

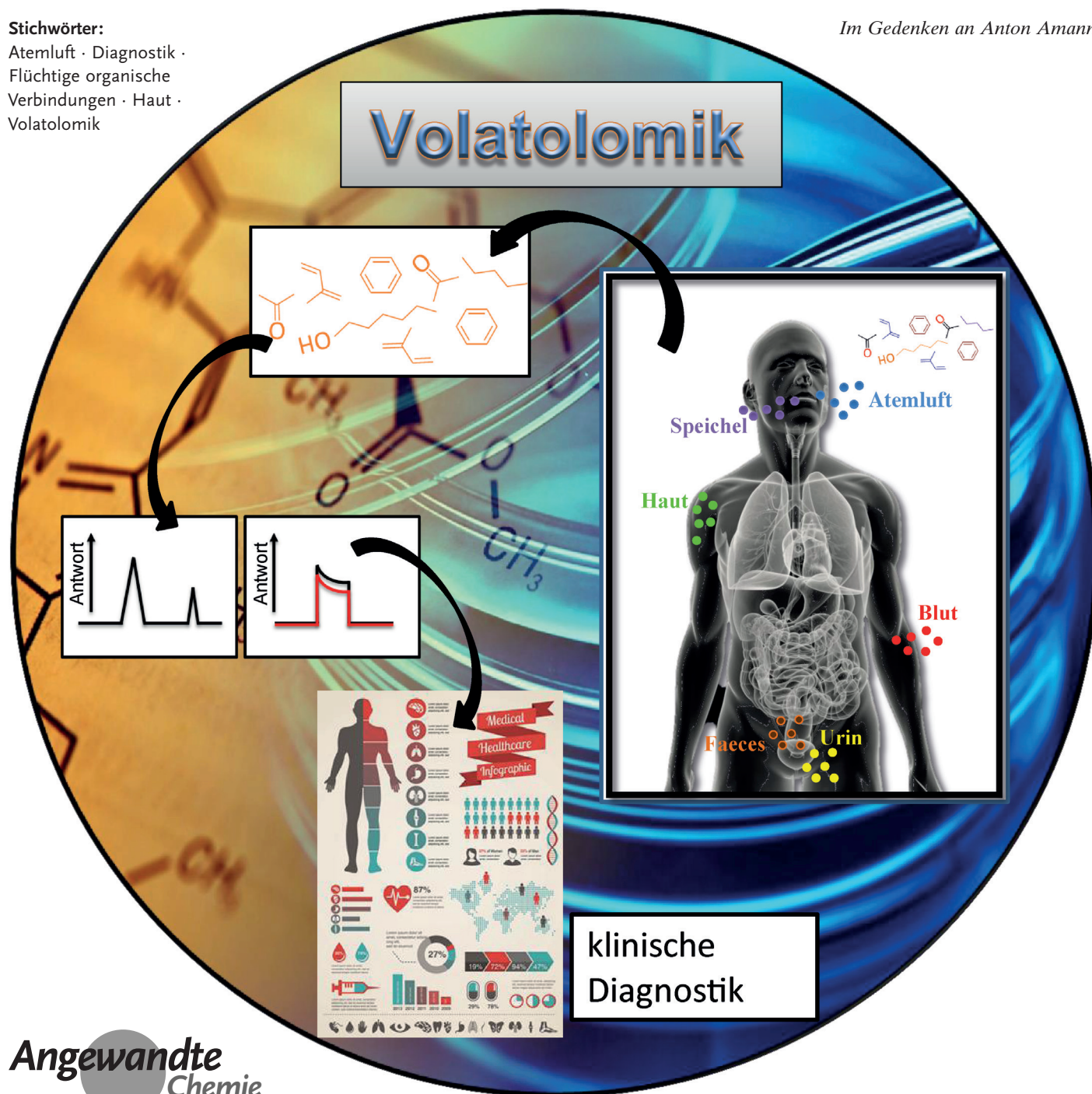
Hybride Volatolomik und der Nachweis von Krankheiten

Yoav Y. Broza, Pawel Mochalski, Vera Ruzsanyi, Anton Amann und Hossam Haick*

Stichwörter:

Atemluft · Diagnostik ·
Flüchtige organische
Verbindungen · Haut ·
Volatolomik

Im Gedenken an Anton Amann



Hier stellen wir einige der Hauptkonzepte und Ansätze der Volatolomik, einem sich rasch entwickelnden Gebiet der schnellen, risikofreien und wahrscheinlich preisgünstigen Diagnostik, vor. Wir versuchen, einen Überblick über die Herkunft und die Eigenschaften der Volatolomik anhand von flüchtigen organischen Verbindungen („volatile organic compounds“, VOCs), die von Zellen und ihrer Mikroumgebung freigesetzt werden, zu geben. Wir beschreiben außerdem das Vorkommen von VOCs in verschiedenen Körperflüssigkeiten, darunter die zelluläre Umgebung, Blut, Atemluft, Haut, Faeces, Urin und Speichel. Schließlich diskutieren wir den Nutzen der Volatolomik für eine Diagnosestellung auf Basis einer einzelnen Körperflüssigkeit ebenso wie die Verbesserung der Diagnosesicherheit durch den „Hybrid“-Ansatz, bei dem die VOC-Profile von zwei oder mehr Körperflüssigkeiten erstellt und kombiniert werden. Die Perspektiven dieser Verfahrensweise zur Weiterentwicklung der Diagnostik werden aufgezeigt.

Aus dem Inhalt

1. Einleitung	11189
2. Ursprung des Volatoloms	11189
3. Beziehungen zwischen den VOCs in verschiedenen Körperflüssigkeiten	11195
4. Hybride Volatolomik	11196
5. Schlussfolgerungen und Ausblick	11198

1. Einleitung

Viele Krankheiten bleiben untherapiert, weil die Diagnose zu spät kommt oder die Behandlung nicht wirksam genug ist.^[1] Daher besteht dringender Bedarf für eine kostengünstige und minimal-invasive Technik, die folgendes leistet: 1) effiziente frühe Diagnose; 2) Stratifizieren der Population auf der Basis von Biomarkern für eine personalisierte Therapie; und 3) schnelle Bewertung der Behandlungseffizienz am Krankenbett, wenn ein Therapiewechsel angezeigt scheint. In diesem Fall kann eine kombinierte Signatur die Krankheit anhand des phänotypischen Erscheinungsbildes stratifizieren und so den Arzt bei der Auswahl von besseren Wirkstoffen leiten.

Ein vielversprechender neuer Ansatz für diese Herausforderungen ist die Volatolomik, also eine wissenschaftliche Untersuchung chemischer Vorgänge auf der Grundlage der Erstellung eines Profils von leicht und mäßig flüchtigen organischen Verbindungen (VOCs). Die Siedepunkte dieser Verbindungen liegen bei <0°C (z.B. Propan) bei leicht flüchtigen Substanzen, zwischen 50 und 250°C (z.B. Aceton; Limonen) bei flüchtigen Verbindungen und bei bis zu 250–380°C (z. B. Phthalate) bei mäßig flüchtigen Verbindungen.

Krankheitsspezifische VOCs entstehen hauptsächlich durch Veränderungen in spezifischen biochemischen Stoffwechselwegen im Körper (Einzelheiten siehe Abschnitt 2.1).^[2] Nach ihrer Bildung werden die VOCs freigesetzt und können in verschiedenen Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden, unter anderem (aber nicht ausschließlich) in 1) infizierten Zellen und/oder ihrer Mikroumgebung; 2) Blut; 3) Atemluft; 4) Haut; 5) Urin; 6) Faeces; 7) Speichel.^[3–5] Im Folgenden werden wir Ursprung, Beziehung und potenzielle Synergien zwischen dem Volatolom in verschiedenen Körperflüssigkeiten diskutieren und zeigen, wie daraus eine verbesserte Diagnostik abgeleitet werden kann.

2. Ursprung des Volatoloms

2.1. Wie werden VOCs gebildet?

Die genaue Herkunft und die metabolischen Hintergründe bei der Entstehung des menschlichen Volatoloms aus VOCs sind noch nicht hinreichend gründlich untersucht. Die Ursprünge wurden jedoch bis zu einem gewissen Grad theoretisch abgeleitet.^[1a,2,6] Nach aktueller Ansicht ist ein Teil der VOCs überwiegend endogen (z.B. Isopren), andere VOCs können aber auch aus endogenen und exogenen (z.B. Aceton) oder überwiegend aus exogenen Quellen stammen (z.B. Toluol, Acetonitril).

Endogene VOCs entstehen bei normalen und pathologischen Stoffwechselvorgängen im Körper.^[1a,7] So beeinflussen verschiedene Leberenzyme den Aufbau der Zellmembran.^[2] Als Teil der Zellatmung in den Mitochondrien erzeugen Zellen reaktive Sauerstoffspezies (ROS) mit einem ungepaarten Elektron in der äußeren Schale.^[1a,2,8] Das allgemeine Gleichgewicht zwischen Bildung und Desaktivierung von ROS und freien Radikalen bestimmt den oxidativen Stress im Körper.^[2] Unter oxidativem Stress können ROS und freie Radikale, die von den Mitochondrien freigesetzt werden, viele zelluläre Strukturen zerstören, darunter DNA und RNA, und sie können VOCs erzeugen, die dann in die Kör-

[*] Dr. Y. Y. Broza, Prof. H. Haick
The Department of Chemical Engineering and
Russell Berrie Nanotechnology Institute
Technion—Israel Institute of Technology
Haifa 3200003 (Israel)
E-Mail: hhossam@technion.ac.il

Dr. P. Mochalski, Dr. V. Ruzsanyi, Prof. A. Amann^[†]
Institut für Atemgasanalytik der Universität Innsbruck
und Universitätsklinik für Anästhesie und Intensivmedizin
und Medizinische Universität Innsbruck (Österreich)

[†] verstorben am 6. Januar 2015

perflüssigkeiten abgegeben werden.^[1a] Haben sie sich erst im Gewebe angehäuft, greifen ROS viele verschiedene Moleküle an, darunter mehrfach ungesättigte Fettsäuren („polyunsaturated fatty acids“, PUFA) und Proteine. Ethan und Pentan entstehen beispielsweise aus ω 3- und ω 6-Fettsäuren (Abbildung 1).^[9] Sie können auch die Oxidation organischer Verbindungen durch Cytochrom-P450-Enzyme hochregulieren.^[10] Diese Enzymfamilie wird unter anormalen Bedingungen überexprimiert, so in menschlichem Brustkrebsgewebe durch Enzyme wie Aromatase, die Östrogene synthetisiert.^[11] Die meisten Entzündungsprozesse sind ohnehin mit der Bildung von ROS assoziiert, sodass sich ROS-Produkte mit verschiedenen anormalen Zuständen korrelieren lassen.^[1a]

