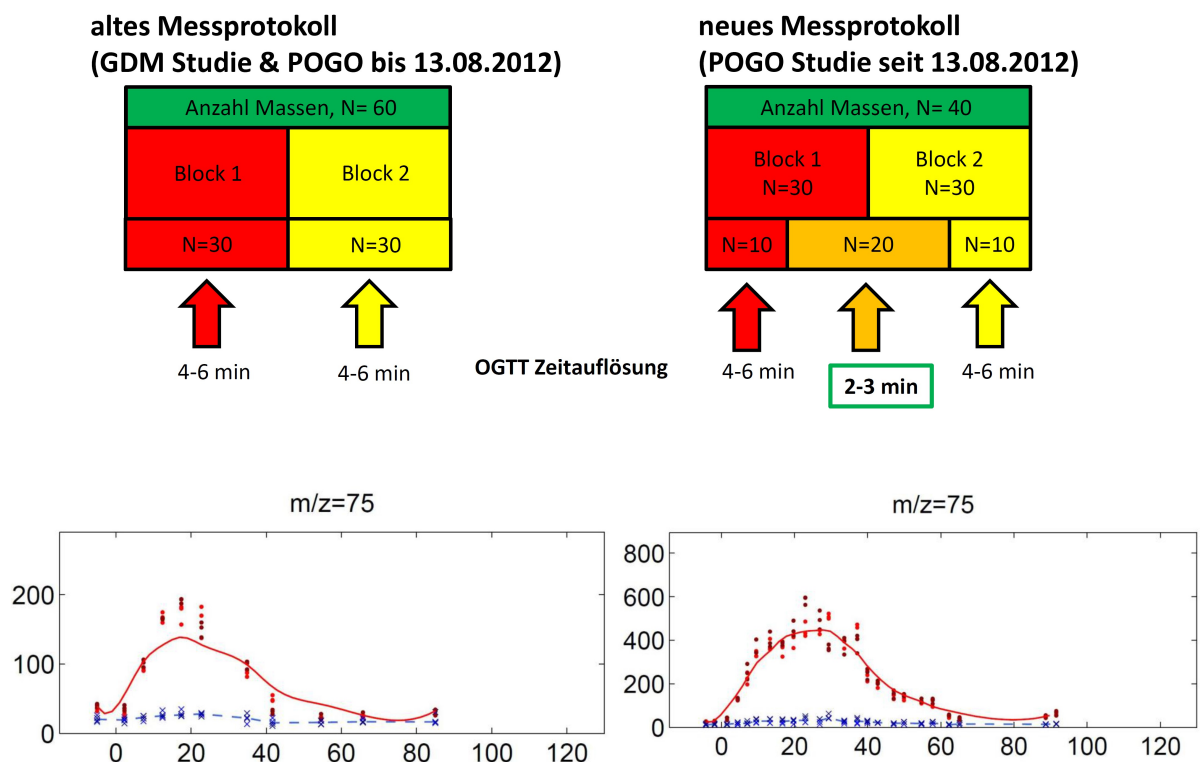


Abb. 2.7: verfeinertes Messprotokoll ab August 2013 und dadurch erreichte höhere zeitliche Auflösung

Im Gegensatz zum MID-Modus fanden auch Massenscans ($m/z = 20$ bis $m/z = 174$) der Raumluft am Morgen eines jeden Messtages statt, um Ausreißer bereits im Vorfeld der Messungen zu identifizieren.

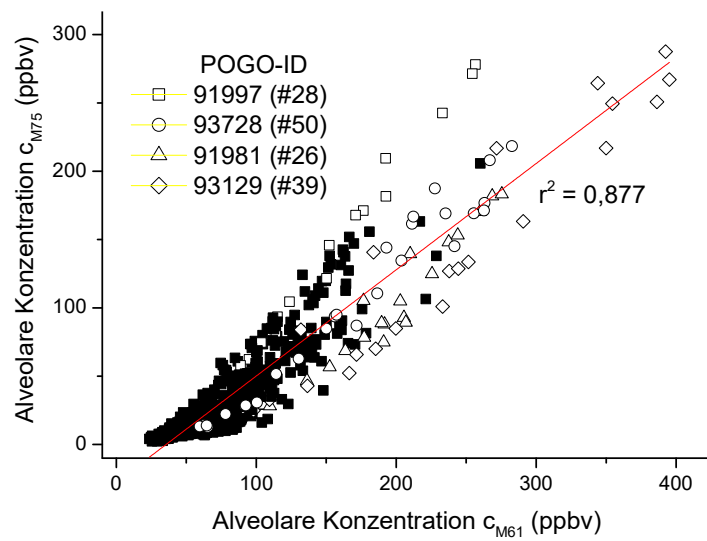
2.4.1.6 Vorläufige Zuordnung der VOC-Signale zu organischen Verbindungen

Die genaue Identifikation einzelner Substanzen anhand des PTR-MS ist aufgrund der Massenauflösung des Gerätes nicht möglich. Die meisten chemischen Elemente besitzen mehrere Isotope, also Nuklide unterschiedlicher Massenzahl. Je höher die Konzentration eines Isotops, desto höher der Peak. Moleküle gleicher Masse, Isobare einer Substanz, werden jedoch nicht getrennt dargestellt, da bei Verwendung von ^{12}C (per definitionem ist die Masse von ^{12}C 12.000.000u [unified atomic mass units]) als Grundlage der atomaren Massenskala alle Atomkerne ganzzahlige Massenzahlen zugeordnet bekommen. Auch Molekülfragment-Ionen, die durch die Protonierung in der Driftröhre entstehen können, werden durch ganzzahlige Massenzahlen charakterisiert (Bender 2012).

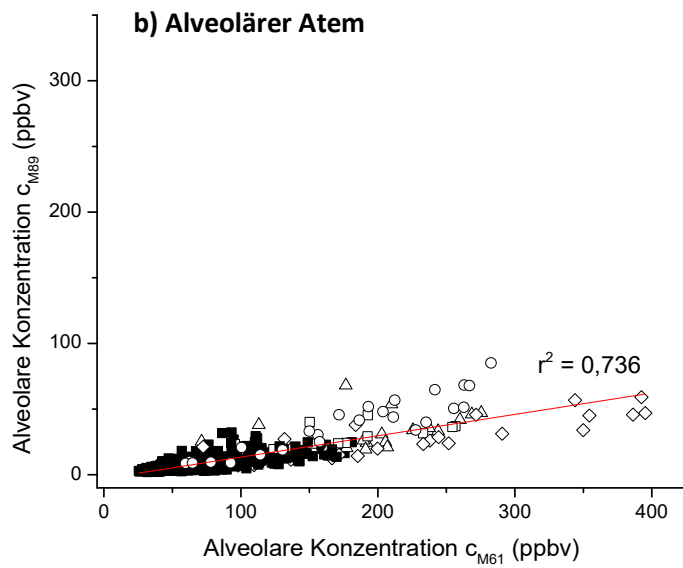
Eine Zuordnung der protonierten Massen zu organischen Verbindungen ist deshalb vorläufig durch Isotopenanalyse möglich. Hierbei wird die starke Korrelation von Isotopen typischer, in Atemluft enthaltener Komponenten ausgenutzt, z.B. bei Aceton $m/z = 59$ und 60 . (siehe **Abb. 2.8 a)** und **c)**). Welche Komponenten hierfür geeignet sind, findet sich in Arbeiten von Phillips et al. und Kushch et al. (Phillips 1999) (Kushch 2008).

Korrelationen treten auch bei Molekülfragment-Ionen einer Substanz und verwandten Substanzen auf. Auffallend war eine Korrelation der Massen $m/z = 61$ und 75 (**Abb. 2.7 a)** sowie $m/z = 61$ und 89 (**Abb. 2.8 b)**). Dass die hohen Konzentrationen im Atem einiger Probandinnen nicht durch erhöhte Raumluftkonzentrationen bedingt sind zeigt **Abb. 2.8c)**. Zwar steigt auch die Konzentration im Raum an, jedoch auf niedrigem Niveau, so dass eine endogene Produktion der Substanzen angenommen werden kann.

a) Alveolärer Atem



b) Alveolärer Atem



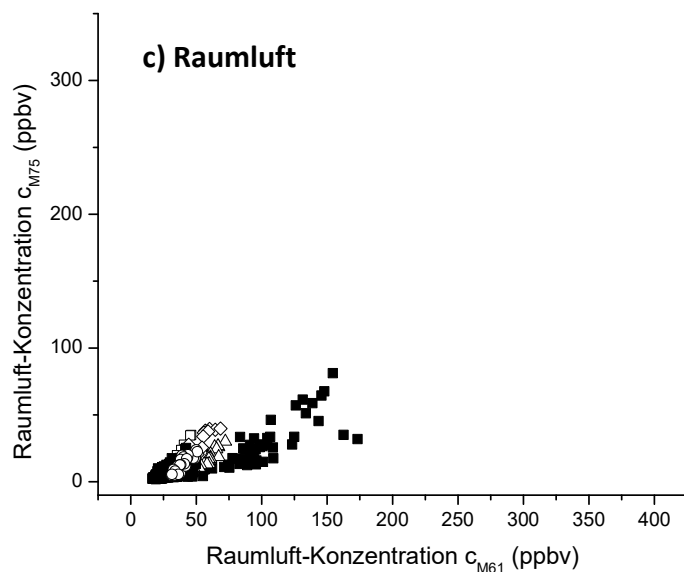


Abb. 2.8: a) enge Korrelation der VOC-Konzentrationen von $m/z = 61$ und $m/z = 75$ ($r^2=0,877$); b) $m/z = 61$ und $m/z = 89$ ($r^2=0,736$) in den Atemzügen aller Probandinnen; hervorgehoben sind besonders hohe Werte; c) zugehörige, niedrige Raumlufkonzentrationen

Grundvoraussetzung für eine Protonierung und damit Detektion der Moleküle ist zudem eine Protonenaffinität (PA), die über derjenigen von Wasser liegt. Substanzen mit einer PA unter 7,2 eV sind somit für das PTR-MS "unsichtbar".

Die für die vorliegende Arbeit ausgewählten VOCs sowie ihre möglichen chemischen Identitäten und Zugehörigkeiten zu chemischen Stoffgruppen können Tabelle 2.6 entnommen werden. Detaillierte Informationen über die Kinetik ihrer Konzentrationsänderungen bei Glukoseverstoffwechselung finden sich in Kapitel 3.3. Folgende Subgruppierungen können zudem gebildet werden: Aceton und seine Metabolite, Oxidationsprodukte aus Glukose- und Lipidstoffwechsel und Thiole und Sulfide (Halbritter 2012) (Buhr 2002).

Eine definitive Zuordnung wurde mittels Gaschromatographie versucht und wird Bestandteil einer Dissertation zum Thema sein (siehe Kap. 2.3.2).

Tab. 2.6: Vorläufige Zuordnung protonierter Massen zu organischen Verbindungen

Masse (m/z)	mögliche Substanz	Stoffgruppe
18	Ammoniak	Amine
31,33,34,51	Methanol	Alkohole
37	Wassercluster	
41,43,44	Propanol	Alkohole
45	Acetaldehyd	Aldehyde
47, 48	Ethanol	Alkohole
49	Methanthiol	Thiole
55	Aldehydfragmente	Aldehyde
57	Acrolein	Aldehyde
59	Aceton	Ketone
61,62	Essigsäure	Säuren
63,95	Dimethylsulfid	Thiole
65	Wassercluster von Ethanol	Alkohole
69	Isopren	Alkene
71,72	Methacrolein	Aldehyde
73	Butanal, Methylpropanal, Methylglyoxal	Aldehyde
75,76	Essigsäuremethylester, Propansäure	Säuren
77	Propanthiol	Thiole
79	Benzol	Aromaten
81	Monoterpenfragment	Alkene
89,9	Essigsäureethylester, Butansäure	Ester, Säuren
91	Butanthiol, Methylpropanthiol	Thiole
93	Toluol	Aromaten
95	Phenol	Aromaten
97	Heptanal, Dimethylfuran	Aldehyde, Aromaten
103	C5-Ester	Ester
111	Oktanal	Alkohole
124	Unbekannt	
135	p-Cymol	Aromaten
137	Monoterpen	Alkene

2.4.2 Gaschromatographie (GC x GC - TOF-MS)

Um sichere Kenntnis über die untersuchten Massen zu erlangen und um die gewonnenen Daten damit sicher zu validieren, hat sich die Kopplung der Massenspektrometrie mit der Gaschromatographie bewährt. In Zusammenarbeit mit der Kooperationsgruppe Comprehensive Molecular Analytics des Helmholtz Zentrums München konnten wir bei sieben Probandinnen eine gemeinsame Analyse durchführen.

Die hier eingesetzte Technologie ist die zweidimensionale, umfassende Gaschromatographie mit gekoppeltem Flugzeit-Massenspektrometer (GC x GC TOF-MS). Die gewonnenen Daten unterliegen zum jetzigen Zeitpunkt noch dem Auswertungsvorgang und werden im Rahmen einer anderen Dissertation am Institut für Comprehensive Molecular Analytics veröffentlicht.

2.5 Ablauf der Patientenvisiten

2.5.1 Vorbereitung von Messplatz und PTR-MS

Um eine gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erzielen und um die Messbedingungen bestmöglich zu standardisieren, wurden Räumlichkeiten und Gerät an jedem Morgen, an dem eine Messung stattfand, folgendermaßen vorbereitet:

1. Zunächst wurden Fenster und Türe geöffnet und der Raum durchgelüftet um eventuell vorhandene Raumlufkonzentrationen messbarer, jedoch unerwünschter Substanzen, wie sie beispielsweise durch Putz- und/ oder Desinfektionsmittel entstehen, zu reduzieren. Fenster und Türe blieben während des gesamten Messvorgangs geöffnet.
2. Zur besseren Kontrolle der Raumlufbedingungen wurde eine konstante Temperatur-, Feuchtigkeits- und Luftdruckmessung durchgeführt (Hygro-Thermometer HYTE-LOG 4800Bd, Hygrosens Instruments, Löffingen, Deutschland).
3. Die Heizung des Atemluftsammlers, sowie die Flussrate durch den BET wurden standardmäßig auf 80 °C, respektive 60 sscm/min eingestellt.

4. Zur Vorbereitung des PTR-MS wurden nach dem Einschalten des Gerätes sämtliche technischen Parameter, wie in Tabelle 2.4 gezeigt, eingestellt und die Betriebsbereitschaft anhand der Massen $m/z = 21$ (Primärionen), $m/z = 32$ (molekularer Sauerstoff) oder $m/z = 59$ (Aceton) überprüft, um gegebenenfalls Anpassungen der Quelleneinstellungen vorzunehmen. Im Rahmen des Visits war ein Einbrennvorgang von etwa 20 Minuten möglich. Dabei wurden etwa 50 Zyklen dieser zunächst fünf, später auf elf erweiterten, wichtigsten Massen im sogenannten MID-Modus (multiple ion detection) durchgeführt.
5. Im Anschluss erfolgte ein Raumlufscan, das heißt vier bis sechs Massenscans im sogenannten scan-Modus. Es wird dabei das Spektrum der Massen $m/z = 20$ bis $m/z = 174$ aufgezeichnet. Zweck ist es, Ausreißer bereits im Vorfeld (z.B. abnorm hohe Raumlufkonzentrationen einzelner Substanzen) zu erkennen.
6. Zuletzt wurden die Funktionsfähigkeit von BET und seinen Anschlüssen an das PTR-MS überprüft, indem ein Selbsttest am Untersucher durchgeführt wurde (siehe **Abb. 2.9**).

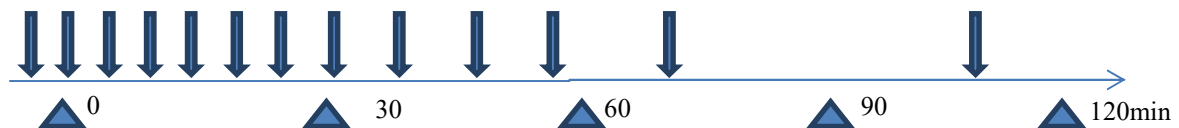


Abb. 2.9: Setting der Atemgasmessungen

2.5.2 Ablauf der Atemgasmessung

Nach den Vorbereitungen wie in Kap. 2.4.1 beschrieben starteten die Atemgasmessungen. Die Probandinnen und Probanden waren mittels eines kurzen Vorgesprächs und eines Manuals mit Verhaltenshinweisen vor dem oGTT auf eine 12 stündige Nahrungs- und Nikotinkarenz hingewiesen worden. Details sind dem Anhang zu entnehmen. Für die Blutentnahmen war den Probandinnen und Probanden kurz nach Ankunft im Studienzentrum von einer Studienärztin eine venöse Verweilkanüle gelegt worden. Nach einem kurzen Vorbereitungsgespräch und der ersten Nüchternblutentnahme wurden die Probandinnen mit ihren Kindern zum Messplatz gebracht, wo zunächst zwei Nüchternatemmessungen vorgenommen wurden. Unmittelbar nach der sich anschließenden Glukoseaufnahme wurde in einem etwa vier- bis sieben-minütlichen Rhythmus weitergemessen. Halbstündlich wurde die Atemgasmessung für eine Blutentnahme unterbrochen. Abbildung 2.10 zeigt beispielhaft eine Messreihe.

Atemluftsammlung



Blutentnahme

Abb. 2.10: Konzertierte Messzeitpunkte für Atemgas und Blutentnahmen

Die Rhythmik der Atemgasmessungen ergab sich aus den Ergebnissen der GDM-Studie. Hier war festgestellt worden, dass es sowohl kinetisch als auch linear reagierende VOC-Signale gibt. Die meisten kinetischen Signalantworten erreichten ihre Maximalwerte etwa 15 Minuten nach Glukoseingestion (Halbritter 2012). Basierend auf diesen Daten fand der Hauptteil der Messungen in der ersten Stunde nach Glukoseaufnahme statt. Exemplarisch findet sich im Anhang ein Messprotokoll mit genauen Angaben zum zeitlichen Ablauf eines Messtages.

Aus Kapitel 2.3 ist bekannt, dass der Scan der einzelnen Massen in zwei Messblöcke aufgeteilt war. Die Probandinnen wurden gebeten, einzuatmen und danach durch den BET-Sammler auszuatmen. Insgesamt führten wir 13 Messungen durch, jede Messung à zwei Blöcke, jeder Block à zwei Expirationen.

In der zweiten Stunde rarefizierten wir die Messungen, einerseits, um die Probandinnen nicht zu strapazieren und damit stressinduzierte VOC-Signale auszulösen, andererseits, weil in diesem Zeitraum weit weniger Reaktion der VOC-Signale zu erwarten war.

2.6 Statistische Verfahren zur Datenauswertung

Um die Unterschiede zwischen gesunden und kranken, sowie grenzwertig veränderten Stoffwechszuständen zu erfassen, bedienten wir uns bereits etablierter Methoden zur Datenextraktion und –auswertung und verfeinerten Prozesse anhand neuer Daten. Das Vorgehen wird im Folgenden beschrieben.

Die Atemzüge wurden mittels SEABREAS-2 (Ionimed Analytik GmbH, Austria) aufgezeichnet, das für den Zeitverlauf der Zählraten getrennt für jede Masse eines Massenblockes abspeichert (**Abb. 2.4**). Die weitere Auswertung erfolgte in MATLAB R2010a (MathWorks, Natick, USA) durch die Abteilung Medizinische Strahlenphysik und Diagnostik, die dazu vorhandene Skripte aus der GDM-Studie weiterentwickelte. Da in einem Atemzugdatensatz zwei Atemzüge nacheinander erfasst wurden, wurden zuerst die Grenzen der Raumluf- und alveolaren Atemintervalle bestimmt. Innerhalb der Intervalle erfolgte eine Berechnung des Erwartungswertes der Zählraten: Im Raumlufintervall wurde ein Erwartungswert und Standardabweichung unter Annahme einer Poisson-Gleichverteilung berechnet. Für das alveolare Atemintervall konnte kein Verteilungsmodell angenommen werden, da die Peakform stark variierte. Daher wurde ein Peakwert extrahiert: Median, minimaler und maximaler Wert wurden dazu im Teilintervall zwischen beiden höchsten Werten im alveolaren Intervall berechnet. Der Medianwert war der gesuchte Erwartungswert und der Abstand zwischen Minimum und Maximum ein Maß der Unsicherheit.

Die aufeinanderfolgenden Messungen ergaben den zeitlichen Konzentrationsverlauf der jeweiligen Masse während eines oGTT. In Folge der höheren Zeitauflösung wurden sowohl ein steiler Signalanstieg als auch weitere Peakstrukturen sichtbar. Die kinetische exponentielle Fitfunktion der GDM-Studie erwies sich als unzureichend (**Gl. 4, Abb. 2.14**). Deswegen erfolgte im nächsten Auswerteschritt die Beschreibung des oGTT-Zeitverlaufs mittels einer parametrischen Kurve: mit fünf Knickpunkten und Basislinie konnten der steile Anstieg und unabhängig davon ein variierender Peakabfall gut beschrieben werden (**Abb. 2.14**). Diese Schritte wurden mit allen VOCs in jedem Atemzug während des oGTT vorgenommen.

Von zunächst in der GDM-Studie untersuchten 142 VOCs wiesen 19 VOC-Signale einen sogenannten kinetischen Verlauf auf, 8 einen sogenannten linearen. Neue Erkenntnisse der POGO-Studie bezüglich der Konzentrationsänderung der VOCs nach Glukose-Challenge sind der höheren Zeitauflösung der Messungen geschuldet. So zeigt sich bei Ethanol (Masse m/z 47) ein kurzer Anfangsspike, der durch das Ethanol in der Glukoselösung verursacht wird (**Abb. 2.11 bis 2.13**).

$$\begin{array}{l} \text{Kinetisch: } x = a \cdot t \cdot e^{-2t/\mu} + c \\ \text{Linear: } x = \mu \cdot t + c \end{array}$$

Gl. 4 (Halbritter 2012)

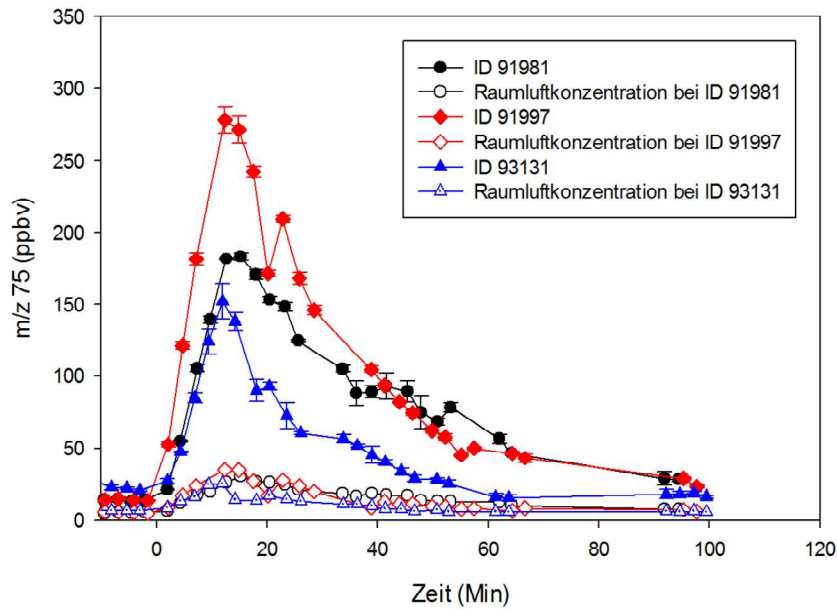


Abb. 2.11: Kinetisch reagierende Masse 75 am Beispiel von drei Probandinnen; gezeigt werden alveoläre Konzentration (als MW mit SD) und Raumluftkonzentration

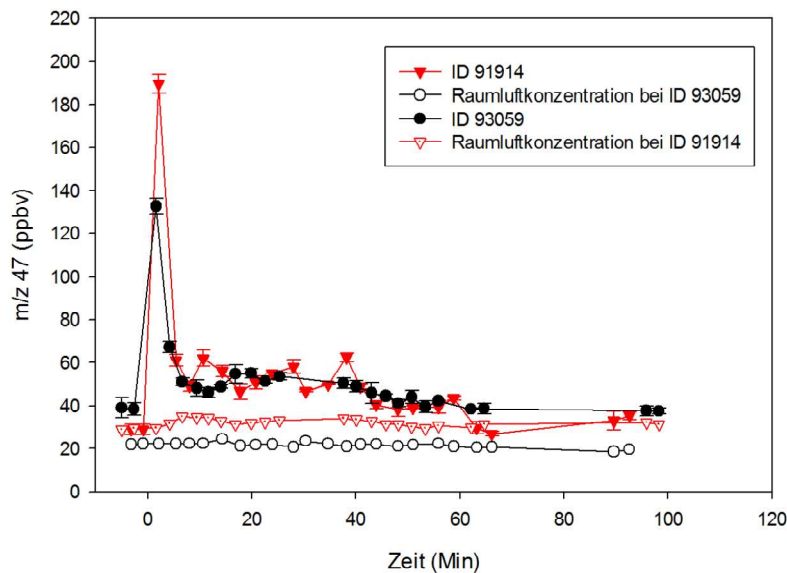


Abb. 2.12: Statisch oder linear reagierende Masse 47 mit kurzem Spike am Beispiel von zwei Probandinnen; gezeigt werden alveoläre Konzentration (als MW mit SD) und Raumluftkonzentration

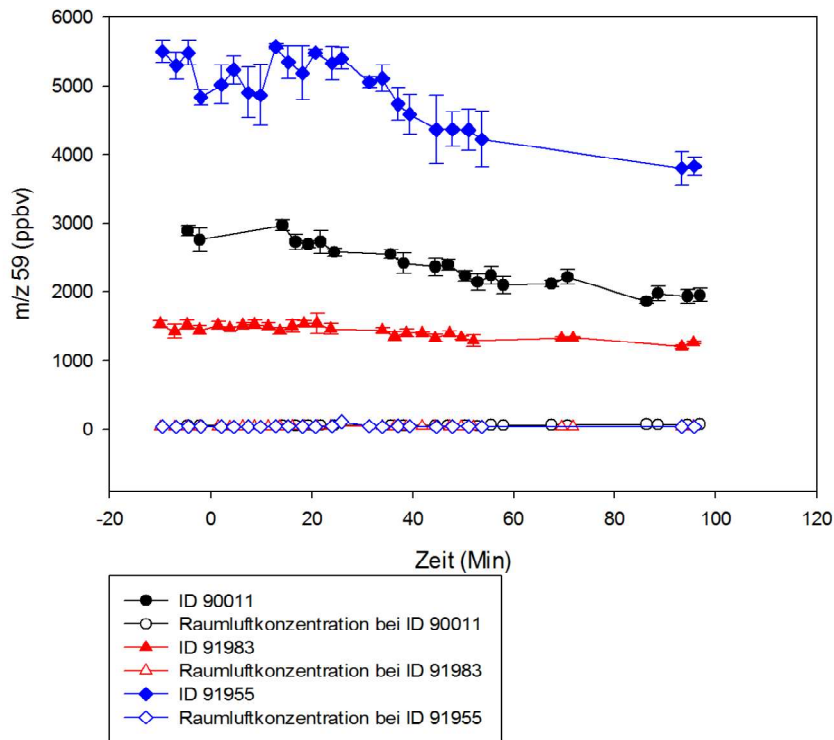


Abb. 2.13: Schwach kinetisch reagierende Masse 59 am Beispiel von drei Probandinnen; gezeigt werden alveoläre Konzentration (als MW mit SD) sowie Raumlufkonzentration

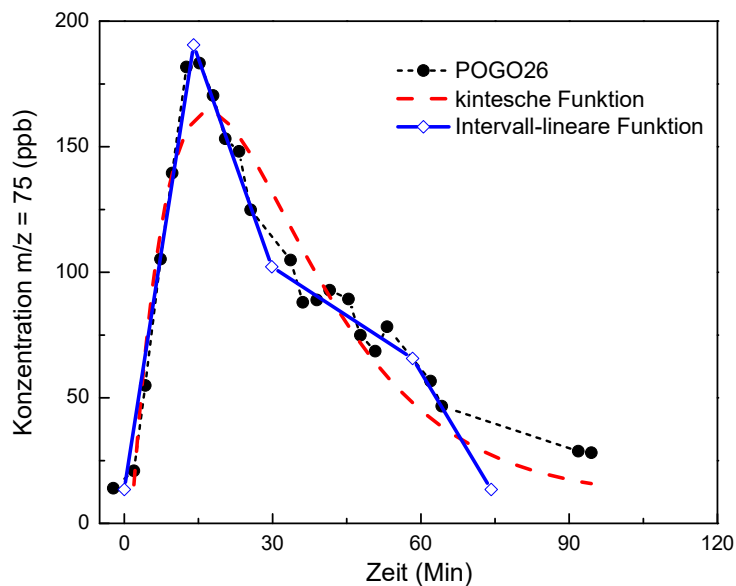


Abb. 2.14: Vergleich Kurvenfitting mit kinetischer Funktion (GDM-Studie) und segmentierter, Intervall-linearer Funktion

Die VOC-Konzentrationen aller sensitiv auf die Glukose-Challenge reagierenden Massen wurden in der Auswertung berücksichtigt. Zudem wurde die Raumlufkonzentration der Substanzen beachtet und diejenigen aussortiert, die bereits vorhandene Konzentrationen über 10% der alveolären Konzentration aufwiesen, nämlich Propanol und seine Isotope ($m/z = 41, 43, 44$). Als ebenfalls ungeeignet erwiesen sich Ammoniak ($m/z = 18$). Für die weiteren Analysen kamen daher 34 von 40 untersuchten Massen in Betracht, nämlich $m/z = 31, 33, 34, 45, 47, 48, 49, 51, 55, 57, 59, 61, 62, 63, 65, 69, 71, 72, 73, 75, 76, 77, 79, 81, 89, 90, 91, 93, 95, 97, 103, 111, 124, 135$ und 137 (siehe auch **Tab. 2.6**).

Alle Metaboliten gingen als areas under the curve (AUCs) in die Berechnungen ein. Für die Blutparameter wurde dazu die Trapezregel angewandt. Für die VOCs wurde die Fläche durch Integration über den oggtt-Zeiverlauf von 0 -120 min bestimmt (**Abb. 2.15**).

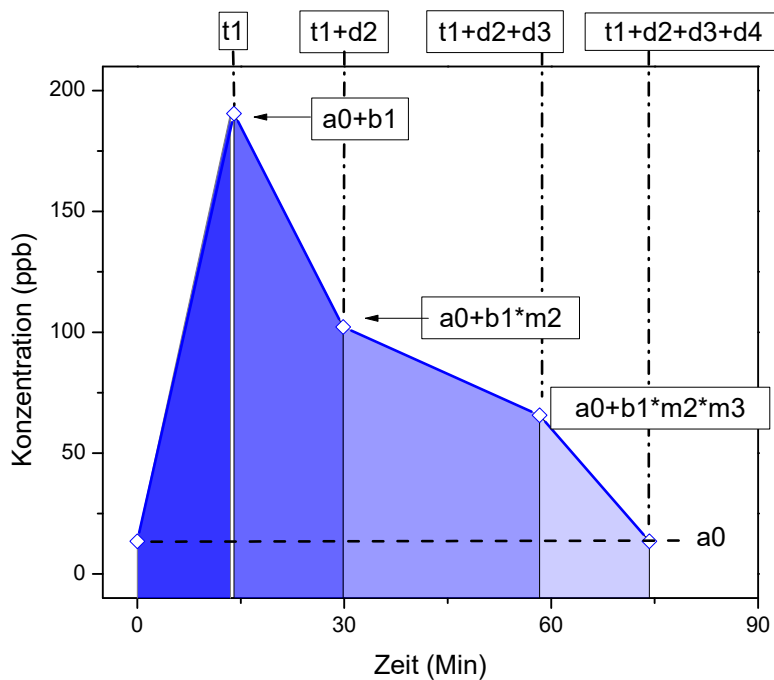


Abb. 2.15: Ermittlung der area under the curve anhand gefitteter Kurvenparameter: $AUC = A_1(\text{dunkelblau}) + A_2(\text{mittelblau}) + A_3(\text{hellblau}) + A_4(\text{wasserhell})$; t_1 ; t_1+d_2 ; $t_1+d_2+d_3$; $t_1+d_2+d_3+d_4$: Zeitpunkte markanten Verhaltens der VOC-Kurve mit jeweils zugehörigen Konzentrationen a_0 , a_0+b_1 , $a_0+b_1*m_2$, $a_0+b_1*m_2*m_3$; a_0 : basale VOC-Konzentration im Nüchternzustand

Ein Vergleich der VOC-Messungen mit diversen klinischen Parametern fand in Form einer bivariaten Korrelationsanalyse statt. Als klinische Parameter fungierten Glukosespiegel im venösen Plasma im Verlauf des oGTT, C-Peptid und Insulin im Verlauf des oGTT (jeweils dargestellt als AUC), sowie der HbA_{1c}, BMI und der Insulinsensitivitätsindex ISI (insulin sensitivity index). Dessen Berechnung erfolgt nach **Gleichung 5**. Die AUCs der Blutparameter wurden mittels Trapezregel berechnet.

$$ISI = 10000 / \sqrt{FPG} \cdot FPI \cdot (mean\ oGTTGluc \cdot mean\ oGTTIns)$$

Gl. 5

FPG: fasting plasma glucose, Nüchternplasmaglukose

FPI: fasting plasma insulin, Nüchterninsulinwert

mean oGTTGluc: mittlere Glukosekonzentration während des oGTT

Es schloss sich zur Verifizierung der gefundenen Zusammenhänge eine multiple lineare Regressionsanalyse an. Als abhängige Variablen fungierten die unterschiedlichen VOCs, als Prädiktoren wechselnde klinische Parameter. Adjustiert wurde nach Alter und Raucherstatus. Diese Confounder wurden aufgrund einer nach rationalen Gesichtspunkten hohen a-priori-Wahrscheinlichkeit für eine Beeinflussung des Gesamtmodells, sowie dem Kriterium der Objektivierbarkeit ausgewählt. Schwerpunkt der Untersuchung lag auf jenen Zusammenhängen, die sich in der Korrelationsanalyse als hochsignifikant erwiesen.

Zuletzt wurde überprüft, ob die untersuchten VOCs eine Gruppenunterteilung der Kohorte in zwei Risikoklassen erlauben. Hierfür wurden für die Probandinnen retrospektiv Punktwerte anhand des FINDRISK-Scores aus den demographischen Fragebögen erhoben. Der FINDRISK-Screening-Fragebogen dient der Identifizierung von Personen mit erhöhtem Risiko für Typ 2 Diabetes und sagt die 10-Jahres-Erkrankungswahrscheinlichkeit für einen manifesten Typ 2 Diabetes voraus und berücksichtigt dabei Alter, BMI, Familienanamnese von T2D, Ernährungsfaktoren und körperliche Aktivität (Schwarz 2009) (siehe Anhang C.3). Er unterteilt in fünf Risikokategorien, die zusammengefasst wurden in eine

Niedrigrisikokategorie mit keinem oder sehr geringem Erkrankungsrisiko und eine Hochrisikokategorie mit sehr hohem Erkrankungsrisiko und akutem Handlungsbedarf. Ein Vergleich dieser beiden Gruppen mittels Atemgasmetaboliten fand durch Mann-Whitney-U-Tests für unverbundene Stichproben sowie durch eine Hauptkomponentenanalyse (principal component analysis, PCA) statt.

Im Anschluss wurde die Diskriminationsfähigkeit der Atemluftanalyse analog zur GDM-Studie zur Einteilung der Kohorte in NGT, IFG, IGT und T2D ebenfalls mittels PCA getestet. Hierbei kommen sowohl die berechneten AUCs als auch ein Zeitparameter zum Einsatz, um die Vergleichbarkeit zur GDM-Studie zu gewährleisten.

Alle statistischen Analysen wurden durchgeführt mit der Software SigmaPlot 12.0 (Systat Software, San José, Kalifornien, USA).

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung des Probandenkollektivs (Deskriptive Datenanalyse)

Es konnten insgesamt 51 Probanden (n=49 ehemalige Schwangerschaftsdiabetikerinnen und n=2 Kinder von Schwangerschaftsdiabetikerinnen) im Zeitraum vom 9.3.2012 bis 4.5.2013 rekrutiert und in die Atemluftstudie eingeschlossen werden. Von insgesamt n=43 Müttern wurden valide VOC-Daten erhoben. Von den statistischen Analysen ausgenommen wurden 6 Datensätze von Müttern mit Gestationsdiabetes, die aufgrund methodischer Fehler (Trinken der Glukoselösung über längere Dauer, Nicht-Nüchternheit, geräteabhängiger Messfehler) keine sichere Aussage erlauben (n_{gesamt}=43). Während der Schwangerschaft wurde von 1998 bis 2009 bei allen Frauen in der Ambulanz am Klinikum Schwabing ein Gestationsdiabetes festgestellt (=Indexschwangerschaft). Der Schwangerschaftsdiabetes wurde bei n=23 Frauen (53%) diätetisch und bei n=15 Frauen (35%) mit Insulintherapie eingestellt (n=6: fehlende Daten). Die Zeit zwischen der letzten Indexschwangerschaft und dem Follow-Up-Untersuchungstermin im Rahmen der POGO-Studie betrug im Mittel 6,6 Jahre (Zeitspanne: 1,8 Jahre bis 9,4 Jahre).

Am Nachuntersuchungstermin waren circa 30% der Frauen adipös (BMI > 30kg/m²), der mittlere BMI aller Frauen lag bei 27,5kg/m² (Standardabweichung von 8kg/m²) (siehe **Tab. 3.1**). Alle 43 Teilnehmerinnen der Atemluftstudie konnten anhand von oGTT-Werten sowie HbA_{1c} eindeutig den Diagnosekategorien Typ 2 Diabetes (T2D), erhöhte Nüchtern glukose (IFG), gestörte Glukosetoleranz (IGT) und normale Glukosetoleranz (NGT) zugeordnet werden. Insgesamt 34 Studienteilnehmerinnen hatten eine normale Glukosetoleranz (79%), fünf einen erhöhten Nüchtern glukosewert (12%), zwei eine gestörte Glukosetoleranz (4,5%) und zwei litten an Typ 2 Diabetes (4,5%) (siehe **Abb. 3.1**). Beide gemessenen Kinder hatten eine normale Glukosetoleranz.

Die zwei Kinder, beides Jungen, aus dem POGO-Kollektiv wurden aus Überlegungen der Zukunftsperspektive der Methode eingeschlossen, werden aber hier nicht näher beschrieben.

Die zuletzt durchgeführte Zuordnung der Probandinnen zu den FINDRISK-Risikokategorien 1-5 mit anschließender Einteilung in Hoch- und Niedrigrisikovariante ergab einen Anteil von 35% (15 Frauen) an der Niedrigrisikogruppe und einen Anteil von 60% (26 Frauen) an der Hochrisikogruppe. Dabei verteilten sich die Probandinnen auf die einzelnen Gruppen wie

folgt: Klasse 1 (0-6 Punkte, fast kein Risiko): eine Frau; Klasse 2 (7-11 Punkte, leicht erhöhtes Risiko): 14 Frauen; Klasse 3 (12-14 Punkte, mäßig erhöhtes Risiko): sieben Frauen; Klasse 4 (15-20 Punkte, erheblich erhöhtes Risiko): 17 Frauen; Klasse 5 (über 20 Punkte, stark erhöhtes Risiko mit akutem Handlungsbedarf): zwei Frauen (siehe auch **Abb. 3.2**).

Tab. 3.1: Charakterisierung des Kollektivs für die Atemluftstudie:

	Frauen mit ehemaligem GDM (n=43) (MW±SD)	Min-Max
Alter (in Jahren)	39,95 (± 5,20)	28,1-49,1
Follow-Up (in Jahren)	6,6 (± 2,2)	1,8-9,4
Gewicht (kg)	76,9 (±24,0)	48,6-172,4
Größe (cm)	165,9 (±6,9)	154-183
BMI (kg/m²)	27,5 (± 7,95)	18,1-57,6
Tailenumfang (cm)	83,4 (± 15,0)	63-126
Hüftumfang (cm)	105,5 (± 18,0)	80-180
Systolischer Blutdruck (mmHg)	117,2 (± 15,1)	81,0-150,0
Diastolischer Blutdruck (mmHg)	77,4 (± 14,3)	43-107,5
Übergewichtige Frauen (BMI>25 und <30 kg/m²)	6 (13%)	
Adipöse Frauen (BMI>30 kg/m²)	11 (25%)	
Raucherstatus (ja)	11 (26%)	
Atemwegsinfektion (ja)	8 (18%)	
Medikamenteneinnahme (ja)	15 (35%)	

Max: größter Wert; Min: kleinster Wert; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung

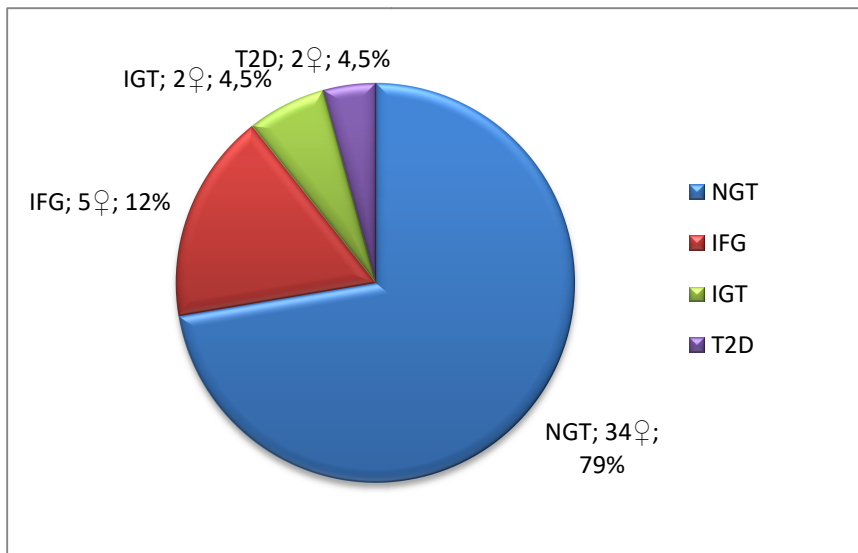


Abb. 3.1: Ergebnisklassifikation der Stoffwechselsituation anhand von oGTT und HbA_{1c} (z.B.: IGT; n = 2; 4,5%: Diagnosekategorie; Anzahl Probandinnen; prozentualer Anteil am Kollektiv)

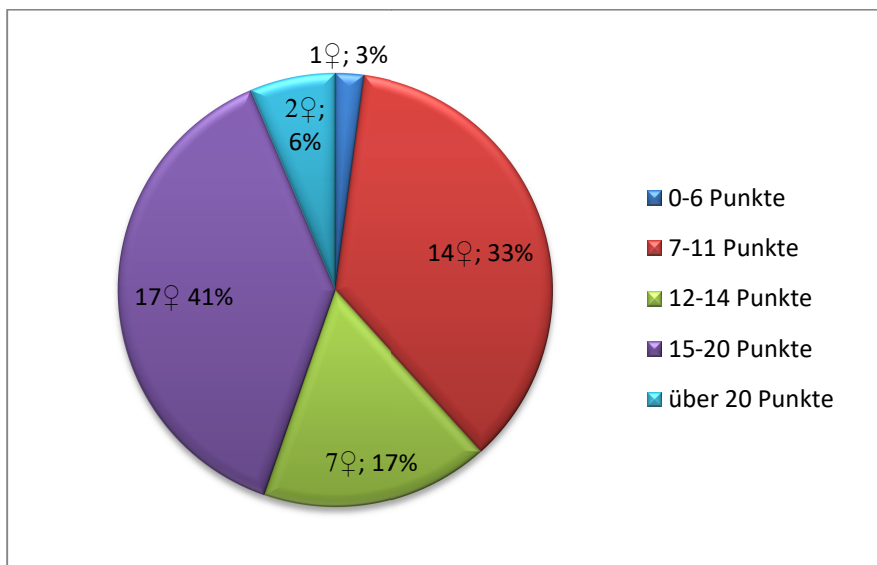


Abb. 3.2: Zuteilung der Probandinnen zu den einzelnen Risikoklassen des FINDRISK-Scores

Um Faktoren zu berücksichtigen, die für eine Beeinflussung der Atemgasmessungen verantwortlich sein können, wurden Daten zum Raucherstatus der Teilnehmerinnen, ihrer Medikamenteneinnahme und subjektiven Erkältungssymptomen (Husten, Halsschmerzen, Rhinitis) in einem separaten Fragebogen erhoben (siehe Anhang).

Zu ihrem aktuellen Raucherstatus gaben zehn Frauen (23%) an, regelmäßig zu rauchen, eine Frau gelegentlich (3%), 30 Frauen waren Nichtraucherinnen (69%).

Die Einnahme von Medikamenten zum Zeitpunkt der Messung oder in den Wochen davor wurde bei 43 Frauen erfragt. 15 Frauen bestätigten eine regelmäßige oder bedarfsmäßige Medikation (35%), wobei drei Frauen L-Thyroxin in unterschiedlichen Dosen einnahmen (7%) und vier Frauen eine hormonelle Kontrazeption angaben (9%). Vier weitere Frauen berichteten die Einnahme von Betablockern (9%), zwei die Anwendung von Antiallergika (5%) bei Bedarf. In Einzelfällen wurde berichtet über die Einnahme von Mesalazin, Enalapril, Eisen, Metformin, Jodid und Loperamid. Es nahmen 16 Frauen je ein Medikament ein (37%), zwei nahmen je zwei Medikamente (5%) (siehe **Tab. 3.2**).

Tab. 3.2: Übersicht über Medikamenteneinnahme:

Medikament	N
Betablocker	4 (9%)
Hormonelle Kontrazeption	4 (9%)
L-Thyroxin	3 (7%)
Antiallergika	2 (5%)
Jodid	1 (2%)
Enalapril	1 (2%)
Mesalazin	1 (2%)
Loperamid	1 (2%)
Eisen	1 (2%)
Metformin	1 (2%)

Von 43 Frauen berichteten acht (18%) über aktuell bestehende Erkältungssymptome. Für die weitere Auswertung wird dabei die Tatsache einer bestehenden Infektion als wichtig erachtet, nicht jedoch Ort (oberer/unterer Atemwegsinfekt) oder Pathophysiologie (viral/bakteriell) der Entzündung.

3.2 Verhalten der Stoffwechselfparameter im Verlauf des oGTT

Typischerweise unterliegen die drei Stoffwechselfparameter Insulin, Glukose und C-Peptid im Verlauf eines oGTT einer dynamischen Kinetik, moduliert durch die aktuelle β -Zellfunktion des Probanden. Personen mit NGT haben demzufolge für alle drei Parameter Peakwerte nach etwa 30 bis 60 Minuten. Bei Personen mit IGT steigen alle Werte auch nach 60 Minuten weiter an, durchschnittlich auf höhere Maximalwerte als bei Personen mit NGT. Personen mit IFG starten definitionsgemäß bereits mit höheren Nüchternwerten und erreichen etwa zur gleichen Zeit wie NGT-Probanden maximale Werte, die aber höher angesiedelt sind (Abdul-Ghani 2006).

In der POGO-Kohorte bestätigen sich diese Trends (**Abb. 3.3**).