Intuitiv billigt man endogenen VOCs das größte diagnostische Potenzial zu, während man exogene VOCs als Kontamination ansieht, die die chemische Information verzerrt. Es gibt inzwischen aber genügend Hinweise, dass auch exogene VOCs durch den menschlichen Organismus umgesetzt werden können und daher ebenfalls bei Durchmusterung und Diagnose helfen können.^[1a,12] Zu den exogenen Quellen gehören die Einatemluft, Hautabsorptionen, Rauch, Drogen, Nahrungsmittel (aufgenommene Nahrung) sowie alle exogenen Moleküle, die auf anderen Wegen in den Körper gelangt sind.^[7] Ein Teil dieser exogenen Quellen wie Nahrung, Medikamente und Nahrungsmitteladditive, verfälscht die VOC-Analysen von Ausatemluft und Urin.^[12a,13] Dieser Punkt ist allerdings noch wenig bearbeitet, und eine



Yoav Y. Broza wurde 2009 vom Technion, dem Israel Institute of Technology, im Fach Biotechnologie & Lebensmittelverarbeitung promoviert. Seit 2009 arbeitet er als Wissenschaftler im Laboratory of Nanomaterial-Based Devices, wo er die biologische Gruppe leitet, die sich mit Zellanalyse anhand von flüchtigen Metaboliten befasst. Seine aktuellen Arbeiten konzentrieren sich auf die Identifizierung von Biomarkern für Krankheiten und Infektionen mithilfe der Gasanalyse flüchtiger Stoffe und auf die Entwicklung neuer Verfahren zur Probennahme von

Gasen im klinischen und nichtklinischen Umfeld. Er ist außerdem Gastdozent am Technion.



Anton Amann promovierte in Naturwissenschaften an der Eidgenössischen Technischen Hochschule (ETH) in Zürich. Er war Leiter des Institut für Atemgasanalytik der Universität Innsbruck und Professor an der Medizinischen Universität Innsbruck. Seine Forschungsinteressen lagen bei der Analyse von flüchtigen Substanzen in der Ausatemluft und in der Gasphase über Zellen und Bakterien. Er war Träger der Marie-Sklodowska-Curie-Medaille der Polnischen Chemischen Gesellschaft.



Paweł Mochalski ist wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Atemgasanalytik der Universität Innsbruck, das von Prof. Anton Amann geleitet wurde. Er promovierte 2004 am Institut für Kernphysik der Polnischen Akademie der Wissenschaften (IFJ PAN) in Physik. Sein Forschungsinteresse gilt der Atemluft-Analyse, der Analyse des menschlichen Körpergeruchs, flüchtigen Biomarkern für Erkrankungen, Nutzung chemischer Analysen für die schnelle Lokalisierung Eingeschlossener und die Entwicklung analytischer Verfahren zur Entdeckung und Identifizierung neuer flüchtiger Biomarker (GC-MS, PTR-TOF-MS, IMS).



Hossam Haick ist Professor am Technion, dem Israelischen Institut für Technologie und Experte für Nanotechnologie und nichtinvasive Diagnostik. Er ist Gründer und Leiter eines europäischen Konsortiums aus acht Universitäten und Gesellschaften zur Entwicklung künftiger Generationen von Nanosensoren für die Krebsdiagnostik. Seine Forschungsinteressen liegen bei Nanoarray-Vorrichtungen für Screening, Diagnose und Verlaufskontrolle von Krankheiten, nanomaterialbasierten chemischen (flexiblen) Sensoren, elektronischer Haut- und Atemluft-Analyse, flüchtigen Biomarkern und molekularen elektronischen Systemen.



Veronika Ruzsanyi ist Postdoktorandin am Institut für Atemgasanalytik der Universität Innsbruck und arbeitet an verschiedenen Projekten der Medizinischen Universität Innsbruck. Sie promovierte 2006 im Fach Bioingenieurwesen am ISAS – Institut für Analytik. Seit 2010 arbeitet sie als Forscherin bei der GAS GmbH, wo sie Sensorsysteme auf der Basis von Ionenbeweglichkeitsspektroskopie entwickelt. Sie erhielt im Jahr 2010 ein Lise-Meitner-Stipendium des Österreichischen Wissenschaftsfonds. Ihr Interesse gilt der Analyse flüchtiger Metabolite mit verschiedenen Techniken und der Entwicklung neuer Atemtests.

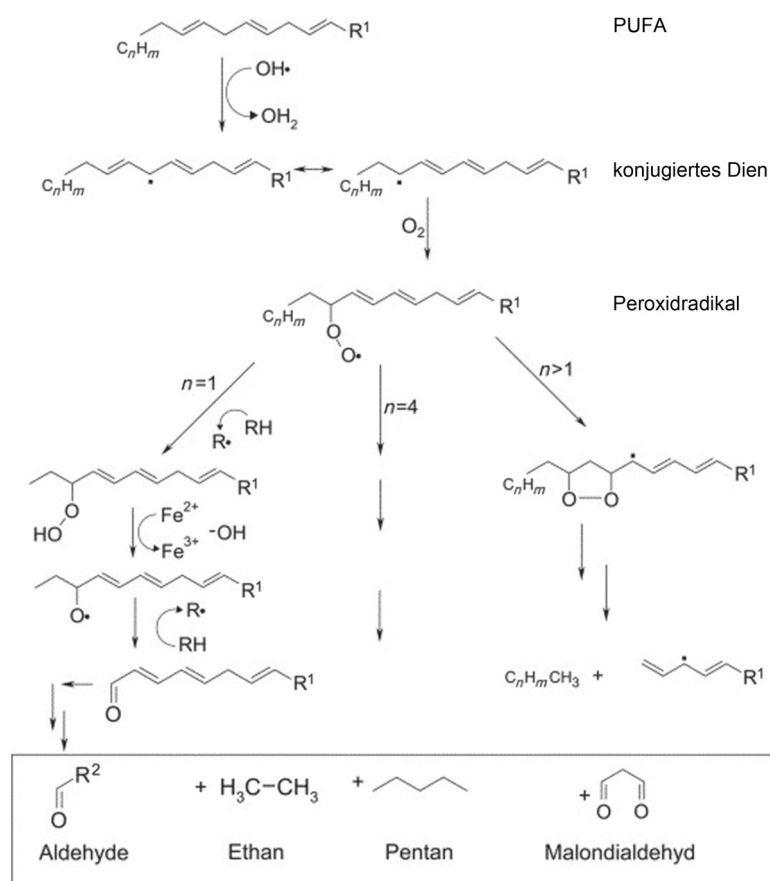


Abbildung 1. Durch freie Radikale ausgelöste Lipidperoxidation: mögliche Reaktionen und Reaktionsprodukte (Wiedergabe mit freundlicher Genehmigung nach Lit. [9]).

konzentrierte Forschung wird wichtig für unser Verständnis und den Aufbau einer Volatolom-Analyse sein.^[13a]

Die jüngsten Erkenntnisse zu den biochemischen Umsetzungen endogener und exogener Chemikalienfamilien (z.B. Kohlenwasserstoffe [Alkane, Alkene], primäre und sekundäre Alkohole, Aldehyde und verzweigte Aldehyde, Ketone, Ester, Nitrile und aromatische Verbindungen) haben wir bereits vorgestellt.^[1a,2] Zusammengefasst:

- 1) Kohlenwasserstoffe werden hauptsächlich bei der Peroxidation von PUFAs gebildet; sie stammen meist aus Lipiden in zellulären und subzellulären Membranen.
- 2) Alkohole werden aus dem Magen-Darm-Trakt ins Blut aufgenommen. Alkohol wird durch Enzyme wie Alkohol-Dehydrogenasen umgesetzt. Gleichzeitig läuft eine Reduktion von Nicotinamid-Adenindinucleotid (NAD^+ zu NADH) und Cytochrom-P450 (CYP2E1) überwiegend in der Leber ab. Ein kleiner Anteil der Alkoholfraktion wird durch Atemluft, Urin, Schweiß, Faeces, Muttermilch und Speichel ausgeschieden.^[2]
- 3) Aldehyde im Körper stammen aus verschiedenen Quellen: 1) metabolisierte Alkohole; 2) Reduktion von Hydroperoxid durch Cytochrom-P450 als Sekundärprodukt der Lipidperoxidation;^[14] 3) Tabakrauch (gesättigte und ungesättigte Aldehyde, z.B. Formaldehyd)^[15] und Entgiftungsreaktionen von Tabak-Nebenprodukten;^[16] 4) Nahrungsmittel.^[2]

- 4) Ketonkörper, also Verbindungen, die wie Aceton von der Leber aus Fettsäuren produziert werden, werden durch den Krebs-Zyklus in peripheren Geweben oxidiert.^[9,17] Aceton (eine sehr häufige VOC beim Menschen) entsteht in der Leber durch die Decarboxylierung von Acetacetat aus überschüssigem Acetyl-CoA.^[9] Die Ketonkonzentrationen im Blut werden auch durch die Nahrung beeinflusst und steigen, wenn der Fett- oder Proteinstoffwechsel aktiviert wird (z.B. durch Kachexie).^[18]
- 5) Aromatische und Nitril-VOCs werden allgemein als Verunreinigungen aus exogenen Quellen angesehen (z.B. Zigarettenrauch, Umweltbelastungen). Sie werden im Fettgewebe des Körpers gespeichert, sind hochreaktiv und verursachen Schäden durch Lipidperoxidation.^[19]

Einige der bereits erwähnten postulierten biochemischen Mechanismen der VOC-Bildung wurden in jüngster Zeit experimentell überprüft. Zu den untersuchten Verbindungen gehören 1) Ethan und Pentan, die sich als Produkte der Lipidperoxidation erwiesen,^[9,20] 2) Isopren als Produkt des Mevalonat-Stoffwechselweges,^[21] wobei auch noch andere Wege möglich sind,^[22] und 3) Aceton, das durch Decarboxylierung von Acetacetat in Leber und Blut entsteht.^[9]