Peak-Glukosewerte werden durchschnittlich von der NGT-Subgruppe nach 30 Minuten erreicht (142,5mg/dl), ebenso schnell erreicht die IFG-Gruppe einen Höchstwert, der aber höher liegt (175,5mg/dl). Die IGT-Subgruppe hat nach 60 Minuten einen mittleren Maximalwert von 214,3mg/dl.

Ein ebensolches Bild kann von Peak-Insulinwerten gezeichnet werden, die Kurve der IFG-Werte ähnelt in ihrer Steigung derjenigen der NGT-Gruppe, allerdings werden höhere Spitzenwerte erzielt (66,1 μ U/ml vs. 136,3 μ U/ml) und sie werden von beiden Gruppen nach 60 Minuten erreicht. Die Insulinkurve der IGT-Gruppe steigt flacher an und hat ihren Höhepunkt nach 90 Minuten bei 174,4 μ U/ml. Danach fällt sie kaum ab (120 Minuten Wert 174,2 μ U/ml).

Ähnlich verlaufen auch die Kurven der C-Peptidwerte, allerdings mit Maximalwerten der NGT- und IFG-Gruppe nach 60 Minuten (8,9 μ g/l vs. 11,3 μ g/l) und der IGT-Gruppe nach 120 Minuten (14,5 μ g/l).

Peakwerte des Gesamtkollektivs werden nach 30 Minuten (Glukose: 149,1mg/dl), respektive nach 60 Minuten erreicht (Insulin: 78,8 μ U/ml; C-Peptid: 9,2 μ g/l). In allen Fällen folgt also der Anstieg von Insulin- und C-Peptidwerten dem Anstieg des Blutglukosespiegels mit circa 30 Minuten Verzögerung. Die Betrachtung der AUCs zeigt einen mittleren Glukose-Wert von 14.954,6mg/dl, einen mittleren Insulin-Wert von 6.922,4 μ U/ml und einen mittleren C-Peptid-Wert von 878,69 μ g/l mit erwartungsgemäß recht großen Standardabweichungen.

Der durchschnittliche HbA_{1c} liegt bei 5,5%.

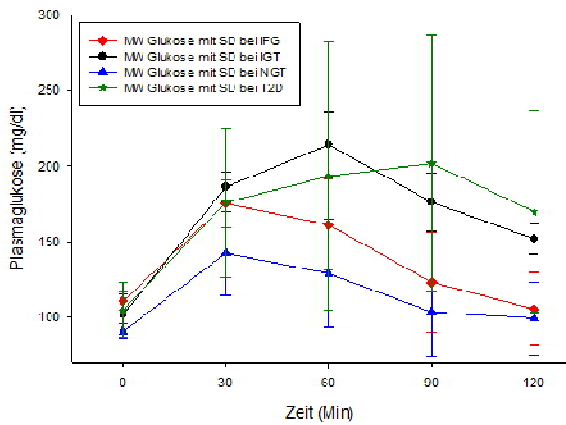
Ein weiterhin zur Anwendung kommender Wert ist ISI (insulin sensitivity index). Die Ermittlung erfolgte durch Berechnung aus Insulin- und Glukosewerten nach Gleichung 5. Tabelle 3.3 zeigt die gemessenen Werte in Zusammenschau.

Tab. 3.3: Übersicht über klinische Parameter:

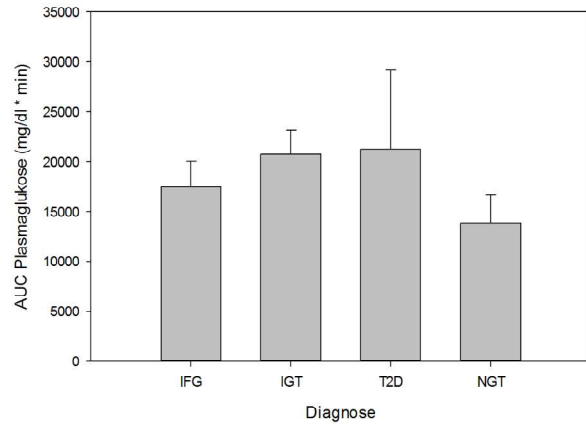
	Frauen mit ehemaligem GDM (n=43) (MW±SD)	Min-Max
Glukose 0min	94,0 (± 9,9)	81-118
Glukose 30min	149,1 (± 30,9)	99-217
Glukose 60min	137,4 (± 44,0)	66-256
Glukose 90min	112,8 (± 40,4)	58-262
Glukose 120min	104,6 (± 31,1)	65-217
AUC Glukose	14.954,6 (± 3690,5)	9.405-26.895
Insulin 0min	7,8 (± 6,9)	0,1-40,3
Insulin 30min	57,9 (± 36,1)	4,6-197,6
Insulin 60min	78,8 (± 58,7)	9,4-248,1
Insulin 90min	64,2 (± 56,7)	12,2-289,6
Insulin 120min	51,7 (± 53,5)	10,7-299,5
AUC Insulin	6.922,4 (± 4.869)	1.114,5-23.025
HbA _{1c} (%)	5,5 (± 0,5)	4,6-6,7
C-Peptid 0min	1,9 (± 0,9)	0,6-5,4
C-Peptid 30min	6,6 (± 2,3)	3,4-12,3
C-Peptid 60min	9,2 (± 3,5)	3-19,1
C-Peptid 90min	8,6 (± 3,4)	3,3-17,1
C-Peptid 120min	7,9 (± 3,3)	3,6-19
AUC C-Peptid	878,7(± 307,9)	373-51692
ISI	7,3 (± 3,3)	0,8-23,5

ISI: insulin sensitivity index; Max: größter Wert; Min: kleinster Wert; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung

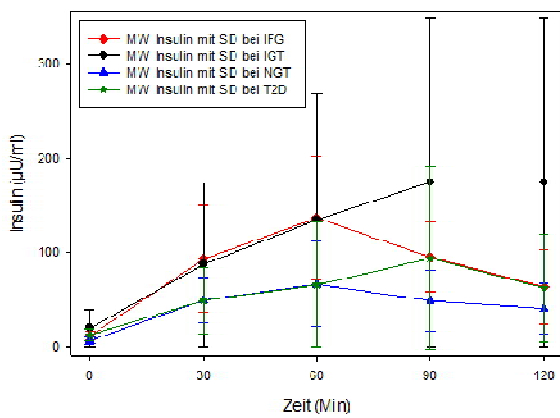
a) Plasmaglukoseverläufe alle Gruppen



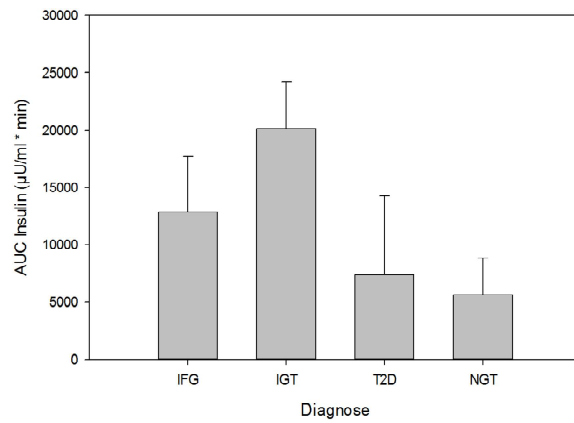
Säulendiagramm Plasmaglukose



b) Insulinverläufe alle Gruppen



Säulendiagramm AUC Insulin



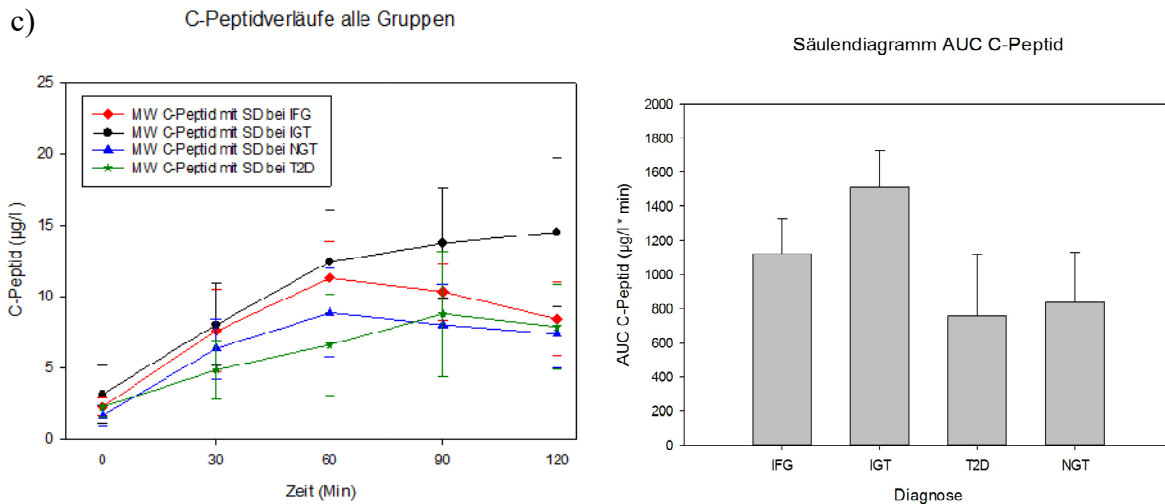


Abb. 3.3: a) Plasmaglukose, b) Insulin und c) C-Peptid des POGO-Kollektivs (aufgeschlüsselt nach Diagnosekategorien) im Verlauf des 75g-oGTT; gezeigt werden MW und SD

3.3 Verhalten der VOC-Signale im Verlauf des oGTT

Wie in Kapitel 2.4 erläutert, zeigen die gemessenen VOC-Signale charakteristisches Verhalten im Verlauf eines oGTT (siehe auch **Tab. 3.4**). Es lassen sich drei Reaktionsmuster unterscheiden: kinetisch, linear und linear mit kurzem anfänglichem Spike (siehe **Abb. 3.4**). Eine Sonderstellung kommt dem Aceton zu, dessen Reaktion als schwach kinetisch bezeichnet werden kann.

Tab. 3.4: Kategorisierung der Massen nach Reaktionskinetik

Kinetik	Massen (m/z)
L	49,55,63,69,81,91,95,97,103,111,124,135,137
P	18,41,43,44,57,61,62,71,72,73,75,76,77,79,89,90,93,
S	31,33,34,45,47,48,51,65

P: Peak-Bildung, L: lineare Kinetik, S: lineare Kinetik mit Spike

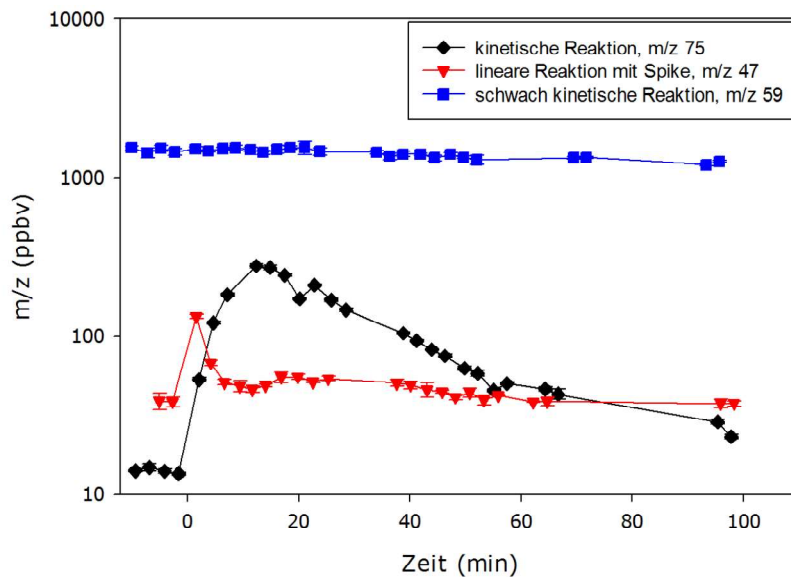


Abb. 3.4: Übersicht über die typischen VOC-Konzentrationsänderungen nach Glukose-Aufnahme am Beispiel dreier Probandinnen; gezeigt sind MW pro Messblock mit SD
Tab. 3.4: Übersicht über typisches Verhalten der VOCs nach Glukose-Challenge

Die kinetischen Massen 18, 43, 44, 57, 61, 62,71, 72, 73, 75, 77, 79, 89, 90 und 93 ähneln in ihrem Verhalten demjenigen der Blutmetaboliten (siehe **Abb. 3.3**). Einem steilen Konzentrationsanstieg in den ersten 15 Minuten folgt ein langsamerer Abfall über ca. 75 Minuten, bis nach etwa 90 Minuten wieder nahezu Ausgangswerte erreicht werden. Die maximalen Konzentrationen liegen dabei je nach Masse bei einem Vielfachen der Nüchternkonzentration. Abbildung 3.5 zeigt die einzelnen Atemzüge aller Probandinnen beispielhaft für Masse 75.

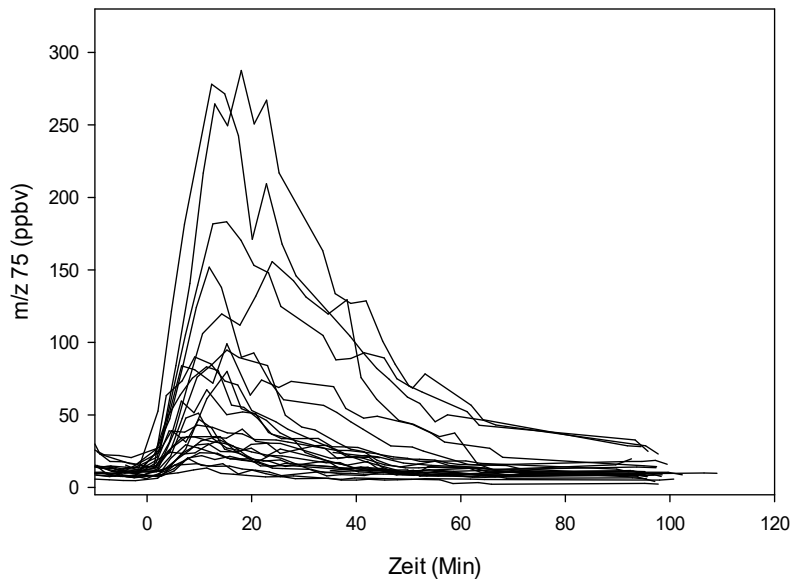


Abb. 3.5: Kinetischer Konzentrationsverlauf der Masse 75

Im Gegensatz dazu verhielten sich die Massen 31, 41, 49, 55, 63, 69, 81, 91, 97, 103, 111, 124, 135 und 137 annähernd linear, bei manchen Massen wurde ein leichter Anstieg oder Abfall der Konzentration gesehen.

Eine Besonderheit tritt bei den Massen 33, 34, 45, 47, 48, 51 und 65 auf. In den ersten Minuten nach Trinken der Glukoselösung ist ein kurzer, über wenige Minuten sich aufbauender, sehr steiler Konzentrationsanstieg beobachtbar, der ebenso rasch wieder abfällt (**Abb. 3.6**). Im weiteren Verlauf ist lineares Verhalten charakteristisch. Die genannten Massen sind den Alkoholen zuzuordnen (Methanol, Ethanol, Propanol und ihre Isotope). Aufgrund der engen zeitlichen Umschreibung ist anzunehmen, dass der Alkohol-Peak durch exogen zugeführte Substanzen ausgelöst wird. Zu den Inhaltsstoffen der Glukose-Trinklösung gehört neben Glukosesirup (Mono-/Oligosaccharide entsprechend 75g Glukose) auch Kaliumsorbat, Johannisbeermuttersaft und 0,01-0,06 Vol-% Ethanol (entsprechend 0,0024-0,0144g Ethanol in 300ml Saft). Diese Menge kann während der ersten Expirationen leicht detektiert werden. Eine metabolische Reaktion als Ursache für den Spike ist unwahrscheinlich.

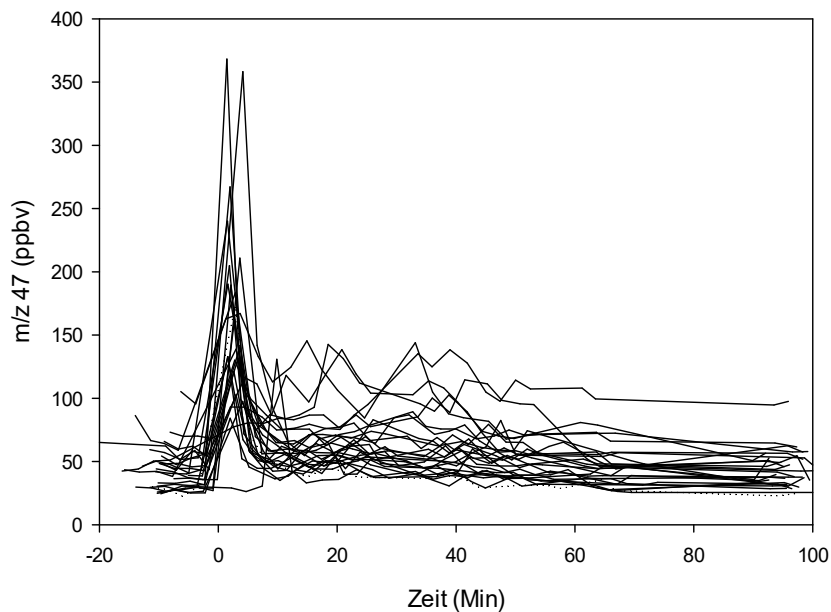


Abb. 3.6: Linearer Konzentrationsverlauf mit Spike, Masse 47; alle Probandinnen sind dargestellt

Eine Sonderstellung nimmt Masse 59 ein. Aceton ($m/z = 59$), das in der GDM-Studie als kinetische Masse klassifiziert worden war, kann dank der höheren Zeitauflösung nun genauer beschrieben werden als schwach kinetische Masse (Abb. 3.7). Nach Glukoseaufnahme erfolgt ein zunächst stärkerer, dann ein leichter, relativ kontinuierlicher Konzentrationsabfall. Diese Reaktion ist als physiologisch aufzufassen. Die verstärkte Lipolyse im Hungerstoffwechsel nimmt mit Einsetzen einer stärkeren Insulinausschüttung, initiiert durch die Glukoseaufnahme, ab. Dadurch wird auch die Ketonkörpersynthese aus freien Fettsäuren gehemmt. Nicht bei allen Probandinnen kann ein kinetisches Signal beobachtet werden, oftmals nimmt die Konzentration der Masse 59 linear ab.

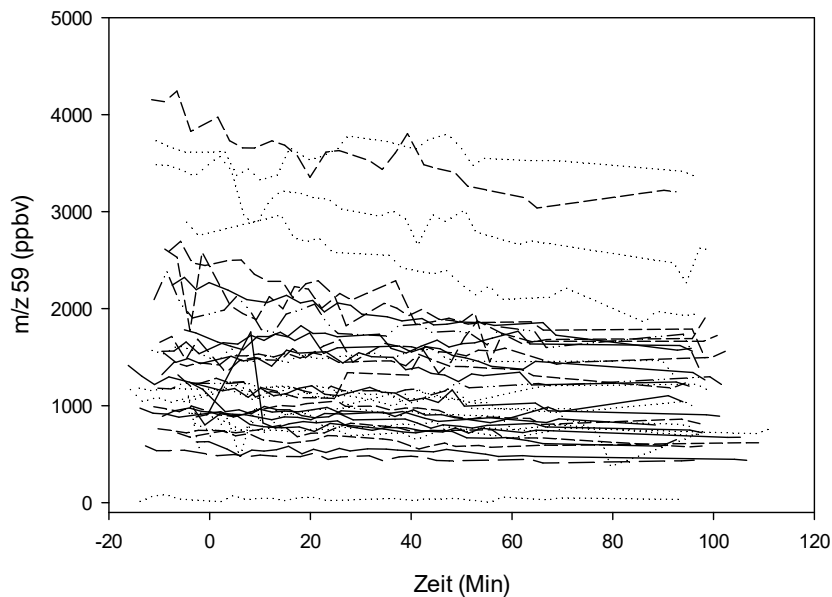


Abb. 3.7: Teilweise schwach kinetisches oder lineares Signal von Masse 59; alle Probandinnen sind dargestellt

3.4 Vergleich von Atemluft- und Blutparametern

Um Assoziationen zwischen den klinischen Werten Insulin, C-Peptid, Blutglukose und HbA_{1c}, BMI sowie Insulinsensitivitätsindex ISI mit den Atemluftmetaboliten zu finden, wurde die bivariate Korrelationsanalyse genutzt. Es wurden alle klinischen - mit allen Atemgasdaten korreliert.

Zur Berechnung wurden areas under the curve verwendet. Diese wurden von Insulin, Blutglukose und C-Peptid ebenso wie von allen VOCs erhoben und jeder Wert mit jedem korreliert.

Es schloss sich zur Quantifizierung der Stärke der gefundenen Zusammenhänge eine multiple lineare Regressionsanalyse an. Ein wichtiger Gesichtspunkt ist dabei die Berücksichtigung vorher festgelegter konfundierender Variablen. Es wurde kontrolliert nach Alter und Raucherstatus.

Auffällige Ergebnisse waren signifikante Korrelationen zwischen den Risikoparametern des T2D und 14 von 34 untersuchten VOCs (Tab 3.4).

Tab. 3.4: Signifikante Korrelationen zwischen den AUCs der Laborparameter mit den AUCs der Atemgasparameter

VOC	Glucose	Insulin	C-Peptid	HbA _{1c}	ISI	BMI
	AUC	AUC	AUC	Nüchtern		kg/m ²
	(n=43)	(n=43)	(n=43)	(n=43)	(n=43)	(n=43)
	r	r	r	r	r	R
m/z 33	-0,385Φ	-0,313Φ	-0,385	-0,236	0,354*	-0,221
m/z 34	-0,455Φ	-0,378Φ	-0,311Φ	-0,204	0,331*	-0,286*
m/z 49	0,036	0,167	0,081	0,071	-0,146	0,307*
m/z 57	0,497Φ	0,291	0,249	0,381*	-0,393Φ	0,123
m/z 59	-0,341	-0,336*	-0,296	-0,133	0,459Φ	-0,384*
m/z 63	-0,364Φ	-0,301*	-0,141	-0,202	0,316*	-0,144
m/z 71	0,549Φ	0,242	0,195	0,429*	-0,328*	0,171
m/z 73	0,266	-0,033	-0,087	0,328*	-0,159	0,064
m/z 75	0,148	0,193	0,321*	-0,111	-0,201	0,085
m/z 95	0,322*	0,221	0,265*	0,347*	-0,337*	0,246
m/z 97	0,378*	0,335*	0,191	0,433Φ	-0,346*	0,392*
m/z 103	0,463*	0,317	0,273	0,479Φ	-0,349*	0,193
m/z 111	0,506Φ	0,331	0,26	0,502Φ	-0,355*	0,232
m/z 135	0,442Φ	0,206	0,079	0,421Φ	-0,263	0,306*

Signifikanzniveau: * : $p_{adj} \leq 0,05$; Φ : $p_{adj} \leq 0,01$

Zunächst fällt auf, dass die Parameter meist moderat, mit Korrelationskoeffizienten zwischen $r = -0,286$ und $r = 0,549$ zusammenhängen.

Besonders starke Assoziationen gibt es zwischen den Massen 71 und 57 (Methacrolein und Acrolein), deren chemische Verwandtschaft naheliegend ist, mit Glukose, HbA_{1c} und ISI ($r = 0,549$ bis $r = -0,328$; $p_{adj} = 0,002$ bis $p_{adj} = 0,036$).