2.2. Wird das Volatolom genetisch beeinflusst?

Genetische Veränderungen, die mit Tumorstadium assoziiert sind, können auch zu Veränderungen der VOCs in der Mikroumgebung der Zelle und damit in den Körperflüssigkeiten des Patienten führen, wie dies bereits bei Krebsforschungen bemerkt wurde.^[23,24] Normalerweise wird die ge-

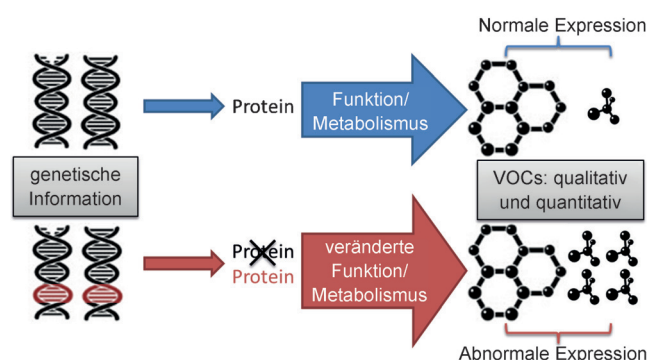


Abbildung 2. Informationsfluss bei einer genetischen Veränderung, welche die VOC-Produktion beeinflusst. Normalerweise wird die genetische Information phänotypisch durch die Produktion spezifischer Metabolite in Form von VOCs exprimiert (oberer Teil). Veränderungen der genetischen Information durch Schäden an der DNA können zur Folge haben, dass kein Produkt, ein verändertes Produkt oder in manchen Fällen manche VOCs in veränderter Konzentration gebildet werden (unterer Teil).

netische Information phänotypisch durch die Bildung spezifischer Metabolite als VOCs exprimiert (Abbildung 2, obere Reihe). Abweichungen in der genetischen Information aufgrund einer DNA-Schädigung können einen Produktausfall, ein verändertes VOC-Produkt und manchmal eine Konzentrationsänderung eines VOC verursachen (Abbildung 2, untere Reihe).

In einer Untersuchung zur Bildung von VOCs in menschlichen Zelllinien verglichen Aksenov et al.^[25] zwei humane Leukocyten-Antigen(HLA)-Allele; dieser einzelne genetische Unterschied verursacht ein einzigartiges VOC-Profil, indem er die nachgelagerten Stoffwechselwege verändert^[25] (z. B. Änderungen bei der Freisetzung von VOCs als Alkohole oder Ketone). Sie folgerten, dass Tumorzellen, normale Zellen, Immunzellen und infektiöses Material zur Bildung von VOCs beitragen können.^[25] Es gibt andere Vermutungen, dass ein HLA-Unterschied die Zusammensetzung freigesetzter VOCs (z. B. Alkohole und Kohlenwasserstoffe) insbesondere von Tetradeconsäure aus der Haut, verändert.^[26]

Bei der Untersuchung von (Lungen-)Krebs befassten sich mehrere Forscher mit der Möglichkeit, mit verschiedenen Analysemethoden den Tumorzelllinien charakteristische volatolomische Fingerabdrücke zuzuordnen, indem sie die VOCs in der Gasphase untersuchten.^[6b, 23b, 27] Triethylamin, Benzaldehyd und Decanal verschwanden vollständig oder wurden im Gasraum über Lungenkrebszellen mit spezifischen Onkogenen wie EGFRmut, KRASmut und EML4-ALK selektiv reduziert.^[23b] Aromatische Verbindungen wie Toluol waren bei den getesteten Onkogenen zwar erhöht, sind aber vermutlich exogenen Ursprungs.^[23b] Vergleicht man viele Zelllinien miteinander, so erhält man zwar einen Eindruck von der großen genetischen Diversität von Lungentumoren, doch ist die gleiche genetische Diversität hinderlich, wenn man direkte Verbindungen zu spezifischen tumorassoziierten Stoffwechselwegen identifizieren will. Außerdem sind Tumorzelllinien von Natur aus genetisch instabil und weisen einen hohen Grad an Aneuploidie auf.^[28] Dies verleiht den Zellen eine gewisse Plastizität, die bei molekularen Untersuchungen eine genetische Drift verursacht, die es erschwert, eine Zuordnung von VOC-Mustern zu spezifischen Stoffwechselwegen nachzuweisen.

Ein einfach zu nutzendes System, um die Auswirkung spezifischer krebsbegünstigender Mutationen auf die Freisetzung von VOCs zu verfolgen, könnte sich auf genetisch veränderte humane Bronchialepithelzellen (HBECS) stützen.^[29] HBECS sind verglichen mit Tumorzelllinien genetisch stabil und nur geringfügig aneuploid.^[30] So hat man eine Ausgangszelllinie, in der sich der Effekt zusätzlicher genetischer Läsionen studieren lässt.^[29, 31] In Lungenkrebs-Zelllinien mit minimalen genetischen Unterschieden ließen sich Veränderungen in VOCs massenspektrometrisch aufspüren. Die VOCs, die zu der Unterscheidung beigetragen haben, stammen aus den Verbindungsgruppen der Alkane, Alkene, Benzolderivate, Ketone, Aldehyde und Alkohole.^[23a] Benzaldehyd erwies sich beispielsweise als signifikante Komponente der volatolomischen Signatur von KRAS und TP53.^[23a] In Pilotversuchen mit Zelllinien mit der KRAS-Mutation war Benzaldehyd vollständig verschwunden;^[32] in einer anderen

Untersuchung wurde die Verbindung in Zellen mit einer KRAS-Mutation oder einem TP53-Knock-down in geringen Konzentrationen nachgewiesen.^[23a] Eine andere Substanz, die in Lungenkrebs-Zelllinien mit einer TP53-Herunterregulierung vollständig verschwindet, ist 2,2,3-Trimethylpentan.^[23a] Solche Ergebnisse können die Entwicklung einer VOC-basierten Diagnostik fördern, mit der man das Profil genetischer Mutationen aus der Gasphase über einem Lungentumorgewebe bestimmt. Proben können aus einer Biopsie oder aus den Körperflüssigkeiten des Patienten (z. B. Atemluft) stammen. Dies könnte den Ärzten helfen, ihre therapeutischen Entscheidungen schneller zu treffen als anhand von molekulargenetischen Verfahren.

2.3. VOC-Emissionen in/aus verschiedenen Körperflüssigkeiten

In einer aktuellen Übersicht über VOCs aus verschiedenen Körperflüssigkeiten wurden von 2577 insgesamt gefundenen Verbindungen 1764 VOCs in allen Quellen nachgewiesen, darunter auch ähnliche Verbindungen, die in anderen Quellen aus vermutlich gesunden Spendern isoliert und anhand der CAS-Nummern identifiziert wurden.^[13a, 33] In Abbildung 3 ist die prozentuale Verteilung der VOCs auf die

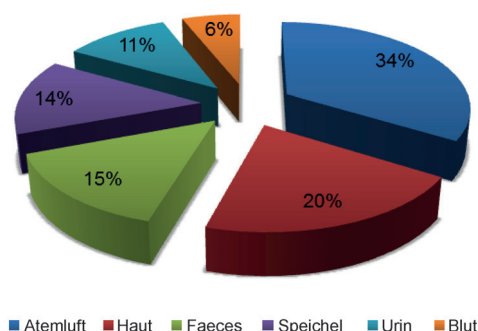


Abbildung 3. Prozentanteil von VOCs in verschiedenen Körperflüssigkeiten, bestimmt an gesunden Probanden.^[33a] Erfasst wurden insgesamt 2577 Verbindungen, von denen ein Teil nur in spezifischen Körperflüssigkeiten vorkommt (1-Hexen findet sich z. B. nur in der Atemluft), während andere in drei und mehr vorkommen (wie Acetaldehyd, das sich in allen Flüssigkeiten wiederfindet).

verschiedenen Körperflüssigkeiten dargestellt. Man kann annehmen, dass die Zahl der VOCs, die in jeder Körperflüssigkeit identifiziert wurde, mit der Zahl der Untersuchungen dieses spezifischen Segments korreliert.

In den folgenden Abschnitten werden wir Herkunft und postulierte Emissionswege der VOCs in und aus jeder dieser Körperflüssigkeiten darstellen und diskutieren.

2.3.1. VOC-Emission aus Zellen und Geweben ins Blut

Die Zelle ist das kleinste funktionelle Kompartiment des Körpers, das VOCs produzieren kann.^[34] Die verschiedenen Zellen des Körpers sind an einer riesigen Palette von (VOC-)Stoffwechselvorgängen beteiligt, insbesondere im Krankheitsfall, wenn Abweichungen im Stoffwechsel aufgrund der

Reaktion des Körpers auf Verletzungen oder Infektionen erfolgen.^[25,35] Eine Hauptquelle von VOCs ist die Schädigung von Zellen durch direkte oder indirekte Auswirkungen von oxidativem Stress.^[1a] ROS, die durch die Mikro- und/oder Makroumgebung der Zelle natürlicherweise gebildet werden, verursachen direkte Oxidationsschäden.^[1a] Indirekter oxidativer Stress entsteht durch exogene VOCs (die durch Nahrung, Rauchen usw. aufgenommen wurden), die ins Cytoplasma diffundieren und an Organe oder Organellen im Körper anhaften.^[19] Infolge dieses Prozesses werden Proteine, PUFA und DNA durch Peroxidation geschädigt und setzen lipophile (flüchtige) Verbindungen frei, die im Fettgewebe des menschlichen Körpers gespeichert werden. Die gespeicherten VOCs werden dann über Wochen oder gar Monate nach der eigentlichen Exposition gegenüber den exogenen VOCs wieder freigesetzt.^[2]

Bislang wurden in vielen Studien die VOC-Profile untersucht, die mit oxidativem Stress bei Säugerzellen zusammenhängen.^[6b,23b,27b,c,32,36] Die meisten dieser Untersuchungen wurden jedoch *in vitro* ohne eine reale Modellierung von umgebendem Gewebe und von Blutgefäßen durchgeführt. Um diesen Mangel zu kompensieren, sollte ein geeignetes Modell der Zell-Blut-Schranke zugrundegelegt werden. In diesem Modell kann die Annahme eines Flusses von VOCs zwischen Zell- und Blutkompartiment anhand der Verteilungskoeffizienten zwischen Fett und Blut ($\lambda_{f,b}$) berechnet werden.^[1a] Dieser Koeffizient beschreibt die Gleichgewichtskonzentrationen von VOCs in Fettgeweben und (lipophilen) Zellmembranen bezogen auf Blut. Ein hohes $\lambda_{f,b}$ entspricht einer hohen Konzentration der VOCs in Lipidmembranen (z.B. in den Endothelzellen, die die Blutgefäße auskleiden). Hohe Konzentrationen von VOCs in den Lipidmembranen können den Übertritt der VOCs vom Fett ins Blut beeinflussen. Umgekehrt werden bei niedrigen $\lambda_{f,b}$ -Werten die VOCs, die in der Zellmembran gespeichert sind, leicht ins Blut abgegeben.

2.3.2. VOC-Emission vom Blut in die Atemluft

Bisher wurden in Atemluftproben 874 VOCs gefunden; demnach ist Atem die am besten untersuchte Quelle.^[13a] Das Prinzip der Emission vom Blut in die Atemluft ist, dass Änderungen der VOCs im Blut sich auch in messbaren Änderungen in der Atemluft widerspiegeln.^[37] Die Verteilung von VOCs in Atem und Blut wird durch aktive und passive Mechanismen bestimmt. Thermodynamisch ist es möglich, $\lambda_{f,b}$ und den Verteilungskoeffizienten zwischen Blut und Luft ($\lambda_{b,a}$) zu korrelieren. Dieser Koeffizient bestimmt die Gleichgewichtsverteilung der VOCs zwischen Blut und Alveolarluft.^[38] Die Bestimmung der Verteilungskoeffizienten wurde in früheren Aufsätzen von uns^[1a,39] und anderen^[40] beschrieben. Einige VOCs tauschen eher in den Atemwegen aus und nicht in den Alveolen; dies hängt von $\lambda_{b,a}$ ab. Der $\lambda_{b,a}$ -Wert von krankheitskorrelierten VOCs schwankt und hängt von den spezifischen chemischen und physikalischen Eigenschaften der einzelnen Verbindung ab. Zwischen den verschiedenen VOCs kann $\lambda_{b,a}$ um über 12 Größenordnungen variieren.^[1a,39] Anders ausgedrückt kann sich für verschiedene VOCs, die in der Ausatemluft die gleiche Konzentration

haben, die Konzentration in Fett und Blut um den enormen Faktor 10^8 oder mehr unterscheiden.^[1a]

Theoretische und experimentelle Untersuchungen haben gezeigt, dass Gase mit geringer Löslichkeit im Blut, vor allem also unpolare VOCs ($\lambda_{b,a} < 10$; dimensionslos: $[\text{mol L}_b^{-1} / \text{mol L}_a^{-1}]$) fast ausschließlich in den Alveolen austauschen, während Verbindungen, die in Blut gut löslich sind, z.B. polare VOCs ($\lambda_{b,a} > 100$) eher in den Atemwegen austauschen.^[40a,41] Eine Untersuchung des pulmonalen Gasaustauschs ergab, dass VOCs mit $10 < \lambda_{b,a} < 100$ gleichermaßen in den Atemwegen und den Alveolen austauschen.^[40a] Das VOC-Profil wird auch durch die Retention in der Lunge beeinflusst, also durch den Anteil der Moleküle, die zu jedem Zeitpunkt nach Ein- und Ausatmen im Atemtrakt verbleibt.^[42] Die letztendliche Verteilung und Abatmung der VOCs hängt also von ihren physikalischen und chemischen Eigenschaften und von ihrer Wechselwirkung mit den verschiedenen alveolaren Reinigungsmechanismen ab.^[42,43]

2.3.3. VOC-Transport vom Blut in den Urin

Viele VOCs, hauptsächlich wasserlösliche, werden aus dem Körper in den Urin ausgeschieden, der zu über 95 % aus Wasser besteht. VOCs gelangen überwiegend über drei Ausscheidungsmechanismen der Niere in den Urin: Filtration in den Glomeruli, tubuläre Reabsorption und tubuläre Sekretion.^[44] Die Geschwindigkeit, mit der jeder Metabolit/VOC filtriert wird, ist eine Funktion der glomerulären Filtrationsrate multipliziert mit der Plasmakonzentration.^[44] Diese Beziehung geht davon aus, dass VOCs frei filtrierbar sind und nicht an Plasmaproteine gebunden sind. Insbesondere die Endprodukte des Stoffwechsels (Harnstoff, Kreatinin, Harnsäure und Urate) werden schlecht reabsorbiert und daher in großen Mengen ausgeschieden.

Die VOCs im Urin entstammen einer Vielzahl chemischer Familien: Säuren, Alkohole, Ketone, Aldehyde, Amine, N-Heterocyclen, O-Heterocyclen, Schwefelverbindungen und Kohlenwasserstoffe.^[13e,33a] Urin enthält viele Ketone, vor allem als Ergebnis der Reaktion von Leberenzymen bei erhöhter Fettoxidation und aufgrund der Tatsache, dass der Überschuss an Acetyl-CoA nicht über den Krebs-Zyklus abgebaut werden kann. Ein kleinerer Teil stammt von bakterieller Aktivität im Darm.^[13e] Hohe Konzentrationen von Ketonkörpern wurden auch bei Diabetes-mellitus-Patienten gefunden.^[13e] Flüchtige kurzkettige Fettsäuren finden sich ebenfalls im Urin, doch war die Korrelation zwischen Urin- und Serumkonzentration für die fünf häufigsten Fettsäuren im Blutserum nur schlecht.^[45] Dies könnte an Unterschieden der Filtrationsraten in den Nieren liegen. Verschiedene VOCs (besonders Terpene) werden auf die Verdauung der Nahrung zurückgeführt. Zusätzliche exogene VOCs, die meist aus Medikamenten- und Drogenkonsum stammen, werden ebenfalls über den Urin ausgeschieden und können daher das VOC-Profil im Urin beeinflussen.^[13a,d-f]

2.3.4. VOC-Emission vom Blut zur Haut

Mehr als 500 VOCs wurden in Extrakten aus humaner Haut identifiziert.^[33a] Die Zusammensetzung ist ausgespro-

chen divers, aber nur wenige chemische Familien sind repräsentiert, wie Aldehyde, Alkane, Carbonsäuren verschiedener Kettenlänge und ihre Ester, kurzkettige Alkohole und einige Ketone;^[46] die vorherrschenden Verbindungen sind 6-Methyl-5-hepten-2-on, Nonanal, Decanal und (*E*)-6,10-Dimethyl-5,9-undecadien-2-on.^[46] VOCs der Haut werden oft von Drüsen sezerniert oder sind Produkte mikrobiellen Stoffwechsels auf der Hautoberfläche.^[47]

Die Verteilung der Drüsen auf der Hautoberfläche spiegelt teilweise die Unterschiede in den VOCs wider, die von unterschiedlichen Regionen des menschlichen Körpers abgegeben werden.^[46] Die Drüsen liegen in der Dermis und enden in den Sekretionskanälchen, die sich zur Hautoberfläche und den Haarfollikeln hin öffnen (Abbildung 4).

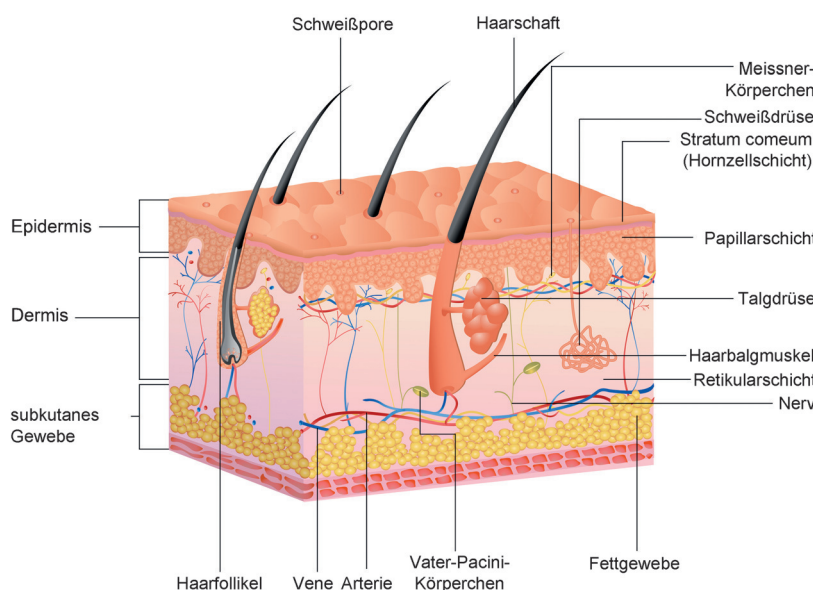


Abbildung 4. Die Haut, das größte Körperorgan, gibt die meisten VOCs auf dem Weg über die Drüsen der Dermis, die Schweißporen und die Haare ab.

Apokrine Drüsen tragen wesentlich zu den VOC-Mischungen in den Achselhöhlen bei, während die VOC-Mischung an den Händen eine Kombination von ekkriner und Talgdrüsensekretion ist.^[48] Die ekkrine Exkretion (Schweiß) besteht gewöhnlich zu 98 % aus Wasser; der Rest sind verschiedene organische und anorganische Verbindungen (Kochsalz, Lactat und Harnstoff), die meist durch Osmose transportiert werden. Die ekkrine Sekretion entstammt der extrazellulären Flüssigkeit und ist daher ein Abbild der Blutplasma-Chemie.^[48] Teilweise unterliegt die Sekretion aus diesen Drüsen der Stimulation durch das sympathische Nervensystem.^[44] Schweißabsonderung wird durch Acetylcholin angeregt und durch Atropin gehemmt.^[49] Die ekkrinen Drüsen sind über den ganzen Körper verteilt; jede Person besitzt etwa 2 bis 5 Millionen dieser Drüsen.^[49]

Eine große Menge an Cholesterin und anderen Lipiden ist in der Hornschicht der Haut abgelagert.^[44] Es ist daher möglich, dass Abbauprodukte der Lipidperoxidation, die VOCs, auch zur Hautoberfläche sezerniert werden. Wichtig ist, dass unter bestimmten Zuständen der Haut (z.B. bei

Melanomen) eine direkte Freisetzung von VOCs aus den betroffenen Hautregionen möglich ist.^[50] Neben endogenen VOCs^[51] können auch exogene Verbindungen, wie mit VOCs verwandte xenobiotische Wirkstoffe und nahrungsbasierte Verbindungen, direkt von der Haut sezerniert werden; diese können zwischen verschiedenen Personen stark variieren.^[44,52] Außerdem gibt es zahlreiche Untersuchungen zum Einfluss der mikrobiellen Flora auf die VOCs der Haut, die ihrerseits zwischen einzelnen Personen sehr unterschiedlich sein können.^[46,53]