Interessant ist, dass einige Atemluftparameter mit fast allen Blutparametern korrelieren, z.B. Masse 34 (Methanol). Sie korreliert hochsignifikant positiv mit Glukose ($p_{\text{adj}}=0,002$), Insulin ($p_{\text{adj}}=0,007$) und C-Peptid ($p_{\text{adj}}=0,025$), zudem signifikant mit ISI ($p_{\text{adj}}=0,014$) und dem BMI ($p_{\text{adj}}=0,048$). Masse 33 ist ein Isotop von Masse 34 und zeigt dementsprechend ähnliche Verknüpfungen mit Glukose, Insulin und ISI, nur mit C-Peptid, HbA_{1c} und BMI bestehen keine Zusammenhänge. Der HbA_{1c} ist mit beiden Substanzen unkorreliert.

Schwangere Probandinnen zeigten 2012 in der GDM-Studie eine starke negative Assoziation zwischen Methanol und dem BMI ($r=-0,433$). Postpartum bestätigt sich dieser Zusammenhang in abgeschwächter Form ($r=-0,286$).

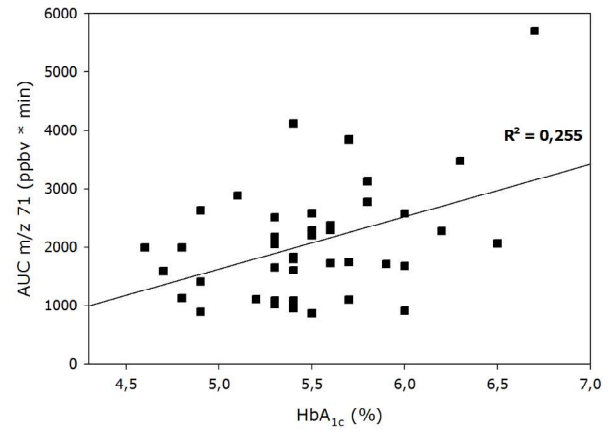
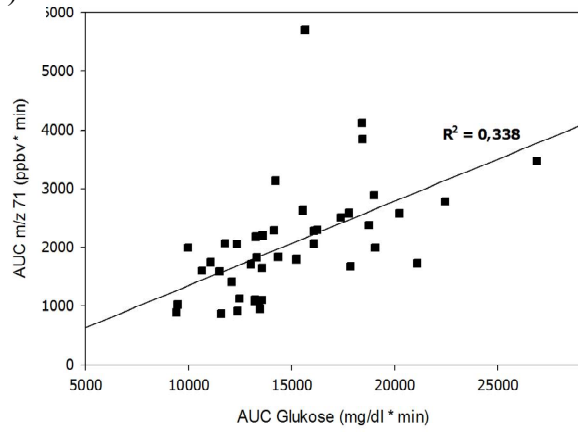
Mit Glukose ($p_{\text{adj}}=0,015$), Insulin ($p_{\text{adj}}=0,036$), HbA_{1c} ($p_{\text{adj}}=0,005$) und BMI ($p_{\text{adj}}=0,012$) ist zudem Masse 97 (Dimethylfuran) signifikant und positiv, mit ISI ($p_{\text{adj}}=0,027$) signifikant und negativ korreliert.

Moderate bis starke Assoziationen mit Glukose ($r=0,506$), HbA_{1c} ($r=0,502$) und ISI ($r=-0,355$) zeigt auch Masse 111 (Oktanol).

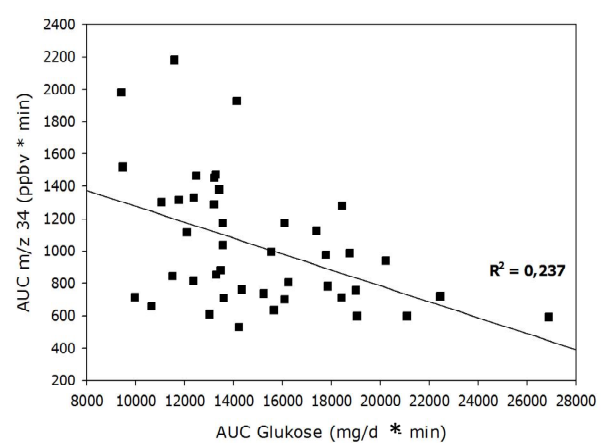
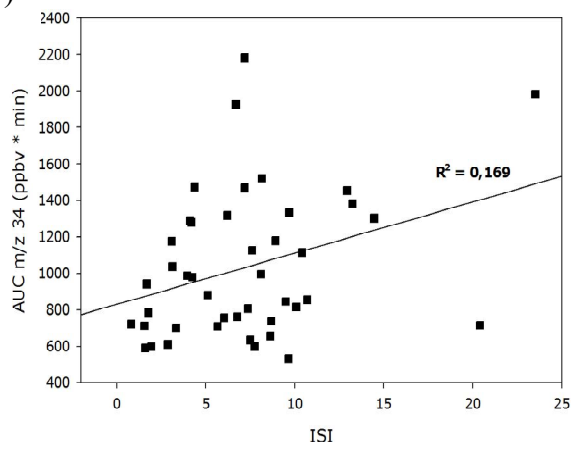
Andere Zusammenhänge bestätigen Ergebnisse aus aktueller Forschung. Masse 59 (Aceton) ist physiologisch eng verknüpft mit Insulin ($r=-0,336$; $p_{\text{adj}}=0,039$) und damit auch mit dem Insulinsensitivitätsindex ISI ($r=0,459$; $p_{\text{adj}}=0,039$). Die Korrelation mit Glukose ist bisher umstritten und zeigt auch in unseren Analysen einen lediglich schwach negativen Zusammenhang ($r=-0,341$; $p_{\text{adj}}=0,01$).

Abbildung 3.8 zeigt exemplarisch einige der gefundenen Zusammenhänge.

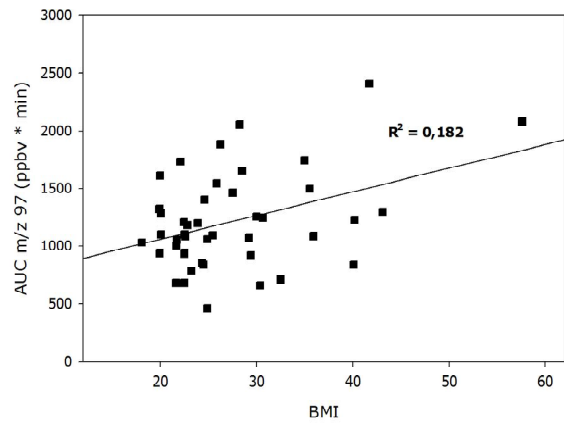
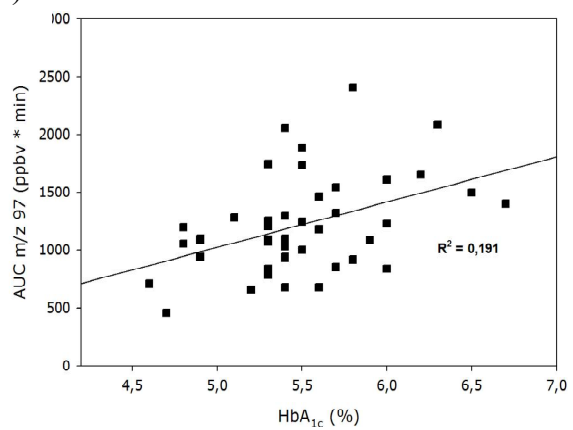
a)



b)



c)



d)

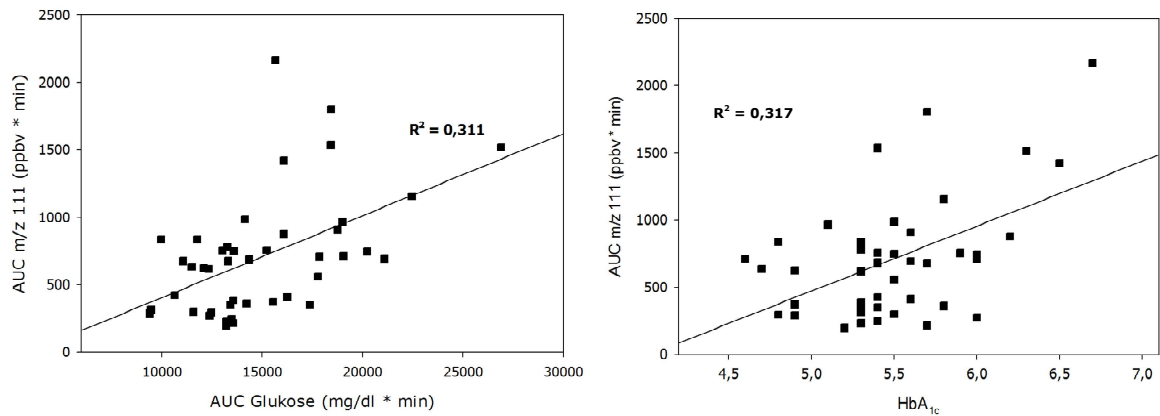


Abb. 3.8a) Korrelationen zwischen m/z = 71 und Glukose/HbA_{1c}, mit Regressionsgerade
b) Korrelationen zwischen m/z = 34 und ISI/Glukose, mit Regressionsgerade
c) Korrelationen zwischen m/z = 97 und HbA_{1c}/BMI, mit Regressionsgerade
d) Korrelationen zwischen m/z = 111 und Glukose/HbA_{1c}, mit Regressionsgerade

3.5 Gruppenvergleiche

3.5.1 Normoglykämische vs. dysglykämische Gruppe

Um zu testen, ob sich die Subgruppierung des Kollektivs in verschiedene Diagnosekategorien auch in den exhalieren Atemluftmetaboliten abbildet, wurde ein Gruppenvergleich mittels Hauptkomponentenanalyse (principal component analysis, PCA) durchgeführt. Die Einteilung in IFG, IGT, T2D und NGT erfolgte analog zur GDM-Studie. Damals erfolgte die Trennung anhand des damals eingeführten Zeitparameters μ . Hier konnte nun auf den verfeinerten Fit-Parameter $t1+d2$ zurückgegriffen werden (siehe auch **Abb. 2.13**).

Als Variablen kamen 18 VOCs zum Einsatz.

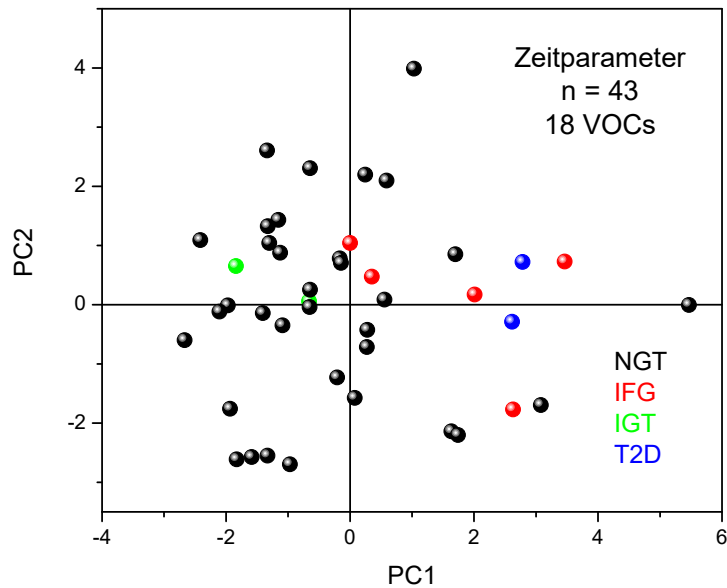


Abb. 3.9: PCA zur Gruppenseparation in IFG, IGT, T2D und NGT anhand des Fitparameters $t1+d2$

Abbildung 3.9 zeigt, dass eine Dimensionsreduktion der komplexen Daten mittels einiger Hauptkomponenten nicht möglich ist, da keine der untersuchten Variablen allein einen genügend großen Einfluss auf die Varianz der Daten hat. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass eine Gruppenseparation anhand der gemessenen VOC-Konzentrationen nicht möglich ist. Graphisch stellt sich dies als fehlende räumliche Separation dar.

Ein ähnliches Bild zeigt sich bei Verwendung der AUCs der VOCs, anhand derer ebenfalls keine klare Gruppentrennung gelingt (Abb. 3.10). Hier wurde die Trennung mit 14 VOCs versucht, namentlich denjenigen, die sich in Korrelations- und Regressionsanalyse mit den Blutparametern assoziiert gezeigt hatten. Faktor 1 (PC 1, principal component) scheint einen größeren Einfluss auf ein Clustering der Daten zu haben als Faktor 2, dennoch ist eine Trennung anhand der Atemgasdaten allein derzeit noch nicht möglich.

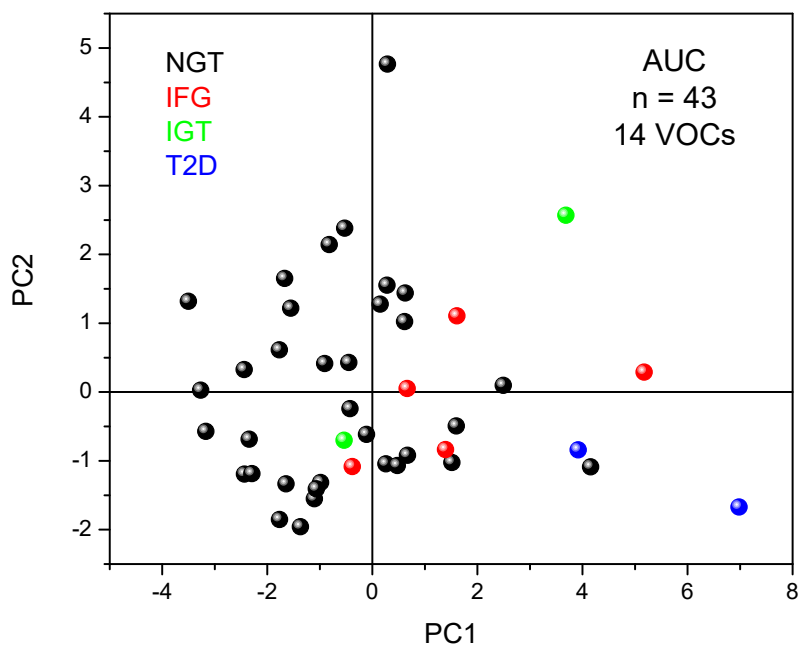


Abb. 3.10: PCA zur Trennung in IFG, IGT, T2D und NGT anhand der AUCs

3.5.2 Hoch- und Niedrigrisikogruppe nach FINDRISK

Eine erkennbare Subgruppierung der Kohorte in eine Hoch- und eine Niedrigrisikogruppe wurde danach anhand der o.g. 18 bzw. 14 VOCs untersucht. Wieder fungierten der Fitparameter $t1+d2$ (**Abb. 3.11**) sowie die AUCs der VOCs als Diskriminierungsvariablen (**Abb. 3.12**). In der Hauptkomponentenanalyse zeigten sich keine Zusammenhänge zwischen den untersuchten Massen und der Hoch- und Niedrigrisikogruppe, definiert über den FINDRISK-Score.

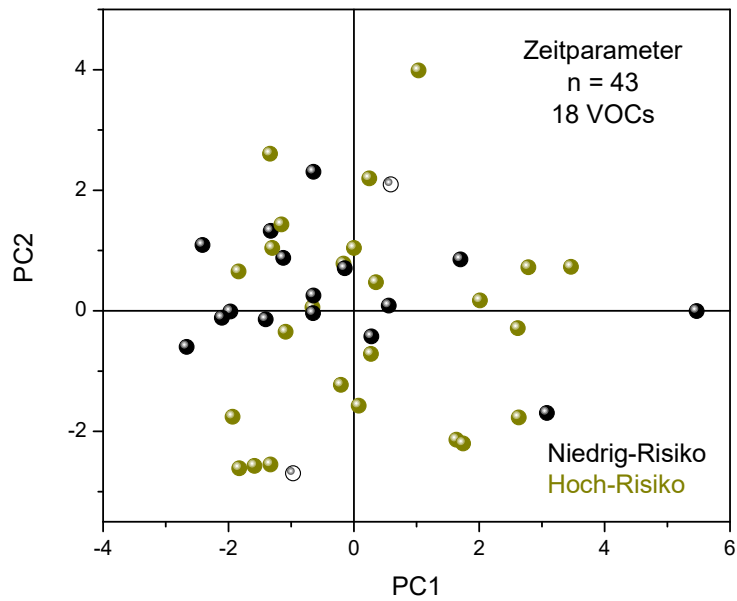


Abb. 3.11: PCA für eine Gruppenseparation nach FINDRISK-Risikokategorien anhand des Fitparameters $t1+d2$

Abbildung 3.11 zeigt eine lockere Streuung der Datenpunkte entlang der zwei gewählten Hauptkomponenten. Eine Gruppierung, die auf einen größeren Einfluss auf die Datenvarianz erklären würde, lässt sich anhand des Fitparameters $t1+d2$ nicht zeigen.

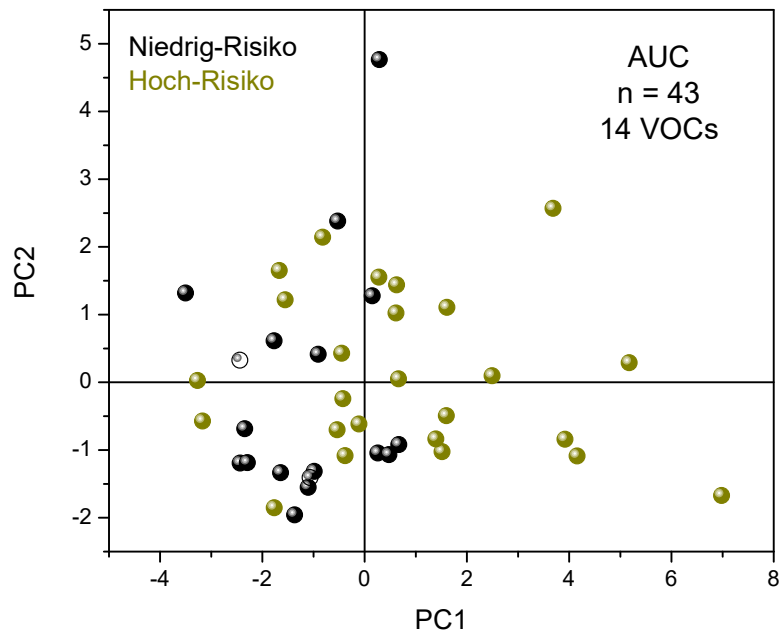


Abb. 3.12: PCA zur Gruppenseparation in eine Hoch- und eine Niedrigrisikogruppe anhand der AUCs der VOCs

Die klinische Einteilung der Probandinnen in Hoch- und Niedrigrisikogruppe kann anhand der AUCs der hier untersuchten 14 VOCs nicht nachvollzogen werden. Ein verstecktes Muster im Datensatz liegt nicht vor.

4. Diskussion

4.1 Allgemeiner Teil: Rationale für den Einsatz der Atemluftanalyse in der Früherkennung des Typ 2 Diabetes

Angesichts der weltweit stark steigenden Inzidenz des Typ 2 Diabetes nehmen Prävention und Früherkennung der Erkrankung eine zunehmend wichtige Rolle ein (Guariguata 2014). Besondere Bedeutung kommen Früherkennung und Sekundärprävention speziell dann zu, wenn prädisponierende Faktoren bei den Patienten vorhanden sind. Dazu zählt – neben dem Alter, der genetischen Disposition und der Adipositas – auch ein durchgemachter Gestationsdiabetes.

Die Methoden der Früherkennung und Diagnostik stützen sich bislang ausschließlich auf die Analyse im Blut gelöster Substanzen, nämlich Glukose, Insulin, C-Peptid und HbA_{1c}.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das „Fenster zum Metabolismus“, das die nicht-invasive Atemluftanalyse mit der hochsensitiven Massenspektrometrie bietet, auf ihre Nutzbarkeit vor Ausbruch der Erkrankung und in frühen Erkrankungsstadien zu untersuchen.

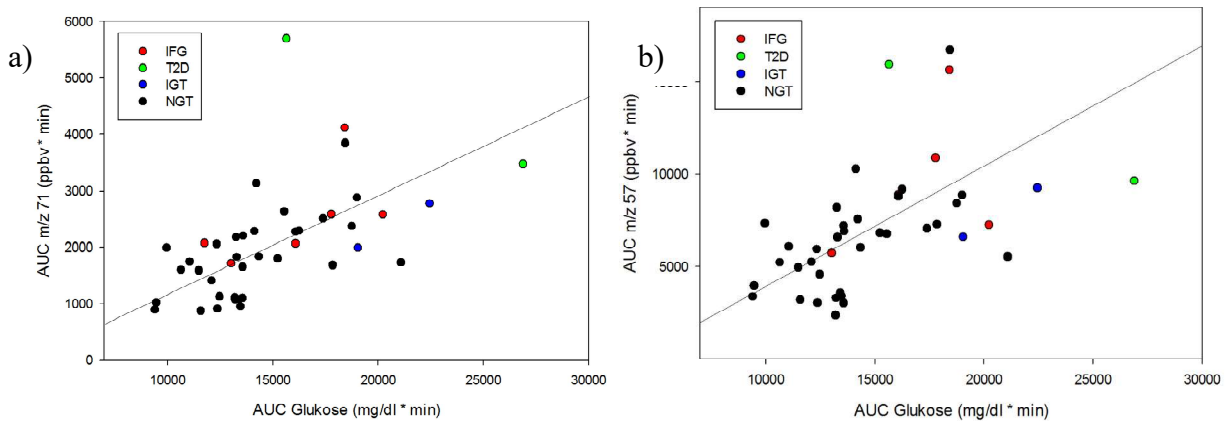
Hierfür prüften wir in einer Substudie der POGO-Studie die Zusammenhänge zwischen Blut- und Atemgasmolekülen an n=43 ehemaligen Gestationsdiabetikerinnen (Hummel 2013). Bemerkenswert ist, dass ein großer Teil der exhalieren Substanzen mit Blutparametern korreliert, insgesamt 14 von 34 untersuchten Massen (x = 41%). Besonders starke Zusammenhänge zeigten dabei Methacrolein (m/z = 71) und Acrolein (m/z = 57) mit Glukose und dem HbA_{1c}. Auch Oktanal, ein Aldehyd, (m/z = 111) ist damit relativ eng verknüpft. Eine chemische Verwandtschaft der beiden Massen ist aufgrund des hohen Korrelationskoeffizienten wahrscheinlich (Pearson's r für m/z = 111 und m/z = 57: r=0,863) (siehe auch Abb. 4.2). Einige der Massen korrelieren mit fast allen klinischen Parametern, zum Beispiel Masse 34 (Methanol), Masse 59 (Aceton) und Masse 95 (Phenol).

Zur sicheren diagnostischen Klassifizierung der Patienten anhand der Atemgasmoleküle nutzten wir 18 VOCs in der Hauptkomponentenanalyse, analog zur GDM-Studie (Halbritter 2012). Eine Subgruppierung der Kohorte anhand der Atemgasdaten alleine war jedoch nicht möglich.

4.2 Oxidativer Stress bei Prädiabetes- messbar in der Expirationsluft?

Mehrere frühere Arbeiten zum Thema bekräftigen die Hypothese, dass die Konzentrationen einzelner VOCs in Abhängigkeit von bestimmten Erkrankungen oder metabolischen Zuständen stark erhöht sein können (Smith 2007). Untersuchungen von Shirasu und Touhara deuten darauf hin, dass Menge und Zusammensetzung von emittierten VOCs sich bei entzündlichen oder endogenen metabolischen Störungen verändern (Shirasu 2011).

Die Rolle von Acrolein und Methacrolein stand aber bislang nicht im Vordergrund. Das Wissen über Acrolein und seine Rolle bei Entstehung und Fortschreiten von Insulinresistenz und T2D sowie bei diabetischen Komplikationen ist aus Untersuchungen am Mausmodell und in vitro bekannt (Uesugi 2004) (Conklin 2010) (Stevens 2008). Neu ist, dass diese beiden hochreaktiven und toxischen Aldehyde auch in der Ausatemluft prädiabetischer Patientinnen eng mit dem Glukosespiegel korrelieren. Abbildung 4.1 zeigt diese Zusammenhänge in Abhängigkeit von Diagnosekategorien. Die wahrscheinlich enge chemische Verwandtschaft der Substanzen wird in Abbildung 4.2 deutlich.