Von den verschiedenen Hautregionen ist die Achselhöhle die wahrscheinlich wichtigste. VOCs aus den Achselhöhlen bestehen im allgemeinen aus Alkanen und C₆- bis C₁₁-Carbonsäuren.^[53c,54] Andere Regionen der Haut, wie die Hände, sind hauptsächlich durch Aldehyde und Ketone charakterisiert, während sich auf der Haut der Füße im wesentlichen Carbonsäuren und kurzkettige Fettsäuren finden.^[46]

2.3.5. VOC-Emission aus oder in die Faeces

Fast 480 VOCs wurden bislang aus Stuhlproben identifiziert.^[33a] Typische Verbindungen, die im Darm durch bakterielle Fermentation entstehen, sind Methan^[55] und Wasserstoff.^[56] Die Darmflora ist auch verantwortlich für den spezifischen Geruch der Faeces, der durch Fermentation von Aminosäuren im Dickdarm entsteht. Unter den geruchsbildenden Verbindungen sind aliphatische Amine, Ammoniak, verzweigt-kettige Fettsäuren, Phenol- und Indol-Derivate und flüchtige schwefelhaltige Verbindungen.^[57] Von den nachgewiesenen VOCs findet man kurzkettige Fettsäuren,^[58] verzweigt-kettige Fettsäuren, Indole^[59] und Phenole^[60] in signifikanten Konzentrationen im Stuhl. Alkohole entstehen wahrscheinlich durch Säurereduktion durch Darmbakterien. Auch verschiedene aromatische Verbindungen lassen sich identifizieren; sie sind ebenfalls zum Teil Ergebnis der Fermentation durch Darmbakterien. Einige aromatische VOCs (z.B. Furane) werden auf Fructose-Stoffwechsel durch kommensale Organismen, darunter auch Pilze, zurückgeführt.^[33a] Verschiedene Aldehyde, z.B. Acetaldehyd, wurden gefunden; sie stammen vielleicht aus dem Abbau von Nahrung oder aus mikrobiellem Stoffwechsel, was dann mit Darmkrebs in Verbindung gebracht wird.^[61] Andere VOCs, die sich in der Gasphase der Faeces finden, wie Chloroform, gehen vermutlich auf Verunreinigungen zurück, die durch Nahrung, Wasser oder Umweltbelastungen eingetragen wurden.^[33a] Auch das menschliche Mikrobiom, also die Gesamtheit aller Mikroorganismen, die im oder auf dem menschlichen Körper leben, sollte berücksichtigt werden. Mikrobiom-Analysen beim Menschen haben ergeben, dass die Darmflora, die größte Gruppe des Mikrobioms, eine komplexe Vergesellschaftung von mehr als 500 Arten ist.^[62] Während menschliche Stuhlproben eine große bakterielle Vielfalt zeigen, haben sich wichtige Stoffwechselwege wie Carbonsäure- und Amino-

säuremetabolismus als stabil erwiesen.^[63] Daher hat die Darmflora einen großen Einfluss auf den Stoffwechsel des menschlichen Wirts, und sie spielt eine enorme Rolle für die Physiologie der Säuger.^[62] Kommensale Bakterien vermitteln die Extraktion, Synthese und Absorption zahlreicher Metabolite.^[64] Außerdem können unterschiedliche Ernährungsgewohnheiten die Zusammensetzung der Darmflora beeinflussen; dadurch entstehen unterschiedliche metabolische Wechselwirkungen und zahlreiche Metabolite. So kann eine fettreiche Ernährung die Ansiedlung Desoxycholsäure-produzierender Bakterien begünstigen, was wiederum Veränderungen in Leberzellen induziert, die die Entwicklung von Lebertumoren begünstigen könnten.^[62] Verschiedene Faktoren wie Medikamenteneinnahme und Ernährung können also die Darmflora beeinflussen; dies ändert die Aktivität des Mikrobioms im Darm, was wiederum zur Bildung flüchtiger und nichtflüchtiger Metabolite führt. Gegenwärtig gibt es jedoch fast keine Daten über den Einfluss solcher Änderungen der Darmflora auf das Volatolom des Menschen.^[65]

2.3.6. VOC-Emission aus oder in den Speichel

Etwa 360 VOCs wurden bislang aus Speichelpuben identifiziert. Passive Diffusion ist der häufigste Transportmechanismus aus dem Blut in den Speichel, daneben auch Ultrafiltration und Diffusion.^[66] Biochemische Informationen aus dem Blut finden sich also in den VOCs im Speichel wieder. Eine Reihe von Untersuchungen belegte den Zusammenhang zwischen den VOCs in Blut und Speichel,^[67] der möglicherweise auch für metabolische und physiologische Studien genutzt werden kann.^[66b,d] Dabei muss allerdings berücksichtigt werden, dass neben den Blut-VOCs auch Verbindungen aus Serum, Zahnfleisch, Nasenhöhle, Magen-Darm-Reflux, Nahrungsmittelresten, Mundhöhlenflora, kommerziellen Produkten und Umweltbelastungen gefunden werden können.^[68]

3. Beziehungen zwischen den VOCs in verschiedenen Körperflüssigkeiten

Die VOC-Daten aus verschiedenen Körperflüssigkeiten haben spannende Fragen aufgeworfen, wie: Warum kommt nur ein geringer Anteil von 1 % aller Verbindungen in allen Körperflüssigkeiten vor? Warum findet man manche VOCs nur in der Atemluft, nicht aber in Blut oder Speichel? Auf solche Fragen gibt es noch keine klaren Antworten, denn: 1) Die Herkunft vieler VOCs und ihr Vorkommen im menschlichen Organismus sind ungeklärt; 2) die technologischen Möglichkeiten der Analysegeräte sind begrenzt;^[33] 3) die Verfahren zur Identifizierung der VOCs reichen nicht aus; und/oder 4) es gibt nur wenige Untersuchungen von Körperflüssigkeiten jenseits der Atemluft.

Eine mögliche Erklärung für die biologische Umwandlung endogener und exogener Verbindungen in unterschiedliche flüchtige und schwerflüchtige Verbindungen ist, dass sie durch verschiedene enzymatische Aktivitäten vor allem in der Leber entstehen; hier spielen die Cytochrom-P450-Proteine (CYPs) eine bedeutende Rolle.^[69] CYPs sind große und

diverse Oxidasen, die die Oxidation organischer Verbindungen katalysieren,^[69] beispielsweise die Hydroxylierung von Alkenen zu Alkoholen oder die Reduktion von Hydroperoxiden als Sekundärprodukte der Lipidperoxidation zu Aldehyden.^[14] Die Aktivität der Leber beeinflusst zwar viele Körperprozesse, doch hauptsächlich ist sie mit dem Verdauungsvorgang befasst. Die gleichen CYPs sind aber auch in der Lage, eine große Zahl unpolarer VOCs wie Kohlenwasserstoffe zu polaren Verbindungen wie Alkohole (z.B. die biologische Umwandlung von Toluol zu Benzylalkohol) zu oxidieren.^[2,33a]

Aldehyd-Dehydrogenasen in der Leber können Aldehyde zu Carbonsäuren oxidieren, Amine zu weniger flüchtigen N-Oxiden und Ammoniak zu unpolarem Harnstoff.^[2] Diese Verbindung wird zuerst von Phase-I-Enzymen umgesetzt, meist vom Cytochrom-P450-Enzymsystem, und dann in eine besser sezernierbare Form konjugiert. In der enzymatischen Abwehrreaktion kann die Leber Verbindungen in Konjugate umwandeln, die besser wasserlöslich und sezernierbar sind und von anderen Enzymsystemen weiterbehandelt werden, wie den Glutathion-S-transferasen und N-Acetyltransferasen,^[70] die die VOCs so in nichtflüchtige Verbindungen umsetzen.

Diese Biotransformationsaktivität ist nicht auf die Leber beschränkt, sondern kommt auch in der Lunge, im Gefäßsystem und bei Enzymen der Nase vor.^[71] Die Milz ist zur Biotransformation befähigt, denn ihre Epithelzellen haben eine höhere Arylamin-Acetyltransferase-Aktivität als die Leber.^[72] Daher ist wahrscheinlich, dass eine Substanz, die nicht im Urin gefunden wird, sondern im Blut, von der Niere, vielleicht sogar von der Milz, chemisch umgewandelt worden ist. Es kann auch vorkommen, dass schwerlösliche VOCs des Urins im Zuge der Urinausscheidung verloren gehen und daher in den Proben für die folgende chemische Analyse unterrepräsentiert sind. VOCs, die im Magen-Darm-Trakt (und im Stuhl) vorkommen oder gebildet werden, können ins Blut transportiert werden und letztlich über die Lunge abgeatmet werden.

Die Kontrolle von Sekretion, Transport und Bildung der VOCs im Körper kann in drei komplementäre Systeme eingeteilt werden (Abbildung 5). Sympathisches und parasympathisches Nervensystem sind in diesem Zusammenhang vor allem für die Kontrolle verschiedener Organfunktionen verantwortlich, beispielsweise, für die Anregung der Drüsensekretion. Das Verdauungssystem überwacht Verdauung und Aufnahme von Nahrung und anderen Substanzen wie Medikamenten und Exotoxinen. Das Kreislaufsystem schließlich kann als Hauptleitung angesehen werden, die die flüchtigen Marker durch den Körper transportiert. Verschiedene Zellmetabolite wechseln zwischen der Peripherie des Körpers und dem Blutstrom hin und her und werden von Atemluft, Haut, Urin oder Stuhl freigesetzt oder aufgenommen. Daher ist die Analyse der Blut-VOCs in Beziehung zu den anderen Körperflüssigkeiten von besonderer Bedeutung. Dennoch stellt die Analyse vieler Blut-VOCs noch immer eine erhebliche technische Herausforderung dar (z.B. Probenaufbereitung, dynamischer Messbereich des Detektors usw.), sodass die so erhaltene Information begrenzt ist.^[73] Es muss also ein besseres Modell entwickelt werden, das auf kombinierten

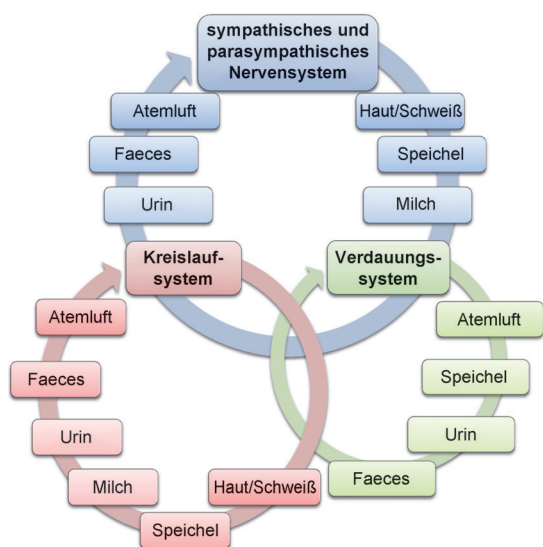


Abbildung 5. Die drei Hauptsysteme, die Sekretion, Transport und Produktion der chemischen Verbindungen / VOCs im Körper einander ergänzend kontrollieren.

empirischen Daten beruht, um die tatsächlichen Beziehungen zwischen den VOCs in verschiedenen Körperflüssigkeiten genauer zu verstehen.

4. Hybride Volatolomik

4.1. Das Konzept

In diesem Aufsatz behaupten wir, dass die Kombination der Signale von leicht und schwerer flüchtigen VOCs aus sich ergänzenden Quellen eines Körpers in einem bestimmten Krankheitszustand das umfassendste Profil seiner flüchtigen Biomarker und somit die beste Repräsentation seines Volatoloms liefert. Die Überlegungen, die dieser Hypothese zugrundeliegen, werden im Folgenden beschrieben und begründet.

Jede Körperflüssigkeit hat ein charakteristisches Muster an VOCs, in dem unterschiedliche Verbindungsklassen dominieren (Abbildung 6). So findet sich in der Atemluft ein nennenswerter Anteil an Kohlenwasserstoffen, während das Muster aus Urin reich an Aldehyden, Ketonen, flüchtigen Schwefelverbindungen und Alkoholen ist. Das Vorkommen so vieler VOC-Klassen im Urin kommt durch die aktive Vorkonzentration durch die Niere zustande.^[33a,44] Somit liefert eine Untersuchung des Urins wertvolle Einsichten in die VOCs des Bluts, die dort manchmal in derart niedrigen Konzentrationen vorkommen, dass sie die Nachweisgrenzen moderner analytischer Geräte unterschreiten. Andererseits kommen Kohlenwasserstoffe nur in geringen Mengen im Urin vor, was daher rühren kann, dass die Nieren diese Verbindungsklasse nicht aus dem Blut extrahieren können, oder dass die Kohlenwasserstoffe beim Urinieren wegen ihrer schlechten Löslichkeit verloren gehen oder beides. Man kann deshalb davon ausgehen, dass Kohlenwasserstoffe in Urinproben unterrepräsentiert sind und dass diese Flüssigkeit

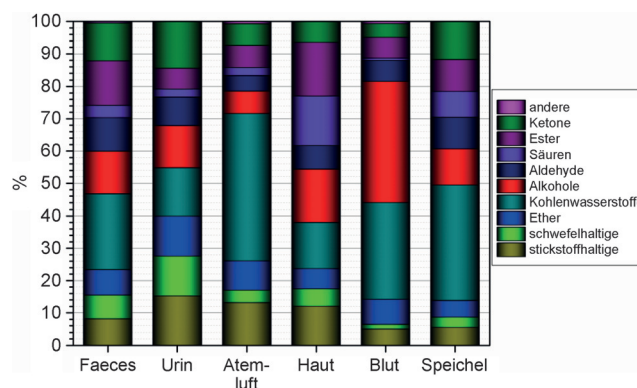


Abbildung 6. Relative Zahl der Verbindungen jeder chemischen Klasse, die im Volatolom nachgewiesen wurden (Wiedergabe mit freundlicher Genehmigung nach Lit. [33a]).

daher nur eingeschränkt brauchbar ist, wenn Verbindungen aus dieser Klasse als Krankheitsmarker angesehen werden. Dieses Problem lässt sich jedoch umgehen, wenn man parallel zu Urin auch die Ausatemluft analysiert.^[74] Hier stellt sich die schlechte Löslichkeit in Blut/Wasser als Vorteil heraus, da sie die schnelle Eliminierung der VOCs aus dem Blutstrom (und dem Körper) über den Gasaustausch in der Lunge fördert. Außerdem unterdrückt die schlechte Löslichkeit in Blut und Wasser den Gasaustausch zwischen Luft und Schleimhäuten in den oberen Atemwegen und erhält dadurch die krankheitsbedingte Information, die durch die Kohlenwasserstoffe vermittelt wird.^[41b]

Haut kann als reiche VOC-Quelle komplementär zu Blut, Atem und Urin dienen, da das Volatolom der Haut durch einen nennenswerten Anteil an Carbonsäuren und Alkoholen gekennzeichnet ist. Das gehäufte Auftreten von Molekülen aus diesen Verbindungsklassen wird auf das Vorkommen von Talg zurückgeführt, der eine einzigartige geschlossene Lipidschicht (hauptsächlich aus Squalen, Wachsester und Fettsäuren) bildet und antibakteriell und antimykotisch sowie als Lichtschutz wirkt.^[75] Talg ist ständig mikrobieller Aktivität, oxidativem Stress durch UV-Bestrahlung und Luftverschmutzung ausgesetzt. Durch die Einwirkung von ROS wird Talg unter Bildung zahlreicher verschiedener leicht und mäßig flüchtiger Produkte abgebaut, die eher in der Haut verbleiben. Dazu zählen Aldehyde, Ketone, Kohlenwasserstoffe, Alkohole und Ester.^[75,76]

Der molare Fluss der VOCs, die aus Körperflüssigkeiten freigesetzt wurden, kann sehr unterschiedlich sein, entweder finden sich unterschiedliche VOCs in der gleichen Körperflüssigkeit oder ähnliche VOCs in unterschiedlichen Flüssigkeiten. Über den molaren Fluss von VOCs gibt es nur spärliche Daten, die aber deutlich die Unterschiede innerhalb jeder Körperflüssigkeit zeigen. Beispielsweise findet sich in den Ausdünstungen der Haut Isopren mit einer medianen Freisetzung von $4.6 \text{ fmol cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$, Pentan mit $5.19 \text{ fmol cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$ und 6-Methyl-5-hepten-2-on mit $133 \text{ fmol cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$. In der Atemluft wurden folgende Flüsse berechnet: Isopren $12 \text{ nmol min}^{-1} \text{ Person}^{-1}$; Aceton $59.8 \text{ fmol cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$; Acetaldehyd $7.3 \text{ fmol cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$; Dimethylsulfid $1.7 \text{ fmol cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$. Alle Werte wurden auf der

Grundlage eines alveolaren Gasaustauschs von 3.3 L min^{-1} im Schlaf berechnet.^[77]

Die aufeinander bezogenen Konzentrationen der erwarteten VOCs aus verschiedenen Quellen reichen von Größenordnungen im ppmv-Bereich bis hinab zu ppbv und pptv.^[1a,7] In einer aktuellen theoretischen Bestimmung der VOC-Konzentrationen in verschiedenen Körperkompartimenten wurde errechnet, dass die VOC-Konzentration in Blut und Fettgewebe bis zu 10^{-10} M (bei einer Bestimmung von 1 ppb in der Atemluft) reichen kann.^[1a] Bei dem Bemühen, reale Proben zu analysieren, benötigt man also entweder selektive und empfindliche Systeme (wie GC-TOF-MS) für die spezifische Identifizierung oder kreuzreaktive Sensorsysteme, die das gesamte Muster der VOCs bestimmen (siehe Abschnitt 5).

In Lungenkrebsstudien stimmten VOCs, die mit Zelllinien in vitro bestimmt worden waren, nur zum Teil mit solchen überein, die aus Atemluft von Patienten gewonnen wurden,^[27b,78] sprich, einige VOCs fanden sich nur in der Atemluft, einige nur in Zellen und einige in beiden (Abbildung 7).^[2] In einer anderen Untersuchung wurden das Haut- und Atemluft-Volatolom von Freiwilligen mithilfe einer Korrelationsmatrix verglichen. Abbildung 7b zeigt diese Matrix der VOC-Häufigkeiten innerhalb verschiedener Proben (1/–1: Maximum der positiven/negativen Korrelation; Null: keine Korrelation).^[4] Aus der Matrix folgt, dass die beiden VOC-Quellen – Haut und Atemluft – nur leicht korreliert sind, während die Antwort innerhalb jeder Quelle hoch korreliert ist. Das Ergebnis lässt erwarten, dass kombinierte Volatolom-Daten von Atemluft und Haut ein breiteres VOC-Profil und damit eine deutlich höhere Empfindlichkeit und Spezifität für die Beschreibung des Gesundheitszustandes im Vergleich zu Messungen aus nur einer Körperflüssigkeit aufweisen.^[4] Es sind aber umfangreichere experimentelle Studien erforderlich, um die Verlässlichkeit solcher Beobachtungen zu demonstrieren.^[4]

4.2. Schritte zur Realisierung von „Point-of-Care“-Schnelltests mithilfe von Hybrid-Volatolomik

Ein wichtiger Aspekt für das Konzept der Hybrid-Volatolomik ist die Implementierung von Kreuzvalidierungsmodellen, um zu zeigen, dass die VOC-Profile aller Körperflüssigkeiten als komplementär zueinander angesehen werden können (und nicht als „Duplikate“). Wenn VOCs Duplikate wären, müsste man sich fragen, wie man die Verhältnisse zwischen den VOCs aus unterschiedlichen Quellen interpretieren könnte. In jedem Fall muss für die erfolgreiche Implementierung eines Hybrid-Volatolomik-Ansatzes auf folgende Anforderungen geachtet werden:

1. Verlässliche Identifizierung der relevanten VOCs im humanen Volatolom. Bislang wurden die meisten VOCs durch GC-MS identifiziert, wobei das Fragmentierungsspektrum gegen eine übliche Massenspektren-Bibliothek abgeglichen wird. Eine solche Identifizierung kann allerdings nur als vorläufig angesehen werden und muss bestätigt werden. Falsche Zuordnungen können durch Koelution von Verbindungen (d. h. Verzerrung der Spektren),