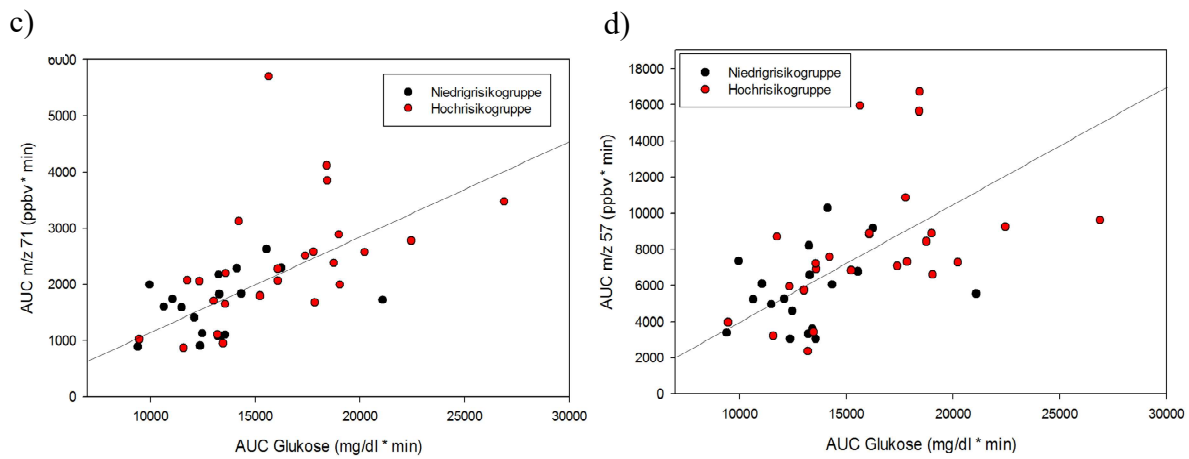


Abb. 4.1: a), c) Korrelation von Glukose mit Methacrolein; b), d) Korrelation von Glukose mit Acrolein; dargestellt sind jeweils Diagnose- und Risikokategorien

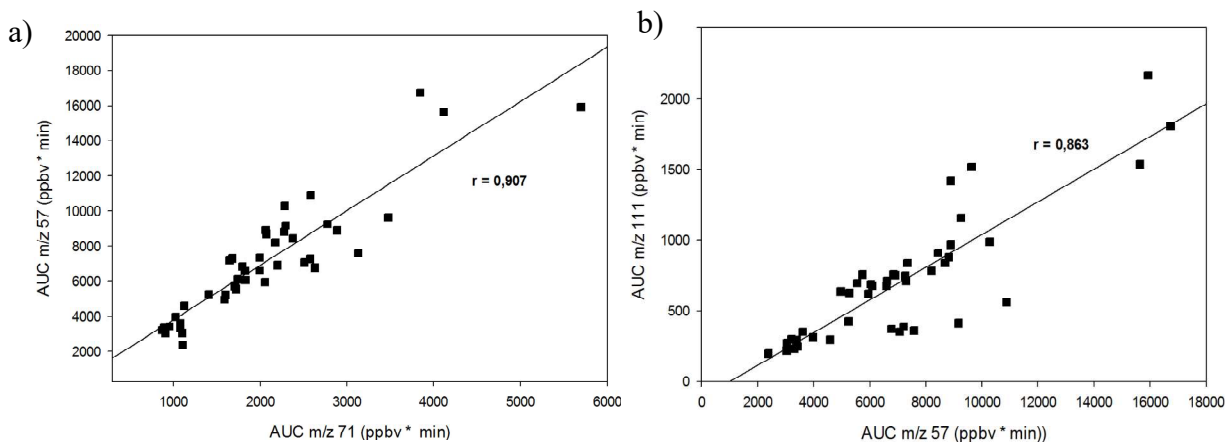


Abb. 4.2: Korrelation zwischen a) m/z = 57 und m/z = 71: $r=0,907$; $p<0,0001$ und zwischen b) m/z = 57 und m/z = 111: $r=0,863$; $p<0,0001$

Es fällt auf, dass insbesondere die Atemgas-Werte der prädiabetischen Probandinnen (IFG, IGT, T2D) bzw. der Hochrisikopatientinnen (nach FINDRISK) hohe Beträge annehmen (Mann-Whitney-U-Test: Medianwerte der beiden Gruppen Hoch-/Niedrigrisiko sind signifikant unterschiedlich bei $p=0,02$ für $m/z = 57$ und $m/z = 71$). Eine mögliche Erklärung hierfür bietet die Biologie der freien Radikale. Zahlreiche Studien postulieren den Zusammenhang zwischen freien Radikalen, oxidativem Stress und der Genese von Insulinresistenz und T2D (Henriksen 2011) (Rains 2011).

Die Mediatoren des oxidativen Stresses sind die sogenannten ROS (reactive oxygen species), die durch Reduktion molekularen Sauerstoffs in der Zelle entstehen. Dazu zählen das Superoxid-Anion $O_2^{\cdot-}$, Wasserstoffperoxid H_2O_2 und das Hydroxylradikal $\cdot OH$. Die bedeutendsten Quellen sind die Atmungskette der Mitochondrien und das Enzym NADPH-Oxidase. In mäßigen Mengen haben diese reaktiven Spezies physiologische Aufgaben, wie zum Beispiel die Zerstörung phagozytierter Erreger in Leukozyten. In großen Mengen stören sie das Redoxpotential der Zelle, indem sie Scavenger-Mechanismen wie das Glutathion-System (GSSG/2GSH) oder das $NADP^+/NADPH$ -System überlasten. Durch ihre enorme Reaktionsfreude können sie Strukturen wie Lipide, Proteine, Proteinkinasen und Phosphatasen schädigen und so intrazelluläre Signalwege verändern. Zustände oxidativen Stresses wurden nachgewiesen bei Hyperglykämie, UV-Exposition und erhöhter Aufnahme freier Fettsäuren mit der Nahrung.

Hyperglykämische Zustände scheinen in besonderem Maße dazu zu führen, dass Glukose verstärkt über den Polyol-Pathway abgebaut wird (Abb. 4.3). Hierbei wird NADPH-abhängig Sorbitol und in einem weiteren Schritt Fructose produziert. Die Schädigung des Gewebes resultiert hier indirekt durch den Verbrauch der Antioxidantien Glutathion und NADPH.

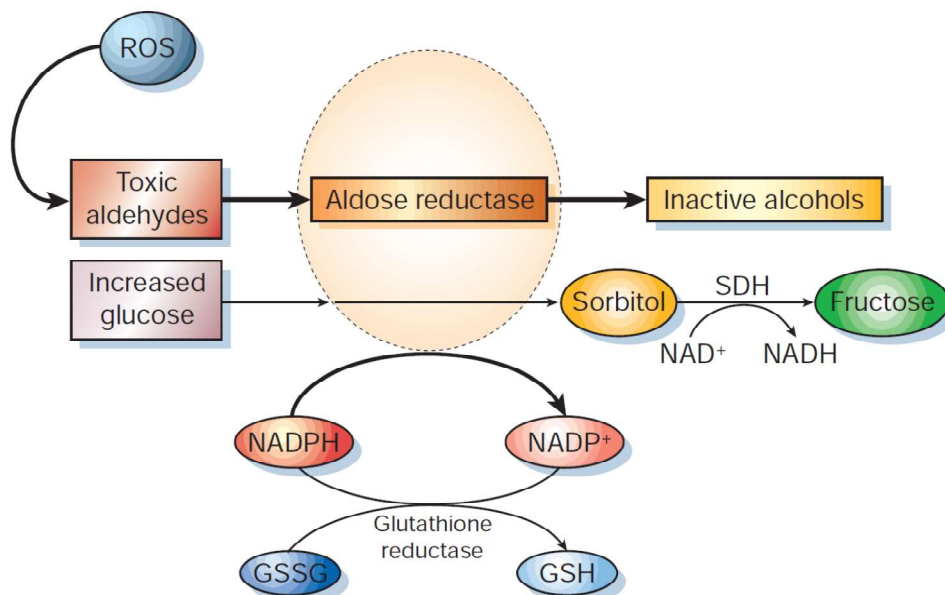


Abb. 4.3: Polyol-Pathway mit physiologischer Wirkung (oben, Reduktion toxischer Aldehyde) und verstärktem Glukose-Fluss bei Hyperglykämie (Brownlee 2001)

Es kann hier angenommen werden, dass die oben genannten toxischen Aldehyde Acrolein und Methacrolein in eben jenem Stoffwechselweg nicht mehr suffizient inaktiviert werden können, wenn das Enzym Aldose-Reduktase durch Glukose überlastet wird. Möglicherweise spiegelt sich dieser Zustand oxidativen Stresses in der Atemgasanalyse wider, da hier erhöhte Konzentrationen der Massen 57 und 71, aber auch 111 gemessen werden können. In diesem Falle wäre die erhöhte Aldehydkonzentration im Atem ein Produkt des zellulären Stoffwechsels.

Selbstverständlich ist auch eine andere Herkunft denkbar. So ist Acrolein ein bekannter, ubiquitär vorkommender Umweltschadstoff (Uchida 1998). Möglicherweise führt eine erhöhte Konzentration in der Inspirationsluft zur verstärkten exhalatorischen Abgabe von Acrolein, ein Mechanismus, der für verschiedene Substanzen gut beschrieben ist (Phillips 1999).

Des Weiteren konnten Uchida et al. bereits 1998 durch immunhistochemische Untersuchungen proteingebundenes Acrolein in atherosklerotischen Plaques und deren Mediatoren, den oxidierten LDL-Partikeln, nachweisen. Die Arbeitsgruppe schlägt vor, dass die nicht-enzymatische Bildung von Acrolein aus freien Fettsäuren (Arachidonsäure, Linolsäure) aus Zellmembranen unter Mitwirkung freier Radikale überall in biologischen Systemen geschehen kann (Lipidperoxidation). Acrolein wurde daraufhin mit mehreren Krankheitsentitäten, die mit oxidativem Stress einhergehen, in Zusammenhang gebracht, darunter die Alzheimer-Krankheit, die amyotrophe Lateralsklerose und COPD. Medina-Navarro et al. konnten einige Jahre später beweisen, dass Acrolein direkt durch freie Radikale aus der Auto-Oxidation von Glukose gebildet werden kann und präsentierten damit einen alternativen Stoffwechselweg der Bildung von advanced glycation end products (AGEs) (Medina-Navarro 2004). Weitere Endprodukte einer Lipidperoxidation sind die Aldehyde Hexanal, Heptanal und Malondialdehyd, die von Corradi et al. im Kondensat exhalierter Luft (exhaled breath condensate, EBC) von COPD-Patienten in verstärktem Maße nachgewiesen werden konnten (Corradi 2003). Zusammenfassend kann man also sagen, dass in unserer Studie auch bisher nicht diagnostizierte Erkrankungen unserer Probandinnen als Quelle der gemessenen Aldehyde in Frage kommen, entweder durch Diffusion von einem Fokus oder durch AGE-geschädigtes Lungengewebe (Watson 2010) (van den Borst 2010).

4.3 Methanol im Atemgas und das Mikrobiom

Als weiteres auffälliges Ergebnis unserer Analysen zeigte sich das Verhältnis von Methanol zu verschiedenen Stoffwechselmetaboliten des Blutes, darunter Insulin, Glukose, BMI und ISI. Bereits seit 1952 ist bekannt, dass Methanol im Atem von Gesunden vorkommt (Henderson 1952). Turner et al. konnten in einer longitudinalen Studie mit 30 gesunden, kaukasischen Probanden zeigen, dass Methanol in der Ausatemluft aller Menschen vorkommt (Turner 2006). Einer bestimmten Krankheitsentität konnte die Substanz allerdings bisher nicht zugeordnet werden.

Bekannte Quellen sind zum einen exogen inhaliertes Methanol, das aufgrund industrieller Nutzung (beispielsweise als Lösungs- oder Reinigungsmittel) fast ubiquitär in der Umwelt vorkommt (Fisher 2000) (Ernstgard 1999). Zum anderen wird es von Pflanzen produziert und aufgrund seiner Flüchtigkeit in die Umgebung abgegeben (Polkinghorne 2005).

Endogen synthetisiertes Methanol kann in geringem Umfang aus der Hypophyse stammen (Axelrod 1965). Dass die Bakterien des Kolons in der Lage sind, Methanol aus Polysacchariden zu produzieren, konnte bereits 1940 von Kertesz et al. belegt werden (Siragusa 1988). Filipiak et al. wiesen 2012 in vitro über dem Gasraum einer *Streptococcus pneumoniae*-Kultur nach 6stündiger Inkubationszeit Methanol nach (Filipiak 2012). Auch nach Genuss süßer Getränke und Früchte, sowie bei der Verstoffwechslung des synthetischen Süßstoffes Aspartam wurden vorübergehend größere Mengen beobachtet (Lindinger 1998) (Fisher 2000).

Die wichtige Rolle des Mikrobioms bei der Produktion abgeatmeten Methanols wird laut erstem Fazit des Human Microbiome Projects (HMP) 2012 deutlich. Die Ergebnisse der Untersuchung, in die rund 5000 Proben eingeschlossen worden waren, zeigen, dass der menschliche Körper etwa 10.000 Mikrobenarten beherbergt, der menschliche Darm etwa 500-1000. 86% der Darmbakterien blieben bei den Analysen „funktionell uncharakterisiert“. Dennoch gelten Menge und vor allem Zusammensetzung des Mikrobioms des Verdauungstraktes als mit ursächlich für die Entstehung und Aufrechterhaltung verschiedener Erkrankungen, darunter auch Diabetes mellitus und Übergewicht (The Human Microbiome Project Consortium 2012) (Sekirov 2010).

Eine Reduktion der Methanolkonzentration in der Expirationsluft bei Adipositas konnte von verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt werden (Turner 2006) (Aprea 2012). Auch die GDM-Studie von 2012 belegte diese Erkenntnis durch eine enge negative Korrelation zwischen abgeatmetem Methanol, und dem präkonzeptionellen BMI. Das POGO-Kollektiv zeigte postpartum eine signifikante, schwach negative Korrelation ($r = -0,286$; $p_{\text{adj}} = 0,048$) (siehe **Abb. 4.4**).

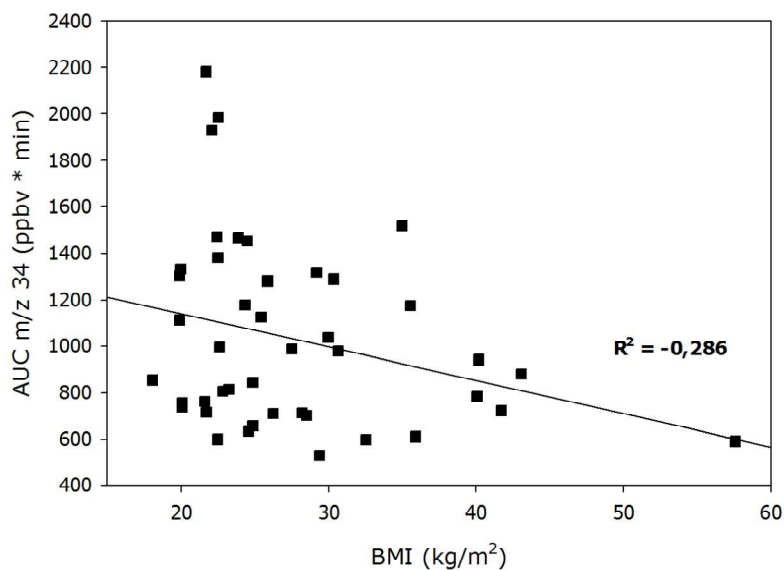


Abb. 4.4: Korrelation zwischen m/z = 34 und dem BMI im POGO-Kollektiv

Zahlreiche Arbeiten belegen eine eingeschränkte Motilität verschiedener Abschnitte des Verdauungstrakts bei Diabetikern (Deboer 1992) (Hebbard 1996).

Sims et al. konnten zeigen, dass während hyperglykämischer Episoden sowohl gastrokolischer Reflex als auch Kolonperistaltik auch ohne vorliegende vegetative Neuropathie eingeschränkt sind und nahmen an, dass hierin eine mögliche Ursache für die typische Obstipation des Diabetikers liegen könnte (Sims 1995). Ein verlängertes Verweilen des Speisebreis im Kolon führt natürlicherweise zu einer verlängerten Kontaktzeit mit den Kolonmikroben. Darunter befinden sich zahlreiche methylorophe Organismen, die in der Lage sind, Substanzen mit nur einem Kohlenstoffatom zu verstoffwechseln (Methanol, Methan).

Tatsächlich ist das Wissen über im Verdauungstrakt gebildete VOCs sehr lückenhaft (Vitali 2010). Wir können aber annehmen, dass das im Kolon produzierte Methanol aus dem Abbau komplexer Polysaccharide und Proteine rasch von methanogenen Bakterien wie *Methanobrevibacter smithii* umgesetzt wird. Damit trägt *M. smithii*, das immerhin 10% der Masse aller Anaerobier ausmacht, entscheidend zur Energiegewinnung des Menschen bei. McNeil et al. schätzten den Anteil auf etwa 10% (McNeil 1984).

In metagenomischen Studien mit Mäusen konnte nachgewiesen werden, dass in genetisch übergewichtigen Mäusen die Archaeen, zu denen *M. smithii* zählt, überrepräsentiert sind (Samuel 2007). Die dadurch höhere Energieausbeute aus der aufgenommenen Nahrung kann einen Beitrag zu Übergewicht und Adipositas leisten.

Laut unseren Daten findet sich eine negative Korrelation zwischen Plasmaglukose und abgeatmetem Methanol (siehe **Abb. 4.5**). Möglicherweise ist dies auf eine gesteigerte Utilisation der zuvor aufgenommenen Zuckerlösung zurückzuführen. Dass die Unterschiede in der Methanol-Konzentration der Expirationsluft auch zwischen prädiabetischen und phänotypisch gesunden Probandinnen signifikant sind, zeigt **Abb. 4.6**.

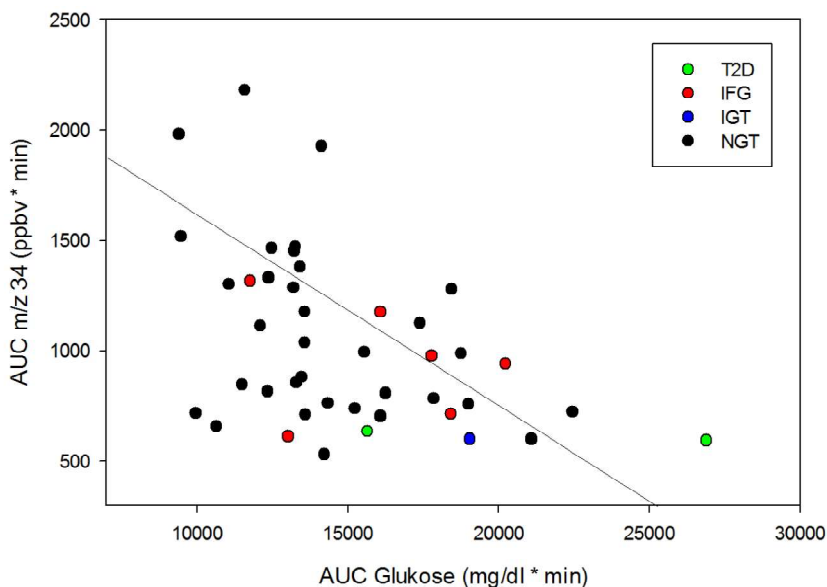


Abb. 4.5: Korrelation zwischen Glukose und Methanol ($r = -0,455$; $p_{adj} = 0,002$); dargestellt sind AUCs; Diagnosekategorien farbig

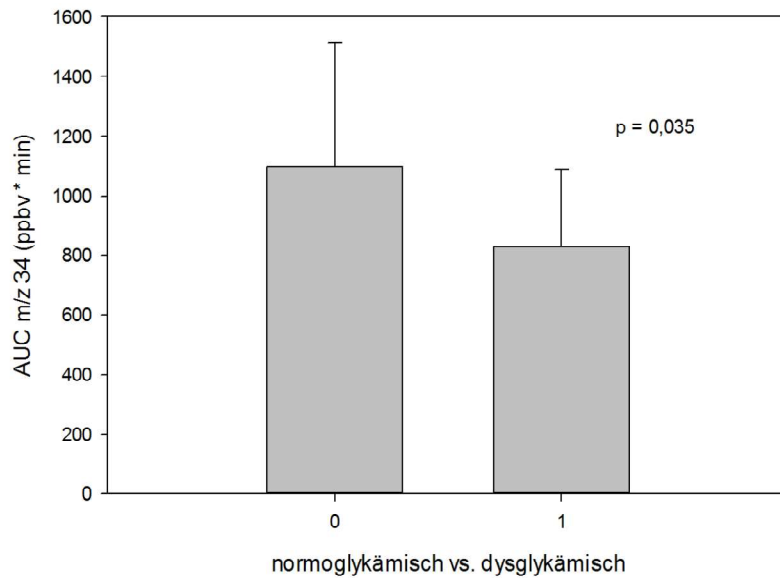


Abb. 4.6: mediane Methanolkonzentration (als AUC) in der Expirationsluft der normoglykämischen und der dysglykämischen Gruppe; Unterschied der Mediane ist signifikant bei $p = 0,035$ (Mann-Whitney-U-Test)

Eine weitere Hypothese für die verringerte Methanol-Abatmung diabetischer und prädiabetischer Patienten stammt von Vitali et al. 2010. Sie konnten herausarbeiten, dass das im Darm entstehende Methanol in Leber und Darm mit freien Fettsäuren (short chain fatty acids, SCFAs) verestert wird. SCFAs sind in großer Menge im Darm zu finden, da sie aus unvollständig verdauten Kohlenhydraten (zum Beispiel Ballaststoffen) von Darmbakterien produziert werden. Dazu zählen unter anderem Essigsäure, Valeriansäure und Buttersäure. Durch die Veresterung entsteht beispielsweise Methylacetat aus Methanol und Essigsäure (Vitali 2010).

Die Insulinresistenz prädiabetischer Patienten kann durch eine unvollkommene Wirksamkeit des ausgeschütteten Insulins eine erhöhte endogene Fettsäurekonzentration hervorrufen (Anderwald 2011). Stehen freie Fettsäuren dann in größerer Menge zur Veresterung zur Verfügung, so wird das gebildete Methanol in verstärktem Maße irreversibel gebunden und kann nicht abgeatmet werden. Es resultiert die von uns beobachtete niedrigere Atemgaskonzentration von Methanol bei prädiabetischen Probandinnen.

Eine alternative Hypothese schlagen Kistler et al. vor, die den Einfluss der Zusammensetzung der Nahrung an Mäusen untersuchten. Sie fütterten die Labormäuse zunächst mit einem

Standardfutter, das relativ faser-, und damit ballaststoffreich ist. Dann wurde für 4 Wochen mit aufgereinigter, faserarmer Kost mit unterschiedlichem Fettgehalt und unterschiedlicher Fettqualität gefüttert. Die erstaunlichen Ergebnisse zeigten, dass am Mausmodell weniger der Körperfettgehalt, also der BMI, als mehr die Zusammensetzung des Futters mit der abgeatmeten Methanolkonzentration assoziiert waren. Die Schlüsse, die die Arbeitsgruppe daraus zieht, geben der Rolle der Ernährung ein größeres Gewicht. Eine veränderte Zusammensetzung des Mikrobioms oder veränderte enzymatische Aktivitäten bei Adipositas werden als geringerfügige Faktoren erachtet (Kistler 2014). Auch beim Menschen ist diese Gewichtung denkbar.

4.4 Klassifikation der Kohorte

Wie bereits in Kapitel 3.5 gezeigt, konnte eine Subgruppierung der Probandinnen in normale oder pathologische Glukosetoleranz anhand der Atemgasmetabolite nicht vorgenommen werden. Die Gründe dafür liegen vor allem in der breiten interindividuellen, aber auch intraindividuellen Streuung der gemessenen VOC-Konzentrationen im Probandenkollektiv. Diese Tatsache ist gut bekannt aus früheren Arbeiten anderer Arbeitsgruppen und darf zu einem gewissen Anteil als physiologisch gelten (Kistler 2014) (Smith 2011). Jedoch muss der Einfluss von Störvariablen berücksichtigt werden.

Abbildung 4.7 zeigt die Stellschrauben im Kreislauf der VOCs, die mögliche Störungen bewirken können. So ist das Einwirken von Faktoren an den Ansatzpunkten Aufnahme, Synthese, Verstoffwechslung und Ausscheidung der VOCs denkbar.

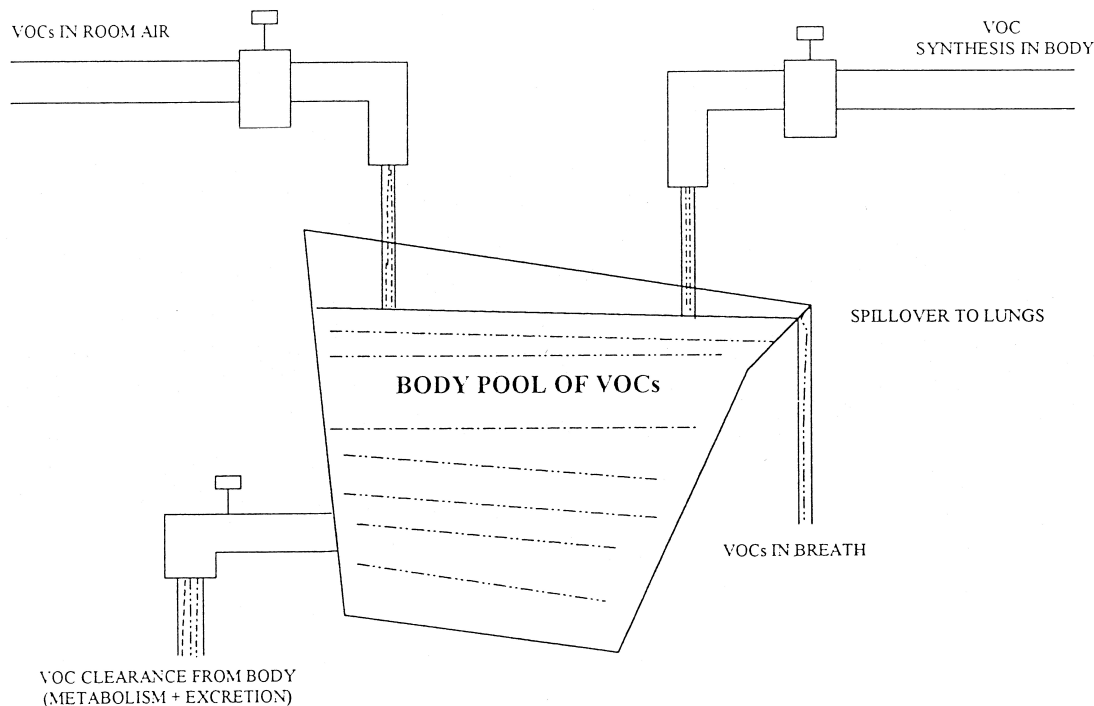


Abb. 4.7: Herkunft, Verteilung und Ausscheidung von VOCs im Körper (Phillips 1999): was letztlich im Atem gemessen wird, unterliegt zuvor variablen Prozessen.

Laut unseren Daten nimmt beispielsweise die mittlere Nüchternkonzentration von Aceton ($m/z = 59$) Werte zwischen 461,8 ppbv und 7.100,9 ppbv an. Ursachen für die Variabilität sind im Fall des Acetons bekannt, so existiert eine nachgewiesene Alters- und Geschlechtsabhängigkeit, sowie eine tageszeitliche Schwankung, Abhängigkeit vom Fastenstatus und der Zusammensetzung der zuvor aufgenommenen Nahrung (Storer 2011) (Minh 2012).

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch die Arbeitsgruppen um Lin et al., die Daten der NHANES- Befragung (National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2000) von 385 US-Bürgern auswerteten und Smith et al., die 2011 in einem Review die generelle Anwendbarkeit der Massenspektrometrie zur Kontrolle des Diabetes mellitus untersuchten. Beide betonen die hohe Wahrscheinlichkeit, mit der sowohl Raucherstatus, als auch BMI, Geschlecht und Alter Einfluss auf Konzentration und Zusammensetzung der VOC-Signale haben (Lin 2008) (Smith 2011).

Lin et al. bekräftigen vor allem die Rolle des Rauchens, da es zu oxidativem Stress führt, Zellen der Atemwege schädigt und exogene VOCs zuführt, drei Effekte, die sich in den

Messungen widerspiegeln, beispielsweise in höheren Ethan- und Pentankonzentrationen. Filipiak et al. diskutieren zudem schwankende physiologische Einflüsse, wie die Zusammensetzung des Mikrobioms des Verdauungstraktes, speziell der Mundhöhle, das seinerseits VOCs freisetzt und das Herzminutenvolumen, das eine variable Lungenperfusion bedingen kann und somit die Menge der freigesetzten VOCs vom Blut in die Alveolen beeinflusst (Filipiak 2012).

Unklar bleibt zudem weiterhin die Wichtung der einzelnen Confounder, denn nicht jeder der genannten Parameter beeinflusst jedes VOC. Auch ist das Ausmaß der Beeinflussung in vielen Fällen unklar.

Die von uns berücksichtigten Störfaktoren sind das Alter und der Raucherstatus, da diese Daten eindeutig abzufragen sind, was eine bessere Reproduzierbarkeit und Nachvollziehbarkeit mit sich bringt. Zusätzlich von den Probandinnen erfragte Daten über die Einnahme von Medikamenten oder aktuell bestehende klinische Infektzeichen brachten trotz größtmöglicher Sorgfalt eine größere Subjektivität mit sich. Wegen der damit verbundenen potentiellen Verzerrung der Ergebnisse klammerten wir diese Parameter aus unseren Untersuchungen aus. Eine an unseren Daten durchgeführte explorative Analyse der oGTT-Werte nominell gesunder Probandinnen (NGT) offenbarte dennoch deutliche Unterschiede in den oGTT-Werten von Frauen, die L-Thyroxin einnehmen und Frauen, die das nicht tun. Signifikant war der Unterschied allerdings nur beim Nüchternwert (**Abb. 4.8**).

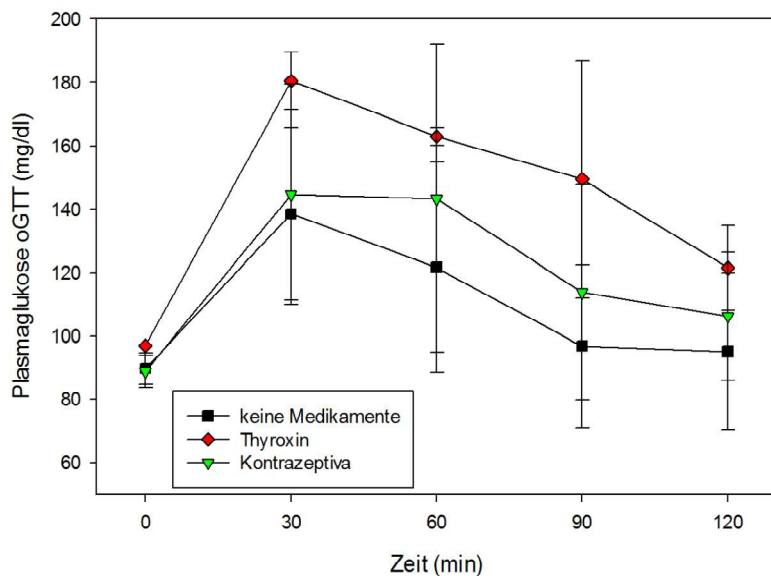


Abb. 4.8: Unterschiede in den oGTT-Konzentrationsverläufen bei normoglykämischen Frauen mit und ohne Medikamenteneinnahme; gezeigt sind MW und SD

Nichtsdestotrotz sind systematische Effekte bei der Einnahme kontrainsulinärer Medikamente und Hormone wie Thyroxin oder Östrogen/Gestagen wahrscheinlich auch im Atem messbar. Die Konzentrationen einiger Massen zeigen sogar signifikante Unterschiede in den Mittelwerten, wie in Abbildung 4.9 für Essigsäure ($m/z = 61$) dargestellt. Dass der Effekt der Medikamenteneinnahme auf den Konzentrationsanstieg einzelner VOCs unterschiedlich ist zeigt Abbildung 4.10.

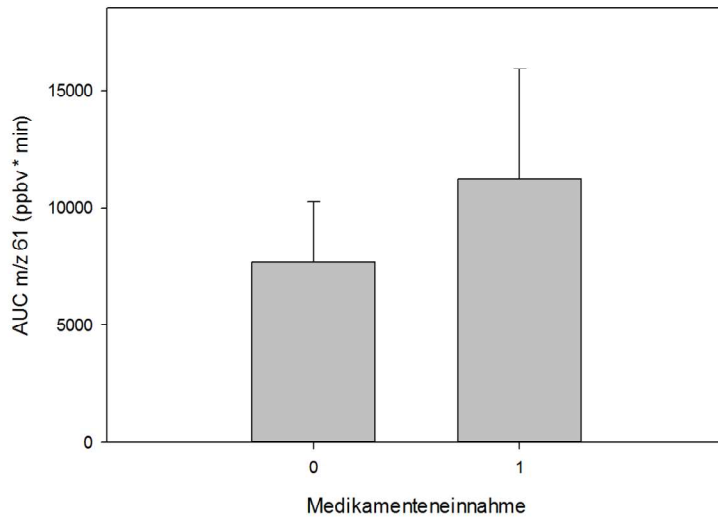


Abb. 4.9: Essigsäurekonzentration ($m/z = 61$) im Atem von Frauen, die keine Medikamente einnehmen (=0) und von Frauen, die Medikamente einnehmen (=1); Unterschied der Mittelwerte signifikant bei $p=0,004$ (Mann-Whitney-U-Test)

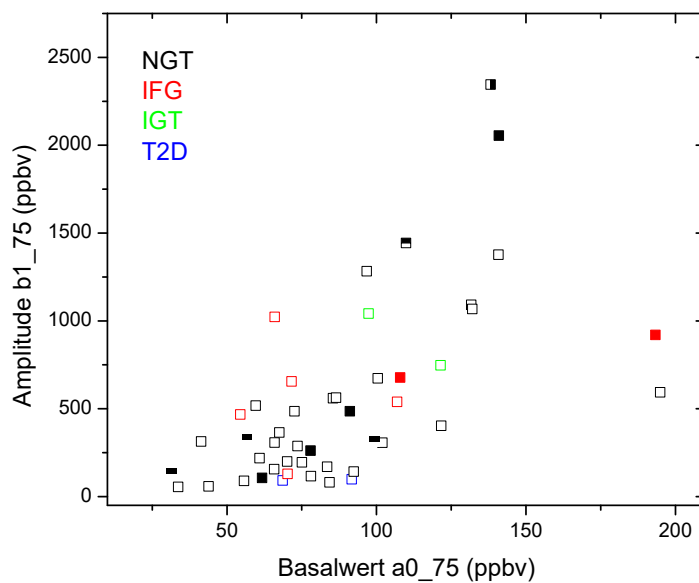


Abb. 4.10: Wechselnder Einfluss von Thyroxin- bzw. Östrogen/Gestageneinnahme auf die Peakentwicklung von Masse 75

Eine andere Hypothese zur Ursache der Heterogenität der Atemgaskonzentrationen der Subgruppen betrifft die klinische Klassifikation. Mehrere Studien der letzten Jahre legen nahe, dass die üblicherweise angewandten Methoden zur Früherkennung eines T2D nach

GDM ungenau sind (Tura 2006) (Tura 2011). Es wird empfohlen, bis spätestens 8 Wochen nach Geburt erneut einen 75g-oGTT durchzuführen, jedoch gibt es Hinweise darauf, dass die Sensitivität des Standardtests im Fall von ehemaligen Schwangerschaftsdiabetikerinnen nicht ausreichend ist, denn oft liegt bei noch normalem oGTT bereits eine gestörte Insulinsekretion und erhöhte Insulinresistenz vor (Retnakaran 2010).

Zu bedenken gilt es auch den Umstand, dass die die Atemgasmessung konfundierenden Faktoren auch Bluttests verändern. So beschreiben Aulinas et al. veränderte 1h-Glukosewerte sowie HbA1c (Aulinas 2016).

Es ist deshalb denkbar, dass dieser Effekt sich in Form von klinischer Fehlklassifikation bemerkbar macht und so letztlich die korrekte Klassifikation durch die Atemgasmetabolite verfälscht.

4.5 Limitationen der Methode

Mögliche Schwächen der Arbeit liegen vorwiegend in der technischen Verschiedenartigkeit der angewandten Methoden, in der Art der Datenerhebung und der Inhomogenität des untersuchten Kollektivs begründet.

Besonders die Häufigkeit der Messungen unterscheidet sich erheblich (siehe auch **Abb. 2.9**), da in der Atemluftmessung eine annähernd kontinuierliche Aufzeichnung versucht wurde, nämlich alle drei bis vier Minuten in der ersten halben Stunde des Tests, die Blutentnahmen zur Bestimmung der klinischen Parameter aber "nur" halbstündlich stattfanden.

Ein kleiner zeitlicher Versatz von etwa drei Minuten entstand zudem durch die Tatsache, dass zu einem Zeitpunkt immer nur ein Testverfahren angewandt werden konnte, d.h. Blutentnahme und Atemmessung fanden direkt nacheinander statt, nie gleichzeitig. Der zeitapproximierte Vergleich der Messungen könnte daher, gerade in den Phasen dynamischer Konzentrationsänderungen, zu geringen Ungenauigkeiten führen.

Als problematisch imponierte außerdem die große Heterogenität der Kohorte. Gerade im gesunden Kontrollkollektiv zeigte sich eine breite Streuung der gemessenen Werte. Von 34 NGT-Frauen waren neun Raucherinnen, eine Passivrauch ausgesetzt, zwölf nahmen

Medikamente ein und zwölf zeigten Erkältungssymptome. Es ist sehr wahrscheinlich, dass diese Faktoren die Messergebnisse beeinflussen. Zwar zeigte sich im dysglykämischen Kollektiv eine ähnliche Rate an Medikamenteneinnahme, Erkältungssymptomatik und Raucherstatus, dennoch kann der Anteil an VOCs, der sich dadurch in der Ausatemluft befindet, nur geschätzt werden. Auch ist bislang teilweise unbekannt, welche VOCs beeinflusst werden. Um den Einfluss der starken Heterogenität zu minimieren wäre für künftige Untersuchungen eine höhere Fallzahl besonders wichtig.

In einem Versuch der Methodenvollständigung ließen Basanta et al. ihre Probanden an insgesamt vier Testtagen für 30 Minuten VOC-gefilterte Luft atmen, bevor Proben genommen wurden. Mittels PCA konnte eine große Reliabilität der Methode zur Detektion kleinster Mengen an VOCs gezeigt werden. Wie in der vorliegenden Arbeit zeigte sich eine relevante Variation in der Reproduzierbarkeit der exhalierten VOCs pro Durchgang. Damit adressiert er einerseits die erhebliche intraindividuelle Schwankungsbreite und zieht aus den gemessenen Werten die Erkenntnis, dass die intraindividuelle Streuung maßgeblich vom gemessenen VOC sowie von der Dauer der Expiration abhängt. Andererseits wirft er ein Schlaglicht auf einen weiteren Aspekt zur Einordnung der Ergebnisse, nämlich die chemische und physikalische Stabilität der VOCs, welche ihrerseits erheblich variiert. Interessanterweise konnte die Gruppe um Basanta damals keine Beeinflussung durch die zu messenden pulmonalen Pathologien der Testkohorte sehen (COPD bzw. Asthma bronchiale) (Basanta 2012).

Eine weitere mögliche Schwäche stellt paradoxerweise das hohe Auflösungsvermögen der Methode dar. Zum einen muss beim Einsatz hochsensitiver Techniken auch mit Kontamination gerechnet werden. Zwar sind Vorkehrungen in Form von konstanter Belüftung, Vermeidung von Desinfektions- und Putzmitteln, Verminderung der Personenzahl im Raum und Vermeidung stark duftender Hygieneartikel wie Parfum oder Hautcreme immer erfolgt, dennoch können Verunreinigungen nicht ausgeschlossen werden. Die vor jedem Messtag aufgezeichneten Raumluftbedingungen und -konzentrationen der VOCs garantieren einen Anteil von jeweils unter 10% an der Gesamtkonzentration.

Zum anderen entsteht durch die Komplexität des Messvorgangs eine große Datenmenge. Diese benötigt neben ausreichend Speicherkapazität und anschließender Auswertung auch immer wieder eine Prüfung auf Plausibilität. Die so gewonnenen Daten müssen zum

Vergleich mit konventionelleren Messmethoden zuletzt wieder reduziert und zusammengefasst werden. Auch in diesen Prozess können durch Datenkompression Fehler entstehen.

Typische statistische Fehlerquelle ist die Alpha-Fehler-Kumulierung durch multiples Testen. Zur Vermeidung kann eine einfache Korrektur der Signifikanzangaben nach Bonferroni angewandt werden. Der nach Bonferroni korrigierte p-Wert berücksichtigt in die Berechnung eingeschlossene Massen, Confounder und Outcomes und beträgt $p_{\text{Bonferroni}} = 0,0003$. Das heißt, es wird eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,03% akzeptiert. Diese recht konservative Berechnung ist zwar adäquat, jedoch im Fall von Grundlagenforschung außerordentlich eng gefasst, so dass für die vorliegende Arbeit die allgemeineren p-Werte von 0,05 und 0,01 als signifikant bzw. hochsignifikant angenommen wurden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Atemluftstudie am POGO-Kollektiv bekannte physiologische Prozesse mit hoher Wahrscheinlichkeit nachweisen konnte. Oxidativer Stress auf dem Weg zur Entwicklung des manifesten Diabetes und die Rolle des Mikrobioms und der Zusammensetzung der Nahrung scheinen sich in der Expirationsluft der Probandinnen zu spiegeln.

5. Schlussfolgerungen und künftige Perspektiven

Die Progression vom GDM zum T2D verläuft über einen längeren Zeitraum, der idealerweise zu Interventionszwecken genutzt werden kann. Diverse Arbeitsgruppen suchten deshalb in den letzten Jahren verstärkt nach Tests und Parametern mit höherem Vorhersagewert und früherem Ansprechen. Untersucht wurden unter anderem die Vorhersagekraft von HbA_{1c} , Nüchternplasmaglukose, Fetuin-A, von neuen Screening-Parametern wie dem Fatty Liver Index, von verschiedenen Markern für Inflammation (IL-6, IL-1 β), sowie von Adiponektin und verzweigtkettigen Aminosäuren (Zhang 2010) (Wang 2011) (Bozkurt 2012) (de Almeida 2014) (Floegel 2013).

Auch die nicht-invasive online (real time) Atemluftanalyse zielt längerfristig auf den Einsatz der Methode im klinischen Alltag ab. Gewünscht ist eine Anwendungsform, die idealerweise via VOC-Äquivalent für Blutzuckerspiegel, Insulinspiegel und C-Peptid im Plasma ein praktikables, zuverlässiges, exaktes, nicht-invasives und kostengünstiges Verfahren für Screening, Therapieüberwachung und Diagnostik darstellt (Minh 2012). Unseren Daten zufolge ist die Gruppentrennung auf der Basis von VOCs für die Prädiagnostik von Typ 2 Diabetes allerdings derzeit noch nicht ausreichend.

Ob ein Monitoring der Atemgaskonzentration in die klinische Diagnostik der Insulinresistenz Einzug halten und damit schmerzhaftes BlutentnahmeprozEDUREN und teure Labortests ersetzen kann, wird unter anderem auch von Kenntnis und Umgang mit Störfaktoren abhängen. Weitere Untersuchungen, insbesondere auch mit größeren Fallzahlen, zu deren Aufklärung werden dafür notwendig sein.

Da zu den technischen Einschränkungen der vorliegenden Studie insbesondere der zeitliche Versatz der verschiedenen Messmethoden zählt und der dadurch entstehende Messfehler bei besonders kinetisch reaktiven Metaboliten schwer wiegt, könnte für künftige Projekte die parallele Anwendung einer alternativen Untersuchungsmethode interessant werden.

Das ideal zu kombinierende Verfahren wäre die Glukose Clamp-Technik, mit der sowohl die Sensitivität der β -Zelle für Glukose (hyperglykämische Clamp-Technik), als auch die periphere Sensitivität für Insulin quantifiziert werden können (euglykämische, hyperinsulinämische Clamp-Technik) (DeFronzo 1979) (Fritsche 2000).

Zwar ist die Methode deutlich aufwändiger und invasiver als einfache Blutentnahmen, jedoch bietet sie den Vorteil des fast kontinuierlichen metabolischen Monitorings. Damit könnten zwei Probleme auf einmal gelöst werden: das des Messfehlers bei notwendiger Zeitapproximation und das der eventuellen klinischen Fehlklassifikation der Probandinnen (siehe auch Kap. 4.3).

6. Zusammenfassung

Wir präsentieren eine Substudie der POGO-Studie zum Einsatz massenspektrometrischer Atemgasanalysen (Proton Transfer Reaktion Massenspektrometrie) an 49 ehemaligen Schwangerschaftsdiabetikerinnen mit dem Ziel, ein aussagekräftiges Set expiratorischer VOCs (volatile organic compounds) zu finden, welches mit Risikoparametern zur Früherkennung von Typ 2 Diabetes (T2D) assoziiert ist.

Wir sammelten end-expiratorische Atemluftproben während eines 75g-oGTT um enthaltene VOCs qualitativ und quantitativ zu analysieren. Mittels bivariater Korrelations- und linearer Regressionsanalyse wurden die Atemgasparameter mit Stoffwechselfparametern im Blut (Plasmaglukosespiegel, Insulin- und C-Peptidspiegel), sowie Insulinsensitivitätsindices verglichen. Alle Ergebnisse wurden adjustiert nach Alter und Raucherstatus. Anhand derjenigen VOCs, die besonders sensitiv auf die Glukosechallenge reagieren, wurde mittels Hauptkomponentenanalyse (principal component analysis, PCA) eine Separation der Probandinnen in die klinischen Kategorien der pathologischen Glukosetoleranz (IFG, IGT, T2D sowie NGT) versucht.

Zudem wurden die Probandinnen mithilfe des FINDRISK-Scores zur Risikoeinschätzung für die T2D-Erkrankungswahrscheinlichkeit in 10 Jahren klassifiziert. Ein Vergleich zwischen der Hoch- und Niedrigrisikogruppe bezüglich exhalierter VOCs fand mittels Hauptkomponentenanalyse statt.

Zunächst wurde eine Identifikation der gemessenen VOCs vorgenommen und deren Konzentrationsänderungen während des oGTT beschrieben. Es gelang eine Zuordnung zu drei Kategorien, kinetisch, linear und linear mit kurzem Anfangsspike. Eine Sonderrolle konnte für Masse 59, Aceton, beobachtet werden, welches sich schwach kinetisch verhält.