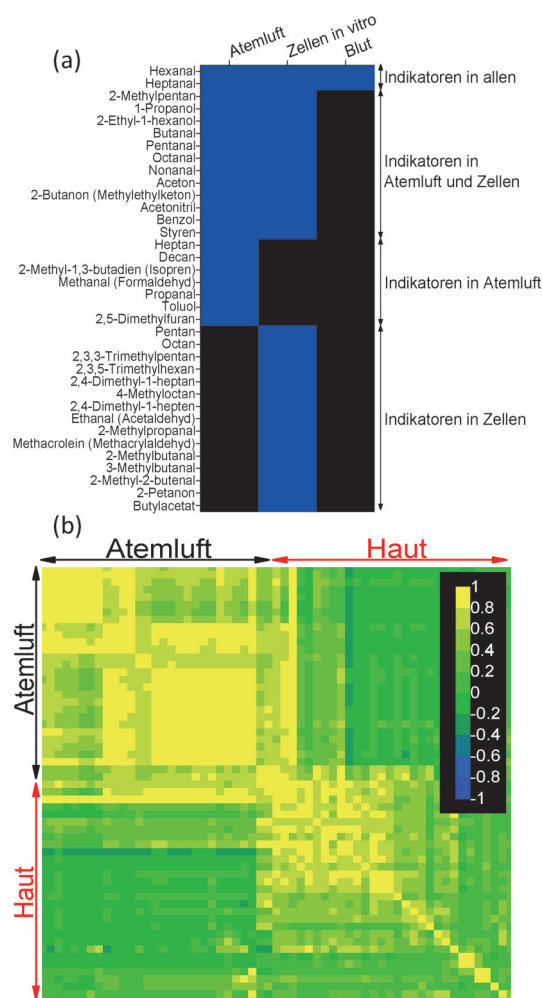


Abbildung 7. Durch die Kombination von Daten aus verschiedenen Quellen lässt sich manchmal ein Volatolom erhalten, das ein weiteres Spektrum abdeckt. a) Flüchtige organische Verbindungen bei Lungenkrebs, die aussagekräftig und für die Erkrankung relevant sind (blau). b) Multivariate Korrelation, in der die farbige Karte die Korrelation in einer Matrix von Proben freiwilliger Probanden repräsentiert, die auf den Unterschieden im Vorkommen verschiedener VOCs beruht, die mit GC/MS analysiert worden waren (Wiedergabe mit freundlicher Genehmigung nach Lit. [4]).

durch Fehlen geeigneter Referenzspektren oder Ähnlichkeiten zwischen Massenspektren (z. B. von Isomeren) verursacht werden. Daher ist es besonders wichtig, eine vorläufige Identifizierung mit alternativen Verfahren (z. B. einem Vergleich der Retentionszeiten oder des Retentionsindex) zu bestätigen.^[27b,36a,78c] Mit Techniken wie der Protonentransfer-Flugzeit-Massenspektroskopie (PTR-ToF-MS) erhält man durch die hohe Auflösung des ToF-Massenfilters eine exakte Massenbestimmung und so eine Unterscheidung zwischen isobaren Verbindungen.^[79] Außerdem können in manchen Fällen weitere Vorläuferionen (z. B. NO^+) für die Trennung funktionaler Isomere hilfreich sein.^[79] In diesem Zusammenhang wird die Angabe der CAS-Registernummer für publizierte VOCs empfohlen, um die Validierung zu unterstützen.

2. Bestimmung des molaren Flusses (Emissionsrate) als Möglichkeit, die gemessenen VOC-Konzentrationen zu

interpretieren. Besonders in klinischen Schnelltests („point-of-care testing“, PoC) hat dies einen direkten Einfluss auf Verfahren und Zeitdauer der Probenahme. Für Hautausdünstungen umfasst der Bereich der medianen Emissionsraten mehrere Größenordnungen (von 0.55 bis $4790 \text{ fmol cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$).^[51a]

3. Standardisierte Verfahren für die Probenahme aus verschiedenen Quellen, um die Vergleichbarkeit zwischen unterschiedlichen Körperflüssigkeiten zu verbessern. Gegenwärtig kann die Entnahme von Proben aus dem Gasraum über verschiedenen Quellen (z. B. Blut, Zellen, Urin, Stuhl) nach ähnlichen Verfahren erfolgen. Andererseits könnten für Atemluft und Hautproben andere Methoden erforderlich sein, was weitere experimentelle Herausforderungen mit sich bringt.

Führt man ähnliche Daten aus verschiedenen Forschungsgruppen zusammen, kann vielleicht ein umfassender Datensatz erhalten werden, der Vergleiche ermöglicht und für chemische, biologische, physiologische und klinische Untersuchungen verwendet werden kann.

5. Schlussfolgerungen und Ausblick

Die Volatolomik hat das Potenzial, eine Schlüsseltechnologie zu werden, wenn wichtige biologische, chemische und medizinische Informationen gesammelt und klinische Lösungen gefunden werden sollen. Beinahe 2000 verschiedene Bestandteile des menschlichen Volatoloms sind bereits in zahlreichen individuellen Untersuchungen nachgewiesen worden, wobei jeweils VOCs aus spezifischen Kompartimenten – Haut, Atemluft, Blut, Urin, Faeces oder Zelllinien – untersucht wurden. Während es in manchen Fällen ausreicht oder sogar zu bevorzugen ist, sich auf VOCs einer einzelnen Körperflüssigkeit zu stützen,^[3b, 8, 78, 80] könnte ein kombinierter Volatolom-Ansatz den diagnostischen Wert für bestimmte Indikationen erheblich vergrößern (z. B. chemische Daten aus Atemluft, Urin und Blut bei Diabetikern).^[81] Verbindet man außerdem in einer Hybrid-Volatolomik das Spektrum von leicht und schwerer flüchtigen VOCs aus allen Körperflüssigkeiten, erhält man ein breites phänotypisches Bild vom körperlichen Zustand des Probanden. Dieser „Hybrid-Volatolomik“-Ansatz unterscheidet sich grundlegend von vielen herkömmlichen Verfahren zu Diagnose und Verlaufskontrolle, besonders im Fall maligner Erkrankungen. Er entdeckt die Krankheit anhand der Blutchemie und der Stoffwechselaktivität und nicht auf der Basis von Bildgebung oder pathogenetischen morphologischen Veränderungen. Die Durchführung ist vergleichsweise einfach, und die Ergebnisse können automatisch interpretiert werden. Nur positiv getestete Patienten müssen sich einer konventionellen, unangenehmen und teuren Bildgebungsdiagnostik (Biopsie, CT, MRI) unterziehen, um die Diagnose abzusichern, bevor eine Entscheidung fällt und eine Behandlung eingeleitet wird. Als Vorteil der Diagnose und Behandlung im Frühstadium wird erwartet, dass die Heilungschancen signifikant höher und die Kosten für das Gesundheitswesen niedriger sind. Das Verfahren sollte auch helfen, die Heterogenität der Erkrankun-

gen zu überwinden, denn es orientiert sich am systemischen Kreislauf, der wahrscheinlich die gesamte Krankheitslast repräsentiert, und nicht an einer örtlich untersuchten Stelle.

Einige Hürden stehen der Anwendung der Volatolomik noch entgegen, insbesondere unterschiedliche Einflussfaktoren wie Ernährung, Rauchen und Medikation. Für weitere klinische Anwendungen wäre es daher wichtig, verschiedene Kontrollgruppen als „naive“ Proben (also vor Einsetzen der medikamentösen Behandlung) und Blindproben einzubeziehen. Wenn dann einmal die geeigneten wissenschaftlichen und technischen Lösungen gefunden sind, wäre das Potenzial für solche nichtinvasiven Tests sehr groß.

Mit Blick auf aktuelle und künftige Technologien für die Diagnosen mit Volatolomik muss noch viel umfassende Arbeit getan werden. Während in gut ausgerüsteten klinischen und professionellen Labors hochkomplizierte Analysemethoden eingesetzt werden, ist das Ziel, eine schnelle und kostengünstige personalisierte Medizin zu erreichen, die global eingeführt werden kann, auch in Entwicklungsländern. Die neuen High-end-Analysesysteme sind für eine führende Forschung bei der Suche nach relevanten spezifischen Biomarkern notwendig. Sie sind aber teuer und für eine PoC-Analytik nicht geeignet, hier ist ein anderer Ansatz gefragt. Ein solcher Ansatz wären Sensoranordnungen, die in akademischen Untersuchungen und in technologieorientierten Spin-offs intensiv weiterentwickelt wurden. Verschiedene nanotechnologische Sensorsysteme wurden entwickelt, beispielsweise Systeme auf Metallnanopartikel-Basis, piezoelektrische oder kolorimetrische Systeme und andere.^[82] Sie werden den Weg zu echten PoC-Systemen weisen. Während hochempfindliche Sensoren eine gesteigerte Leistungsfähigkeit garantieren, wird die Empfindlichkeit bei Arrays mit kreuzreaktiven Sensoren wohl etwas niedriger liegen, doch würde dies die enormen Anforderungen an das Sensor-Design mildern. Ergebnis könnte ein Vielzweck-Gerät mit niedriger bis mittlerer Empfindlichkeit für den relevanten VOCs sein. Ein Sensorfeld, das diese Erkennungsmechanismen kombiniert, würde auch deren Integration ermöglichen, die ein spezifisches Signal für komplexe, aber unterscheidbare VOCs liefern würde, ohne dass die Mischung in die einzelnen Komponenten aufgetrennt werden müsste. Dieser Ansatz ist von Nachteil, wenn die genaue VOC-Zusammensetzung einer komplexen Mischung benötigt wird; er ist andererseits vorteilhaft, wenn die einzige benötigte Information der Anteil bestimmter VOCs ist, und sie wird daher in vielen Fällen die Methode der Wahl sein. Bedenkt man den Trend zur Miniaturisierung, so wird ein volatolomisches Testsystem vielleicht irgendwann in einer kleinen Einheit enthalten sein, die nicht größer ist als ein Smartphone.

H.H. und Y.Y.B. wurden aus dem 7. EU-Forschungsrahmenprogramm des Europäischen Forschungsrats (ERC) unter dem Akronym DIAG-CANCER (Projekt Nr. 256639) gefördert. Außerdem erhielten sie den Grand Challenges Explorations Award der Bill & Melinda Gates Foundation (Phase I: Zuwendungsnummer OPP1058560 und Phase II: Zuwendungs-

nummer OPP1109493). A.A. und V.R. erhielten eine Förderung aus dem Oncotryol-Projekt 2.1.1. P.M. wurde vom Österreichischen Wissenschaftsfonds (FWF) unter der Nummer P24736-B23 gefördert. V.R. erhielt ein Lise-Meitner-Stipendium des Österreichischen Wissenschaftsfonds (FWF) unter der Nummer M1213-B18.