In der sich anschließenden Korrelations- und Regressionsanalyse zeigten insgesamt 14 von 34 untersuchten Massen (u.a. Acrolein und Methacrolein, Methanol, Dimethylfuran und Oktanol)

positive Korrelationen mit T2D-Risikoparametern wie der C-Peptidkonzentration im venösen Plasma sowie dem Insulinsensitivitätsindex HOMA (homeostatis model assessment) (Pearson`s r von $r = 0,259$ bis $r = 0,300$, $p < 0,05$). Weder in einer Hauptkomponentenanalyse noch mittels logistischer Regression zeigten sich Zusammenhänge zwischen den untersuchten Massen und der Hoch- und Niedrigrisikogruppe, definiert über den FINDRISK-Score.

Die massenspektrometrische Atemgasanalyse stellt nichtsdestotrotz weiterhin ein interessantes Verfahren zur nicht-invasiven Diagnostik verschiedener Stoffwechselerkrankungen dar. Unseren Daten zufolge ist die Gruppentrennung auf der Basis von VOCs für die Prädiagnostik von Typ 2 Diabetes derzeit jedoch noch nicht ausreichend. Dafür verantwortlich ist u.a. die breite inter- sowie intraindividuelle Streuung der VOC-Konzentrationen im gesunden Probandenkollektiv. Weitere Untersuchungen werden diesbezüglich nötig sein. Denkbar wäre beispielsweise eine Follow-Up-Studie zur Panel-Daten-Gewinnung über die initial getesteten Frauen, um die Atemgasanalyse in der Früherkennung und Diagnostik des T2D zu etablieren.

Anhang

A. Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1	Schematischer Aufbau des PTR-MS.....	18
Abb. 2.2	Schematischer Aufbau des Atemluftsammlers (BET).....	21
Abb. 2.3	Typisches Ausatemstromprofil am Beispiel von $m/z = 37$	22
Abb. 2.4	Zeitverlauf der ncps-Zählraten von zwei aufeinanderfolgenden Exhalationen am Beispiel von $m/z = 75$	24
Abb. 2.5	Detektorempfindlichkeit für drei verschiedene Massen im Messzeitraum.....	25
Abb. 2.6	Transmissionskurven des PTR-MS im Messzeitraum.....	26
Abb. 2.7	verfeinertes Messprotokoll ab August 2013 und dadurch erreichte höhere zeitliche Auflösung.....	29
Abb. 2.8	a) enge Korrelation der VOC-Konzentrationen von $m/z = 61$ und $m/z = 75$ b) $m/z = 61$ und $m/z = 81$ in den Atemzügen aller Probandinnen zugehörige, niedrige Raumluftkonzentrationen.....	31
Abb. 2.9	Setting der Atemgasmessungen.....	35

Abb. 2.10	Konzertierte Messzeitpunkte für Atemgas und Blutentnahme.....	36
Abb. 2.11	Kinetisch reagierende Masse 75 am Beispiel von drei Probandinnen.....	39
Abb. 2.12	Statisch oder linear reagierende Masse 47 am Beispiel von drei Probandinnen.....	39
Abb. 2.13	Schwach kinetisch reagierende Masse 59 am Beispiel von drei Probandinnen.....	40
Abb. 2.14	Vergleich Kurvenfitting mit kinetischer Funktion (GDM-Studie) und segmentierter, Intervall-linearer Funktion (neu).....	40
Abb. 2.15	Ermittlung der area under the curve anhand gefitteter Kurvenparameter.....	41
Abb. 3.1	Ergebnisklassifikation der Stoffwechselsituation anhand oGTT und HbA _{1c}	46
Abb. 3.2	Zuteilung der Probandinnen zu den einzelnen Risikoklassen des FINDRISK-Scores.....	46
Abb. 3.3	a) Plasmaglukose b) Insulin c) C-Peptid des POGO-Kollektivs im Verlauf des oGTT.....	50
Abb. 3.4	Übersicht über typische VOC-Konzentrationsänderungen nach Glukose-Aufnahme am Beispiel dreier Probandinnen.....	52
Abb. 3.5	Kinetischer Konzentrationsverlauf der Masse 75.....	53
Abb. 3.6	Linearer Konzentrationsverlauf mit Spike, Masse 47.....	54
Abb. 3.7	Teilweise schwach kinetisches oder lineares Signal von Masse 59.....	55
Abb. 3.8	a) Korrelationen zwischen m/z = 71 und Glukose/HbA _{1c} , mit Regressionsgerade b) Korrelationen zwischen m/z = 34 und ISI/Glukose, mit Regressionsgerade c) Korrelationen zwischen m/z = 97 und HbA _{1c} /BMI, mit Regressionsgerade d) Korrelationen zwischen m/z = 111 und Glukose/HbA _{1c} , mit Regressionsgerade.....	57
Abb. 3.9	PCA zur Gruppenseparation in IFG, IGT, T2D und NGT anhand des Fitparameters t1+d.....	59
Abb. 3.10	PCA zur Trennung in IFG, IGT, T2D und NGT anhand der AUCs.....	60
Abb. 3.11	PCA für eine Gruppenseparation nach FINDRISK-Risikokategorien anhand des Fitparameters t1+d2.....	61
Abb. 3.12	PCA zur Gruppenseparation in eine Hoch- und eine Niedrigrisikogruppe anhand der AUCs der VOCs.....	62

Abb. 4.1	a), c) Korrelation von Glukose mit Methacrolein; b), d) Korrelation von Glukose mit Acrolein; dargestellt sind jeweils Diagnose- und Risikokategorien.....	64
Abb. 4.2	Korrelation zwischen a) $m/z = 57$ und $m/z = 71$: $r=0,907$ und zwischen b) $m/z = 57$ und $m/z = 111$: $r=0,863$	65
Abb. 4.3	Polyol-Pathway mit physiologischer Wirkung und verstärktem Glukose-Fluss bei Hyperglykämie.....	66
Abb. 4.4	Korrelation zwischen $m/z = 34$ und dem BMI im POGO-Kollektiv.....	69
Abb. 4.5	Korrelation zwischen Glukose und Methanol.....	70
Abb. 4.6	mediane Methanolkonzentration (als AUC) in der Expirationsluft der normoglykämischen und der dysglykämischen Gruppe.....	71
Abb. 4.7	Herkunft, Verteilung und Ausscheidung von VOCs im Körper.....	73
Abb. 4.8	Unterschiede in den oGTT-Konzentrationsverläufen bei normoglykämischen Frauen mit und ohne Medikamenteneinnahme.....	75
Abb. 4.9	Essigsäurekonzentration ($m/z = 61$) im Atem von Frauen, die keine Medikamente einnehmen und von Frauen, die Medikamente einnehmen.....	76
Abb. 4.10	Wechselnder Einfluss von Thyroxin- bzw. Östrogen/Gestageneinnahme auf die Peakentwicklung von Masse 75.....	76

B. Literaturverzeichnis

Abdul-Ghani, M.; Tripathy, D.; DeFronzo, R. (2006): Contributions of β -Cell Dysfunction and Insulin Resistance to the Pathogenesis of Contributions of β -Cell Dysfunction and Insulin Resistance to the Pathogenesis of Contributions of β -Cell Dysfunction and Insulin Resistance to the Pathogenesis of Impaired Glucose Tolerance and Impaired Fasting Glucose. In: *Diabetes Care* 29 (5), S. 1130–11139. DOI: 10.2337/dc05-2179.

Agarwal, M. M. (2015): Gestational diabetes mellitus: An update on the current international diagnostic criteria. In: *World journal of diabetes* 6 (6), S. 782–791. DOI: 10.4239/wjd.v6.i6.782.

Almeida, A. R. de; Monte-Alegre, S.; Zanini, Michele, B.; Souza, A. L.; Etchebehere, M.; Gontijo, J.A.R. (2014): Association between prehypertension, metabolic and inflammatory

markers, decreased adiponectin and enhanced insulinemia in obese subjects. In: *Nutrition & metabolism* 11, S. 25. DOI: 10.1186/1743-7075-11-25.

Anderwald, C.; Tura, A.; Winhofer, Y.; Krebs, M.; Winzer, C.; Bischof, M. G. et al. (2011): Glucose Absorption in Gestational Diabetes Mellitus During an Oral Glucose Tolerance Test. In: *Diabetes Care* 34 (7), S. 1475–1480. DOI: 10.2337/dc10-2266.

Apra, E.; Morisco, F.; Biasioli, F.; Vitaglione, P.; Cappellin, L.; Soukoulis, C. et al. (2012): Analysis of breath by proton transfer reaction time of flight mass spectrometry in rats with steatohepatitis induced by high-fat diet. In: *Journal of mass spectrometry : JMS* 47 (9), S. 1098–1103. DOI: 10.1002/jms.3009.

Aulinas, A.; Colom, C.; García Patterson, A.; Ubeda, J.; María, M. A.; Orellana, I. et al. (2016): Smoking affects the oral glucose tolerance test profile and the relationship between glucose and HbA1c in gestational diabetes mellitus. In: *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association* 33 (9), S. 1240–1244. DOI: 10.1111/dme.12966.

Axelrod, J.; Daly, J. (1965): Pituitary Gland: Enzymic Formation of Methanol from S-Adenosylmethionine. In: *Science* (150), S. 892–893, zuletzt geprüft am 22.02.2015.

Basanta, M.; Ibrahim, B.; Douce, D.; Morris, M.; Woodcock, A.; Fowler, S. J. (2012): Methodology validation, intra-subject reproducibility and stability of exhaled volatile organic compounds. In: *JOURNAL OF BREATH RESEARCH* 6 (2), S. 026002. DOI: 10.1088/1752-7155/6/2/026002.

Beauchamp, J.; Herbig, J.; Gutmann, R.; Hansel, A. (2008): On the use of Tedlar® bags for breath-gas sampling and analysis. In: *JOURNAL OF BREATH RESEARCH* 2 (4), S. 046001. DOI: 10.1088/1752-7155/2/4/046001.

Bender, D. (2012): Skript zum Versuch Massenspektrometrie. Hg. v. Universität Jena, zuletzt geprüft am 20.01.2015.

Böhm, B.; Dreyer, M.; Fritsche, A.; Füchtenbusch, M.; Götz, S.; Martin, S. (2011): Therapie des Typ-1-Diabetes. In: *Diabetologie und Stoffwechsel* 6 (S 02), S. 120–130. DOI: 10.1055/s-0031-1283736.

Bozkurt, L.; Göbl, C. S.; Tura, A.; Chmelik, M.; Prikoszovich, T.; Kosi, L. et al. (2012): Fatty liver index predicts further metabolic deteriorations in women with previous gestational diabetes. In: *PLoS one* 7 (2), S. e32710. DOI: 10.1371/journal.pone.0032710.

Brownlee, M. (2001): Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. In: *Nature* 414, S. 813–820, zuletzt geprüft am 22.07.2014.

Buhr, K.; van Ruth, S.; Delahunty, C. (2002): Analysis of volatile flavour compounds by Proton Transfer Reaction-Mass Spectrometry: fragmentation patterns and discrimination between isobaric and isomeric compounds. In: *International Journal of Mass Spectrometry* 221 (1), S. 1–7. DOI: 10.1016/S1387-3806(02)00896-5.

Conklin, D.J.; Barski, O. A.; Lesgards, J. F.; Juvan, P.; Rezen, T.; Rozman, D. et al. (2010): Acrolein consumption induces systemic dyslipidemia and lipoprotein modification. In: *Toxicology and Applied Pharmacology* 243, S. 1–12. DOI: 10.1016/j.taap.2009.12.010.

Cornu, J.; Cancel-Tassin, G.; Ondet, V.; Girardet, C.; Cussenot, O. (2011): Olfactory detection of prostate cancer by dogs sniffing urine: a step forward in early diagnosis. In: *European urology* 59 (2), S. 197–201. DOI: 10.1016/j.eururo.2010.10.006.

- Corradi, M.; Rubinstein, I.; Andreoli, R.; Manini, P.; Caglieri, A.; Poli, D. et al. (2003): Aldehydes in Exhaled Breath Condensate of Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease 167 (*Am J Respir Crit Care Med*), S. 1380–1386. DOI: 10.1164/rccm.200210-1253OC.
- Crowther, C. A.; Hiller, J. E.; Moss, J. R.; McPhee, A. J.; Jeffries W.S.; Robinson, J. S. (2005): Effect of Treatment of Gestational Diabetes Mellitus on Pregnancy Outcomes. In: *NEJM* 352 (24), S. 2477–2486, zuletzt geprüft am 23.05.2016.
- Deboer, D. A.; Clark, R. E.: Iron chelation in myocardial preservation after ischemia-reperfusion injury: The importance of pretreatment and toxicity, zuletzt geprüft am 22.02.2015.
- DeFronzo, R. A.; Tobin, J. D.; Andres, R. (1979): Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. In: *Am. J. Physiol.: Endocrinol. Metab. Gastrointest.* 6 (3), S. E214-E223, zuletzt geprüft am 23.07.2014.
- Ernstgard, L.; Gullstrand, E.; Johanson, G.; Löf, A. (1999): Toxicokinetic Interactions between Orally Ingested Chlorzoxazone and Inhaled Acetone or Toluene in Male Volunteers. In: *TOXICOLOGICAL SCIENCES* (48), S. 189–196, zuletzt geprüft am 22.02.2015.
- Filipiak, W.; Sponring, A.; Baur, M. M.; Ager, C.; Filipiak, A.; Wiesenhofer, H. et al. (2012): Characterization of volatile metabolites taken up by or released from *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* by using GC-MS. In: *Microbiology* 158 (Pt_12), S. 3044–3053. DOI: 10.1099/mic.0.062687-0.
- Fisher, J. W.; Dorman, D. C.; Medinsky, M. A.; Welsch, F.; Conolly, R. B. (2000): Analysis of Respiratory Exchange of Methanol in the Lung of the Monkey Using a Physiological Model. In: *TOXICOLOGICAL SCIENCES* (53), S. 185–193, zuletzt geprüft am 23.01.2015.
- Floegel, A.; Stefan, N.; Yu, Z.; Mühlenbruch, K.; Drogan, D.; Joost, H. et al. (2013): Identification of serum metabolites associated with risk of type 2 diabetes using a targeted metabolomic approach. In: *Diabetes* 62 (2), S. 639–648. DOI: 10.2337/db12-0495.
- Fritsche, A.; Stefan, N.; Hardt, E.; Häring, H.; Stumvoll, M. (2000): Characterisation of beta-cell dysfunction of impaired glucose tolerance: Evidence for impairment of incretin-induced insulin secretion. In: *Diabetologia* (43), S. 852±858, zuletzt geprüft am 22.07.2014.
- Galassetti, P. R.; Novak, B.; Nemet, D.; Rose-Gottron, C.; Cooper, D. M.; Meinardi, S. et al. (2005): Breath Ethanol and Acetone as Indicators of Serum Glucose Levels: An Initial Report. In: *DIABETES TECHNOLOGY & THERAPEUTICS* 7 (1), S. 115–123, zuletzt geprüft am 22.07.2014.
- Gemeinsamer Bundesausschuss, www.g-ba.de (1986): Richtlinien des Gemeinsamen Bundesausschusses über die ärztliche Betreuung während der Schwangerschaft und nach der Entbindung („Mutterschafts-Richtlinien“). Hg. v. Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz. Online verfügbar unter www.bundesanzeiger.de, zuletzt geprüft am 26.10.2016.
- Giacco, F.; Brownlee, M. (2010): Oxidative stress and diabetic complications. In: *Circulation research* 107 (9), S. 1058–1070. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.110.223545.
- Guariguata, L.; Whiting, D. R.; Hambleton, I.; Beagley, J.; Linnenkamp, U.; Shaw, J. E. (2014): Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. In:

Diabetes Research and Clinical Practice 103 (2), S. 137–149. DOI: 10.1016/j.diabres.2013.11.002.

Halbritter, S.: Investigations on the use of breath gas analysis using Proton Transfer Reaction Mass Spectrometry for a non-invasive method of early Gestational Diabetes Mellitus diploma 2011, S. 1–75, zuletzt geprüft am 04.01.2015.

Halbritter, S.; Fedrigo, M.; Höllriegl, V.; Szymczak, W.; Maier, J. M.; Ziegler, A.-G.; Hummel, M. (2012): Human Breath Gas Analysis in the Screening of Gestational Diabetes Mellitus. In: *DIABETES TECHNOLOGY & THERAPEUTICS* 14 (10), S. 917–925. DOI: 10.1089/dia.2012.0076.

Hebbard, G. S.; Sun W. M.; Dent, J.; Horowitz, M. (1996): Hyperglycemia affects proximal gastric motor and sensory function in normal subjects. In: *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* (8), S. 211–217, zuletzt geprüft am 22.02.2015.

Henderson, M.; Karger, B.; Wrenshall, G. (1952): Acetone in the Breath. A STUDY OF ACETONE EXHALATION IN DIABETIC AND NONDIABETIC HUMAN SUBJECTS. In: *Diabetes* 1 (3), zuletzt geprüft am 22.07.2014.

Henriksen, E. J.; Diamond-Stanic, M. K.; Marchionne, E. M. (2011): Oxidative stress and the etiology of insulin resistance and type 2 diabetes. In: *Free Radical Biology & Medicine* 51 (5), S. 993–999. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.12.005.

Herbig, J.; Titzmann, T.; Beauchamp, J.; Kohl, I.; Hansel, A. (2008): Buffered end-tidal (BET) sampling—a novel method for real-time breath-gas analysis. In: *JOURNAL OF BREATH RESEARCH* 2 (3), S. 037008. DOI: 10.1088/1752-7155/2/3/037008.

Horvath, G.; Andersson, H.; Nemes, S. (2013): Cancer odor in the blood of ovarian cancer patients: a retrospective study of detection by dogs during treatment, 3 and 6 months afterward. In: *BMC Cancer* 13 (1), S. 396. DOI: 10.1186/1471-2407-13-396.

Hummel, S.; Much, D.; Rossbauer, M.; Ziegler, A.-G.; Beyerlein, A. (2013): Postpartum Outcomes in Women with Gestational Diabetes and their Offspring: POGO Study Design and First-Year Results. In: *Rev Diabet Stud* 10 (1), S. 49–57. DOI: 10.1900/RDS.2013.10.49.

Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen (2012): Patienteninformation Schwangerschaftsdiabetes. Ich bin schwanger. Warum wird allen schwangeren Frauen ein Test auf Schwangerschaftsdiabetes angeboten? Hg. v. Gemeinsamer (G-BA) Bundesausschuss, zuletzt geprüft am 26.10.2016.

IONICON Analytik GmbH: IONICON PTR-MS SRI-MS technology overview, zuletzt geprüft am 20.01.2015.

Keller, S.: neue pogo massenblöcke-0812, zuletzt geprüft am 19.01.2015.

Kistler, M.; Szymczak, W.; Fedrigo, M.; Fiamoncini, J.; Höllriegl, V.; Hoeschen, C. et al. (2014): Effects of diet-matrix on volatile organic compounds in breath in diet-induced obese mice. In: *J Breath Res* 8 (1), S. 016004. DOI: 10.1088/1752-7155/8/1/016004.

Kleinwechter, H. (2012): Gestationsdiabetes mellitus. In: *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)* 137 (19), S. 999–1002. DOI: 10.1055/s-0032-1304877.

Kleinwechter, H.; Schäfer-Graf, U.; Bühner, C.; Hoesli, I.; Kainer, F.; Kautzky-Willer, A. (2011): Gestationsdiabetes mellitus (GDM) der Deutschen Diabetes-Gesellschaft (DDG) und der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG). Evidenzbasierte

Leitlinie zu Diagnostik, Therapie u. Nachsorge der Deutschen Diabetes-Gesellschaft (DDG) und der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG). Deutschen Diabetes-Gesellschaft (DDG) und der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG), zuletzt geprüft am 10.12.2014.

Kushch, I.; Schwarz, K.; Schwentner, L.; Baumann, B.; Dzien, A.; Schmid, A. et al. (2008): Compounds enhanced in a mass spectrometric profile of smokers' exhaled breath versus non-smokers as determined in a pilot study using PTR-MS. In: *J. Breath Res.* 2 (2), S. 026002. DOI: 10.1088/1752-7155/2/2/026002.

Landon, M. B.; Spong, C. Y.; Thom, E.; Carpenter, M.; Ramin S.M.; Casey, B. et al. (2009): A Multicenter, Randomized Trial of Treatment for Mild Gestational Diabetes. In: *NEJM* 361 (14), S. 1339–1348, zuletzt geprüft am 23.05.2016.

Li, H.-Y.; Chang, Y.-C.; Wei, J.-N.; Chuang, L.-M. (2010): Validation of diabetes risk scores for predicting diabetes diagnosed by oral glucose tolerance test. In: *Diabetes Care* 33 (2), S. e26. DOI: 10.2337/dc09-1986.

Lin, Y. S.; Egeghy, P. P.; Rappaport, S. M. (2008): Relationships between levels of volatile organic compounds in air and blood from the general population. In: *Journal of exposure science & environmental epidemiology* 18 (4), S. 421–429. DOI: 10.1038/sj.jes.7500635;

Lindinger, W.; Hansel, A.; Jordan, A. (1998): On-line monitoring of volatile organic compounds at pptv levels by means of proton-transfer-reaction mass spectrometry (PTR-MS) medical applications, food control and environmental research. In: *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* 173 (3), S. 191–241. DOI: 10.1016/S0168-1176(97)00281-4.

Maerk, L.: Flyer Ionicon Gas Calibration Unit. Hg. v. Ionicon, zuletzt geprüft am 23.07.2014.

McIntyre, H. D. (2015): Diagnosis of GDM: A suggested consensus. In: *Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology* 29, S. 194–205, zuletzt geprüft am 27.10.2016.

McIntyre, H. D.; Colagiuri, S.; Roglic, G.; Hod, M. (2015): Diagnosis of GDM: a suggested consensus. In: *Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology* 29 (2), S. 194–205. DOI: 10.1016/j.bpobgyn.2014.04.022.

McNeil, N. I. (1984): The contribution of the large intestine to energy supplies in man. In: *Am J Clin Nutr* (39), S. 338–342, zuletzt geprüft am 19.03.2015.

Medina-Navarro, R.; Duran-Reyes, G.; Diaz-Flores, M.; Hicks, J. J.; Kumate, J. (2004): Glucose-stimulated acrolein production from unsaturated fatty acids. In: *hum exp toxicol* 23 (2), S. 101–105. DOI: 10.1191/0960327104ht416oa.

Metzger, B. E.; Gabbe, S. G.; Persson, B.; Buchanan, T. A.; Catalano, P. A.; Damm, P. et al. (2010): International association of diabetes and pregnancy study groups recommendations on the diagnosis and classification of hyperglycemia in pregnancy. In: *Diabetes Care* 33 (3), S. 676–682. DOI: 10.2337/dc09-1848.

Miekisch, W.; Schubert, J. K.; Noeldge-Schomburg, G.F.E. (2004): Diagnostic potential of breath analysis--focus on volatile organic compounds. In: *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 347 (1-2), S. 25–39. DOI: 10.1016/j.cccn.2004.04.023.

- Minh, T. Do Chau; Blake, D. R.; Galassetti, P. R. (2012): The clinical potential of exhaled breath analysis for diabetes mellitus. In: *Diabetes Research and Clinical Practice* 97 (2), S. 195–205. DOI: 10.1016/j.diabres.2012.02.006.
- Phillips, M.; Herrera, J.; Krishnan, S.; Zain, M.; Greenberg, J.; Cataneo, R. N. (1999): Variation in volatile organic compounds in the breath of normal humans. In: *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 729 (1-2), S. 75–88. DOI: 10.1016/S0378-4347(99)00127-9.
- Polkinghorne, I.; Hamerli, D.; Cowan, P.; Duckworth, J. (2005): Plant-based immunocontraceptive control of wildlife--"potentials, limitations, and possums". In: *Vaccine* 23 (15), S. 1847–1850. DOI: 10.1016/j.vaccine.2004.11.016.
- Rains, J. L.; Jain, S. K. (2011): Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. In: *Free Radical Biology & Medicine* 50 (5), S. 567–575. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.12.006.
- Retnakaran, R.; Qi, Y.; Sermer, M.; Connelly, P. W.; Hanley, A.J.G.; Zinman, B. (2010): Beta-cell function declines within the first year postpartum in women with recent glucose intolerance in pregnancy. In: *Diabetes Care* 33 (8), S. 1798–1804. DOI: 10.2337/dc10-0351.
- Samuel, B. S.; Hansen, E. E.; Manchester, J. K.; Coutinho, B. M.; Henrissat, B.; Fulton, R. (2007): Genomic and metabolic adaptations of *Methanobrevibacter smithii* to the human gut. In: *PNAS* 104 (25), S. 10643–10648, zuletzt geprüft am 23.07.2014.
- Schwarz, K.; Pizzini, A.; Arendack'a, B.; Zerlauth, K.; Filipiak, W. (2009): Breath acetone---aspects of normal physiology related to age and gender. In: *JOURNAL OF BREATH RESEARCH* (3). DOI: 10.1088/1752-7155/3/2/027003.
- Sekirov, I.; Russell, S. L.; Antunes, L. C. M.; Finlay, B. B. (2010): Gut Microbiota in Health and Disease. In: *Physiological Reviews* 90 (3), S. 859–904. DOI: 10.1152/physrev.00045.2009.
- Shirasu, M.; Touhara, K. (2011): The scent of disease: volatile organic compounds of the human body related to disease and disorder. In: *Journal of biochemistry* 150 (3), S. 257–266. DOI: 10.1093/jb/mvr090.
- Sims, M. A.; Hasler, W. L.; Chey, W. D.; Kim, M. S.; Owyang, C. (1995): Hyperglycemia inhibits mechanoreceptor-mediated gastrocolonic responses and colonic peristaltic reflexes in healthy humans. In: *Gastroenterology* 108 (2), S. 350–359. DOI: 10.1016/0016-5085(95)90060-8.
- Siragusa, R. J.; Cerda, J. J.; Baig, M. M.; Burgin, C. W.; Robbins, F. L. (1988): Methanol production from the degradation of pectin by human colonic bacteria. In: *Am J Clin Nutr* (47), S. 848–851, zuletzt geprüft am 28.10.2014.
- Smith, D.; Spanel, P.; Fryer, A. A.; Hanna, F.; Ferns, G.A.A. (2011): Can volatile compounds in exhaled breath be used to monitor control in diabetes mellitus? In: *J Breath Res* (5), S. 022001–022009, zuletzt geprüft am 28.10.2014.
- Smith, D.; Spaněl, P.; Fryer, A. A.; Hanna, F.; Ferns, G.A.A. (2011): Can volatile compounds in exhaled breath be used to monitor control in diabetes mellitus? In: *JOURNAL OF BREATH RESEARCH* 5 (2), S. 022001. DOI: 10.1088/1752-7155/5/2/022001.

- Smith, D.; Turner, C.; Spaněl, P. (2007): Volatile metabolites in the exhaled breath of healthy volunteers: their levels and distributions. In: *JOURNAL OF BREATH RESEARCH* 1 (1), S. 014004. DOI: 10.1088/1752-7155/1/1/014004.
- Stevens, J. F.; Maier, C. S. (2008): Acrolein: Sources, metabolism, and biomolecular interactions relevant to human health and disease. In: *Mol Nutr Food Res* (52), S. 7–25, zuletzt geprüft am 28.10.2014.
- Storer, M.; Dummer, J.; Lunt, H.; Scotter, J.; McCartin, F.; Cook, J. et al. (2011): Measurement of breath acetone concentrations by selected ion flow tube mass spectrometry in type 2 diabetes. In: *J Breath Res* 5 (4), S. 046011. DOI: 10.1088/1752-7155/5/4/046011.
- Taipale R., Ruuskanen T.M., Rinne J., Kajos M.K., Hakola H., Pohja T., Kulama M. (2008): Technical Note Quantitative long-term measurements of VOC. In: *Atmospheric Chemistry and Physics* 8, S. 6681–6698, zuletzt geprüft am 30.11.2016.
- Taipale. R.; Ruuskanen, T. M.; Rinne, J.; Kajos, M. K.; Hakola, H.; Pohja, T.; Kulmala, M. (2008): Technical Note Quantitative long-term measurements of VOC. In: *Atmospheric Chemistry and Physics* (8), S. 6681–6698, zuletzt geprüft am 20.01.2015.
- The HAPO Study Cooperative Research Group (2008): Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcomes. In: *NEJM* 358 (19), S. 1991–2002, zuletzt geprüft am 19.05.2016.
- The Human Microbiome Project Consortium (2012): Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. In: *Nature* 486 (7402), S. 207–214. DOI: 10.1038/nature11234.
- Toeller, M.; Frisch, A.; Müller-Wieland, D. (2010): Fragebogen zur Erfassung der Nahrungsaufnahme in Risikogruppen (NARI). In: *Diabetologie und Stoffwechsel* (5), S. 309–314. DOI: 10.1055/s-0030-1262592.
- Tura, A.; Mari, A.; Winzer, C.; Kautzky-Willer, A.; Pacini, G. (2006): Impaired β -cell function in lean normotolerant former gestational diabetic women. In: *European Journal of Clinical Investigation* (36), S. 22–28, zuletzt geprüft am 27.10.2014.
- Tura, A.; Mari, A.; Winzer, C.; Kautzky-Willer, A.; Pacini, G. (2006): Impaired β -cell function in lean normotolerant former gestational diabetic women. In: *European Journal of Clinical Investigation* 36, S. 22–28, zuletzt geprüft am 01.12.2016.
- Tura, A.; Morbiducci, U.; Sbrignadello, S.; Winhofer, Y.; Pacini, G.; Kautzky-Willer, A. (2011): Shape of glucose, insulin, C-peptide curves during a 3-h oral glucose tolerance test: any relationship with the degree of glucose tolerance? In: *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 300 (4), S. R941-8. DOI: 10.1152/ajpregu.00650.2010.
- Turner, C.; Spanel, P.; Smith, D. (2006): A longitudinal study of methanol in the exhaled breath of 30 healthy volunteers using selected ion flow tube mass spectrometry, SIFT-MS. In: *Physiological Measurement* (27), S. 637–648. DOI: 10.1088/0967-3334/27/7/007.
- Turner, C.; Walton, C.; Hoashi, S.; Evans, M. (2009): Breath acetone concentration decreases with blood glucose concentration in type I diabetes mellitus patients during hypoglycaemic clamps. In: *JOURNAL OF BREATH RESEARCH* (3). DOI: 10.1088/1752-7155/3/4/046004.
- Uchida, K. (1999): Current Status of Acrolein as a Lipid Peroxidation Product. In: *Trends in Cardiovascular Medicine* 9 (5), S. 109–113. DOI: 10.1016/S1050-1738(99)00016-X.

- Uchida, K.; Kanematsu, M.; Sakai, K.; Matsuda, T.; Hattori, N.; Mizuno, Y. et al. (1998): Protein-bound acrolein Potential markers for oxidative stress. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (95), S. 4882–4887, zuletzt geprüft am 28.10.2014.
- Uesugi, N.; Sakata, N.; Nangaku, M.; Abe, M.; Horiuchi, S.; Hisano, S.; Iwasaki, H. (2004): Possible mechanism for medial smooth muscle cell injury in diabetic nephropathy: Glycooxidation-mediated local complement activation. In: *American Journal of Kidney Diseases* 44 (2), S. 224–238. DOI: 10.1053/j.ajkd.2004.04.027.
- Umweltbundesamt (2013): Flüchtige organische Verbindungen. Umweltbundesamt, zuletzt geprüft am 04.01.2015.
- van den Borst, B.; Gosker, H. R.; Zeegers, M. P.; Schols, A.M.W.J. (2010): Pulmonary function in diabetes: a metaanalysis. In: *Chest* 138 (2), S. 393–406. DOI: 10.1378/chest.09-2622.
- Vitali, B.; Ndagijimana, M.; Cruciani, F.; Carnevali, P.; Candela, M.; Guerzoni, M.; Brigidi, P. (2010): Impact of a synbiotic food on the gut microbial ecology and metabolic profiles. In: *BMC Microbiol* 10 (1), S. 4. DOI: 10.1186/1471-2180-10-4.
- Wang, W.; Lee, E. T.; Howard, B. V.; Fabsitz, R. R.; Devereux, R. B.; Welty, T. K. (2011): Fasting Plasma Glucose and Hemoglobin A1c in Identifying and Predicting Diabetes: The Strong Heart Study. In: *Diabetes Care* 34 (2), S. 363–368. DOI: 10.2337/dc10-1680.
- Ward, A. (2013): WHO Diagnostic Criteria and Classification of Hyperglycemia first detected in pregnancy 2013. Hg. v. World Health Organization, zuletzt geprüft am 27.10.2016.
- Watson, A.; Soro-Paavonen, A.; Jandeleit-Dahm, K. (2010): Endothelial Dysfunction and Inflammation. AGE-RAGE signalling in endothelial dysfunction: Springer Basel, zuletzt geprüft am 01.02.2015.
- Xu, Y.; Shen, S.; Sun, L.; Yang, H.; Jin, B.; Cao, X. (2014): Metabolic syndrome risk after gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis. In: *PLoS ONE* 9 (1), S. e87863. DOI: 10.1371/journal.pone.0087863.
- Zhang, X.; Gregg, E. W.; Williamson, D. F.; Barker, L. E.; Thomas, W.; Bullard, K. M. et al. (2010): A1C Level and Future Risk of Diabetes: A Systematic Review. In: *Diabetes Care* 33 (7), S. 1665–1673. DOI: 10.2337/dc09-1939.
- Ziegler, A.-G.; Wallner, M.; Kaiser, I.; Rossbauer, M.; Harsunen, M. H.; Lachmann, L. et al. (2012): Long-term protective effect of lactation on the development of type 2 diabetes in women with recent gestational diabetes mellitus. In: *Diabetes* 61 (12), S. 3167–3171. DOI: 10.2337/db12-0393.

C. Fragebögen und Protokolle

1. Atemgas-Fragebogen als Beispiel vom 12.2.2013:

Patienten-ID: 93103

#Essenzustand

Nüchtern: ja

Frühstück: nein

Abendessen: 18:00, Brot, 2 Spiegeleier

#Körperpflege

Mundhygiene:	Zahnpasta
Parfum:	ja
Gesichtscreme\Makeup:	ja, nein
Lippenstift\Labello:	nein, nein
Kaugummi\Bonbons etc.:	nein

#Befinden vor Test

Schwitzen:	nein
Mund-\Racheninfektion:	nein
Raucher:	nein
Passivraucher:	nein
Essen\Gerüche Abneigung:	Curry
Heisshunger:	nein

#Basisdaten

Alter:	41J.
Grösse:	1,71m
Gewicht:	64kg
BMI:	22
Dauermedikation:	nein
Besondere Diät:	nein
Vegetarier\Vegan:	nein

2. Beispiel Mess-Protokoll vom 12.2.2013

07:35 PTRMS eingeschaltet, Fenster geöffnet, GCMS heute dabei
07:45 Einbrennen
08:00 Fenster gekippt
08:05 Raumlufscan
08:12 Selbsttest
08:30 1. Messung
08:36 2. Messung
08:44 **Trinken der Glukoselösung**
08:45 3. Messung
08:50 4. Messung
08:55 5. Messung
09:00 6. Messung

09:06 7. Messung
09:14 **1. Blutentnahme**
09:15 8. Messung
09:20 9. Messung
09:26 10. Messung
09:31 11. Messung
09:44 **2. Blutentnahme**
09:45 12. Messung
10:14 **3. Blutentnahme**
10:15 13. Messung
10:44 **4. Blutentnahme**

3. FINDRISK-Fragebogen:

GesundheitsCheck DIABETES

FINDRISK – mit nur 8 einfachen Fragen können Sie ein mögliches Risiko, in den nächsten 10 Jahren an Diabetes Typ 2 zu erkranken, vorhersehen. Nutzen Sie die Chance – machen Sie den Test, und bleiben Sie möglichst lange gesund!



Wie alt sind Sie?

- unter 35 Jahren 0 Punkte
- 35 bis 44 Jahre 1 Punkt
- 45 bis 54 Jahre 2 Punkte
- 55 bis 64 Jahre 3 Punkte
- älter als 64 Jahre 4 Punkte

Wurde bei mindestens einem Mitglied Ihrer Verwandtschaft Diabetes diagnostiziert?

- nein 0 Punkte
- ja, in der entfernten Verwandtschaft bei leiblichen Großeltern, Tanten, Onkeln, Cousinen oder Cousins 3 Punkte
- ja, in der nahen Verwandtschaft bei leiblichen Eltern, Kindern, Geschwistern 5 Punkte

Welchen Taillen-Umfang messen Sie auf Höhe des Bauchnabels?

	Frau	Mann	
<input type="checkbox"/>	unter 80 cm	unter 94 cm	0 Punkte
<input type="checkbox"/>	80 bis 88 cm	94 bis 102 cm	3 Punkte
<input type="checkbox"/>	über 88 cm	über 102 cm	4 Punkte

Haben Sie täglich mindestens 30 Minuten körperliche Bewegung?

- ja 0 Punkte
- nein 2 Punkte

Wie oft essen Sie Obst, Gemüse oder dunkles Brot (Roggen- oder Vollkornbrot)?

- jeden Tag 0 Punkte
- nicht jeden Tag 1 Punkt

Wurden Ihnen schon einmal Medikamente gegen Bluthochdruck verordnet?

- nein 0 Punkte
- ja 2 Punkte

Wurden bei ärztlichen Untersuchungen schon einmal zu hohe Blutzuckerwerte festgestellt?

- nein 0 Punkte
- ja 5 Punkte

Wie ist bei Ihnen das Verhältnis von Körpergröße zu Körpergewicht (Body-Mass-Index)?

- unter 25 0 Punkte
- 25 bis 30 1 Punkt
- über 30 3 Punkte

Den BMI errechnen Sie folgendermaßen:
 Körpergewicht (in Kilogramm) dividiert durch die Körpergröße (in Metern) im Quadrat (oder einfach nach dieser Tabelle).

Körpergewicht (Kilogramm)	Körpergröße (Meter)											
	1,50	1,60	1,70	1,80	1,90	2,00						
110	48	45	43	40	38	36	34	32	30	29	27	Fettsucht
	46	43	41	38	36	34	32	31	29	28	26	Übergewicht
100	44	41	39	37	34	33	31	29	28	26	25	Normalgewicht
	42	39	37	35	33	31	29	28	26	25	24	Untergewicht
90	40	37	35	33	31	29	28	26	25	24	23	
	38	35	33	31	29	28	26	25	24	22	21	
80	35	33	31	29	28	26	25	23	22	21	20	
	33	31	29	28	26	25	23	22	21	20	18	
70	31	29	27	26	24	23	22	21	20	19	18	
	29	27	26	24	23	21	20	19	18	17	16	
60	27	25	24	22	21	20	19	18	17	16	15	
	25	23	22	20	19	18	17	16	16	15	14	
50	23	21	20	19	18	17	16	15	14	13	13	
	20	19	18	17	16	15	14	14	13	12	12	

Gesamtpunktzahl: _____

FINDRISK-Evaluation 2007
 Prof. Dr. Peter E. H. Schwarz, Universitätsklinikum Carl Gustav Carus der TU Dresden

FINDRISK – so hoch ist Ihr Diabetes-Risiko (in den nächsten 10 Jahren*)

Unter 7 Punkte 1 Prozent*

Sie sind kaum gefährdet. Eine spezielle Vorsorge oder Vorbeugung ist in Ihrem Fall nicht nötig. Trotzdem schadet es natürlich nicht, auf eine gesunde Ernährung und auf ausreichend Bewegung zu achten.

7 bis 11 Punkte 4 Prozent*

Ein wenig Vorsicht ist für Sie durchaus angeraten, auch wenn Ihr Risiko für eine Diabetes-Erkrankung nur leicht erhöht ist. Wenn Sie sichergehen wollen, beachten Sie folgende Regeln:

- Bei **Übergewicht** sollten Sie versuchen, sieben Prozent des Körpergewichts abzubauen.
- **Bewegen** Sie sich an mind. 5 Tagen in der Woche jeweils 30 Min. so, dass Sie leicht ins Schwitzen geraten.
- **Fett** sollte nur maximal 30% Ihrer Nahrungsenergie ausmachen.
- Der **Anteil gesättigter Fettsäuren** (vorwiegend in tierischen Fetten) sollte 10% Ihrer Nahrungsenergie nicht übersteigen.
- Nehmen Sie pro Tag 30 Gramm **Ballaststoffe** zu sich (wie z.B. in Vollkornprodukten, Gemüse, Obst).

12 bis 14 Punkte 17 Prozent*

Wenn Sie in diese Risikogruppe fallen, dürfen Sie Vorsorgemaßnahmen auf keinen Fall auf die lange Bank schieben. Dabei helfen können Ihnen Expertentipps und Anleitungen zur Lebensstil-Änderung, die Sie alleine umsetzen. Greifen Sie auf professionelle Hilfe zurück, wenn Sie merken, dass Sie auf diese Weise nicht zurechtkommen.

15 bis 20 Punkte 33 Prozent*

Ihre Gefährdung ist erheblich: Ein Drittel der Menschen mit diesem Risikograd erkrankt in den nächsten zehn Jahren an Diabetes. Das Unterschätzen der Situation könnte schlimme Folgen haben. Im Idealfall nehmen Sie professionelle Hilfe in Anspruch. Machen Sie einen Blutzuckertest und gehen Sie zur Gesundheitsuntersuchung zu Ihrem Hausarzt („Check-up ab 35“).

Über 20 Punkte 50 Prozent*

Es besteht akuter Handlungsbedarf, denn es ist durchaus möglich, dass Sie bereits an Diabetes erkrankt sind. Das trifft für rund 35 Prozent der Personen zu, deren Punktwert über 20 liegt. Ein einfacher Blutzuckertest kann als zusätzliche Information hilfreich sein. Allerdings ersetzt er nicht eine ausführliche Labordiagnostik zum Ausschluss einer bereits bestehenden „Zuckerkrankheit“. Daher sollten Sie umgehend einen Arzttermin vereinbaren.

* Risiko in Prozent = 4% bedeutet z.B., dass vier von hundert Menschen mit dieser Punktzahl in den nächsten 10 Jahren Diabetes mellitus Typ 2 bekommen können.

So senken Sie Ihr Risiko

Schon kleine Änderungen des Lebensstils fördern die Gesundheit

Gesünder essen und trinken

Mehr Obst und Gemüse	Jede Mahlzeit sollte möglichst viel Gemüse, Obst oder Salat enthalten.
Fettarme Lebensmittel	Greifen Sie bei Milch- und Käseprodukten zu den fettarmen Varianten. Essen Sie magere Wurst und Fleisch – aber auch das nur in Maßen. Mindestens einmal wöchentlich sollte Fisch auf den Tisch.
Fettarm kochen	Pfannen mit Antihafbeschichtung verwenden, mit denen man beim Braten auf viel Fett verzichten kann. Grundsätzlich sollten Rapsöl und Olivenöl die festen Fette in der Küche ersetzen.
Gesunde Imbisse	Fastfood und Fertigsnacks sind Kalorienbomben. Verzichten Sie darauf. Die Natur bietet leckere Zwischenmahlzeiten wie Karotten, Äpfel, Nüsse.
Gesunde Getränke	Meiden Sie zuckerhaltige Getränke. Löschen Sie Ihren Durst stattdessen mit Mineralwasser, verdünnten Obstsaften und Kräutertees.

Mehr Bewegung im Alltag

Zeit nehmen	Bewegen Sie sich täglich 30 bis 60 Minuten. Wählen Sie Aktivitäten aus, die Sie in Ihrem Alltag gut unterbringen.
Arbeitsweg zur Bewegung nutzen	Zum Beispiel die Wartezeit an der Haltestelle: Spannen Sie abwechselnd die Gesäß- und Bauchmuskeln an. Dann wippen Sie auf den Zehenspitzen auf und ab. Vielleicht reicht die Zeit sogar, um bis zur nächsten Haltestelle zu gehen.
Vorfahrt für das Fahrrad	Für Besorgungen in der Umgebung nehmen Sie das Rad. Stellen Sie es so ab, dass Sie es jederzeit benutzen können, und halten Sie es funktionstüchtig.
Auf Gruppendynamik setzen	Wenn Ihnen Sport in der Gruppe Spaß macht, nutzen Sie das aus. Feste Trainingstermine und nette Sportkameraden helfen, auch in motivationsschwachen Momenten dabeizubleiben.
Richtig belasten	Wählen Sie Sportarten mit leichter bis mittlerer Belastungsintensität. Nordic Walking beispielsweise ist ideal. Wenn Sie leicht schwitzen und sich beim Sport gut unterhalten können, stimmt die Belastung.

Dauerhaft aktiv bleiben

Realistische Ziele setzen	Vorsätze, die nicht einzuhalten sind, machen ein schlechtes Gewissen und demotivieren.
Aktionstage einführen	Ein bis dreimal pro Jahr sollten Sie klare Verhältnisse schaffen und radikal aufräumen. Das gilt für den Kühlschrank ebenso wie für Keller und Wohnzimmer. Indem Sie so Ihre Gewohnheiten durchbrechen, tanken Sie Kraft und Energie für alle anderen Lebensbereiche.
Sich selbst überlisten	Nur Maßnahmen, die einfach umzusetzen sind, können im Alltag bestehen. Beispiel Sportschuhe: Stehen sie griffbereit im Flur, werden Sie viel häufiger auch benutzt. Dasselbe gilt für den Inhalt des Kühlschranks: Gesunde Lebensmittel ganz nach vorn räumen, denn dorthin greift man zuerst.

Copyright © Deutsche Diabetes-Stiftung

Check online und viele Informationen unter www.diabetesstiftung.de



Deutsche Diabetes-Stiftung · Staffelseestraße 6 · 81477 München · www.diabetesstiftung.de

4. Merkblatt zum Verhalten vor dem oGTT:

Hinweise zum Glucosetoleranztest:

Der Glucosetoleranztest muss **nüchtern** durchgeführt werden. Wir möchten Sie deshalb um folgendes bitten:

- es ist wichtig, dass der Test nüchtern durchgeführt wird. Wir bitten Sie deshalb darum, dass Sie und Ihr Kind zwölf Stunden vor dem Test nichts mehr essen und nur Wasser trinken.
- wichtig ist auch, dass Sie und Ihr Kind in dieser Zeit keine koffeinhaltigen Getränke (Kaffee, Cola etc.) und keine Säfte oder gesüßten Getränke zu sich nehmen. Weiterhin sollten sie vor dem Test auch nicht rauchen, keine Bonbons und auch keinen Kaugummi essen.
- wir möchten Sie und ihr Kind darum bitten, dass Sie sich drei Tage vor dem Test ausgewogen und kohlenhydratreich ernähren.
- drei Tage vor dem Test sind keine Einschränkungen oder Änderungen am sportlichen Verhalten nötig. Nur am Abend vor dem Test sollten sie keinen Sport treiben.
- gerne können Sie für sich und Ihr Kind eine Brotzeit mitbringen, die Sie und ihr Kind direkt nach dem Glucosetoleranztest essen können.

Bitte bringen sie ihren Mutterpass, das gelbe Untersuchungsheft ihres Kindes und die unterschriebenen Einverständniserklärungen mit!

Vielen Dank für Ihre Mithilfe!

Bei Fragen stehen wir Ihnen jederzeit telefonisch

unter **089-3187-3548** oder **089-3068-5579** zur Verfügung.