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 11036–11048
Angew. Chem. **2015**, *127*, 11188–11201

- [1] a) H. Haick, Y. Y. Broza, P. Mochalski, V. Ruzsanyi, A. Amann, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 1423–1449; b) D. P. Johns, J. A. Walters, E. H. Walters, *J. Thorac. Dis.* **2014**, *6*, 1557–1569; c) L. Caplan, *Front Public Health* **2014**, *2*, 87; d) P. Kennedy, *J. Neurosci. Nurs.* **2013**, *45*, S3–S13; e) G. C. Carter, A. M. Barrett, J. A. Kaye, A. M. Liepa, K. B. Winfree, W. J. John, *Cancer Manage. Res.* **2014**, *6*, 437–449.
- [2] M. Hakim, Y. Y. Broza, O. Barash, N. Peled, M. Phillips, A. Amann, H. Haick, *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 5949–5966.
- [3] a) A. W. Boots, J. J. van Berkel, J. W. Dallinga, A. Smolinska, E. F. Wouters, F. J. van Schooten, *J. Breath Res.* **2012**, *6*, 027108; b) A. Amann, M. Ligor, T. Ligor, A. Bajtarevic, C. Ager, M. Pienz, H. Denz, M. Fiegl, W. Hilbe, W. Weiss, P. Lukas, H. Jamnig, M. Hackl, A. Haidenberger, A. Sponring, W. Filipiak, W. Miekisch, J. Schubert, J. Troppmair, B. Buszewski, *Memo* **2010**, *3*, 106–112; c) S. A. Centerwall, W. R. Centerwall, *Pediatrics* **2000**, *105*, 89–103; d) M. Shirasu, K. Touhara, *J. Biochem.* **2011**, *150*, 257–266.
- [4] Y. Y. Broza, L. Zuri, H. Haick, *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 4611.
- [5] B. Buszewski, M. Kesy, T. Ligor, A. Amann, *Biomed. Chromatogr.* **2007**, *21*, 553–566.
- [6] a) A. Amann, M. Corradi, P. Mazzone, A. Mutti, *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2011**, *11*, 207–217; b) O. Barash, N. Peled, F. R. Hirsch, H. Haick, *Small* **2009**, *5*, 2618–2624; c) P. J. Mazzone, *J. Breath Res.* **2012**, *6*, 027106; d) Y. Wang, Y. Hu, D. Wang, K. Yu, L. Wang, Y. Zou, C. Zhao, X. Zhang, P. Wang, K. Ying, *Cancer Biomarkers* **2012**, *11*, 129–137.
- [7] T. H. Risby in *Breath Analysis for Clinical Diagnosis and Therapeutic Monitoring* (Hsg.: A. Amann, D. Smith), World Scientific, Singapore, **2005**, S. 251–265.
- [8] M. Phillips, N. Altorki, J. H. Austin, R. B. Cameron, R. N. Cattanéo, R. Kloss, R. A. Maxfield, M. I. Munawar, H. I. Pass, A. Rashid, W. N. Rom, P. Schmitt, J. Wai, *Clin. Chim. Acta* **2008**, *393*, 76–84.
- [9] W. Miekisch, J. K. Schubert, G. F. E. Noeldge-Schomburg, *Clin. Chim. Acta* **2004**, *347*, 25–39.
- [10] a) G. I. Murray, *J. Pathol.* **2000**, *192*, 419–426; b) M. Watanabe, *Toxicol. Lett.* **1998**, *102–103*, 167–171.
- [11] S. Chen, *Front. Biosci.* **1998**, *3*, d922–933.
- [12] a) S. Erhart, A. Amann, E. Haberlandt, G. Edlinger, A. Schmid, W. Filipiak, K. Schwarz, P. Mochalski, K. Rostasy, D. Karall, S. Scholl-Burgi, *J. Breath Res.* **2009**, *3*, 016004; b) S. Ghimici, F. Di Francesco, M. Onor, M. A. Stiegel, M. G. Trivella, C. Comite, N. Catania, R. Fuoco, J. D. Pleil, *J. Breath Res.* **2013**, *7*, 036001; c) R. M. Thorn, J. Greenman, *J. Breath Res.* **2012**, *6*, 024001; d) R. Schubert, H. Schwoebel, A. Mau-Moeller, M. Behrens, P. Fuchs, M. Sklorz, J. K. Schubert, S. Bruhn, W. Miekisch, *Metabolomics* **2012**, *8*, 1069–1080.
- [13] a) A. Amann, L. C. Bde, W. Miekisch, J. Schubert, B. Buszewski, J. Pleil, N. Ratcliffe, T. Risby, *J. Breath Res.* **2014**, *8*, 034001; b) O. Beck, N. Stephanson, S. Sandqvist, J. Franck, *J. Breath Res.* **2013**, *7*, 026006; c) V. Ruzsanyi, *J. Breath Res.* **2013**, *7*, 046008; d) L. C. Chen, Y. Hashimoto, H. Furuya, K. Takekawa, T. Kubota, K. Hiraoka, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2009**, *23*, 333–339; e) G. A. Mills, V. Walker, *J. Chromatogr. B* **2001**, *753*, 259–268; f) N. Raikos, K. Christopoulou, G. Theodoridis, H. Tsoukali, D. Psaroulis, *J. Chromatogr. B* **2003**, *789*, 59–63.
- [14] A. D. Vaz, M. J. Coon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 1172–1176.
- [15] P. J. Branton, K. G. McAdam, D. B. Winter, C. Liu, M. G. Duke, C. J. Proctor, *Chem. Cent. J.* **2011**, *5*, 15.
- [16] a) M. Ahotupa, V. Bussacchini-Griot, J. C. Bereziat, A. M. Camus, H. Bartsch, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1987**, *146*, 1047–1054; b) J. O. Kang, G. Slater, A. H. J. Aufses, G. Cohen, *Biochem. Pharmacol.* **1988**, *37*, 2967–2971.
- [17] L. Laffel, *Diabetes/Metab. Res. Rev.* **1999**, *15*, 412–426.
- [18] R. Murray, D. Granner, P. Mayes, V. Rodwell, *Harper's Illustrated Biochemistry 27/e*, Lange Medical Books/McGraw Hill, New York, **2006**.
- [19] B. Halliwell, J. M. Gutteridge, C. E. Cross, *J. Lab. Clin. Med.* **1992**, *119*, 598–620.
- [20] T. H. Risby, L. Jiang, S. Stoll, D. Ingram, E. Spangler, J. Heim, R. Cutler, G. S. Roth, J. M. Rifkind, *J. Appl. Physiol.* **1999**, *86*, 617–622.
- [21] E. S. Deneris, R. A. Stein, J. F. Mead, *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 1382–1385.
- [22] a) H. Koc, J. King, G. Teschl, K. Unterkofler, S. Teschl, P. Mochalski, H. Hinterhuber, A. Amann, *J. Breath Res.* **2011**, *5*, 037102; b) J. King, P. Mochalski, K. Unterkofler, G. Teschl, M. Klieber, M. Stein, A. Amann, M. Baumann, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2012**, *423*, 526–530.
- [23] a) M. P. Davies, O. Barash, R. Jeries, N. Peled, M. Ilouze, R. Hyde, M. W. Marcus, J. K. Field, H. Haick, *Br. J. Cancer* **2014**, *111*, 1213–1221; b) N. Peled, O. Barash, U. Tisch, R. Ionescu, Y. Y. Broza, M. Ilouze, J. Mattei, P. A. Bunn, Jr., F. R. Hirsch, H. Haick, *Nanomedicine* **2013**, *9*, 758–766.
- [24] V. Ruzsanyi, W. Lederer, C. Seger, B. Calenic, K. R. Liedl, A. Amann, *J. Breath Res.* **2014**, *8*, 046005.
- [25] A. A. Aksenov, A. Gojova, W. Zhao, J. T. Morgan, S. Sankaran, C. E. Sandrock, C. E. Davis, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 1053–1059.
- [26] N. O. Verhulst, H. Beijleveld, Y. T. Qiu, C. Maliepaard, W. Verduyn, G. W. Haasnoot, F. H. Claas, R. Mumm, H. J. Bouwmeester, W. Takken, J. J. van Loon, R. C. Smallegange, *Infect. Genet. Evol.* **2013**, *18*, 87–93.
- [27] a) X. Chen, F. Xu, Y. Wang, Y. Pan, D. Lu, P. Wang, K. Ying, E. Chen, W. Zhang, *Cancer* **2007**, *110*, 835–844; b) W. Filipiak, A. Sponring, A. Filipiak, C. Ager, J. Schubert, W. Miekisch, A. Amann, J. Troppmair, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2010**, *19*, 182–195; c) A. Sponring, W. Filipiak, T. Mikoviny, C. Ager, J. Schubert, W. Miekisch, A. Amann, J. Troppmair, *Anticancer Res.* **2009**, *29*, 419–426; d) W. Filipiak, A. Sponring, T. Mikoviny, C. Ager, J. Schubert, W. Miekisch, A. Amann, J. Troppmair, *Cancer Cell Int.* **2008**, *8*, 17; e) A. Sponring, W. Filipiak, C. Ager, J. Schubert, W. Miekisch, A. Amann, J. Troppmair, *Cancer Biomarkers* **2010**, *7*, 153–161; f) D. Smith, T. S. Wang, J. Sule-Suso, P. Spanel, A. El Haj, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2003**, *17*, 845–850; g) J. Sulé-Suso, A. Pysanenko, P. Spanel, D. Smith, *Analyst* **2009**, *134*, 2419–2425.
- [28] D. T. Ross, U. Scherf, M. B. Eisen, C. M. Perou, C. Rees, P. Spellman, V. Iyer, S. S. Jeffrey, M. Van de Rijn, M. Waltham, A. Pergamenschikov, J. C. Lee, D. Lashkari, D. Shalon, T. G. Myers, J. N. Weinstein, D. Botstein, P. O. Brown, *Nat. Genet.* **2000**, *24*, 227–235.
- [29] M. Sato, M. B. Vaughan, L. Girard, M. Peyton, W. Lee, D. S. Shames, R. D. Ramirez, N. Sunaga, A. F. Gazdar, J. W. Shay, J. D. Minna, *Cancer Res.* **2006**, *66*, 2116–2128.
- [30] R. D. Ramirez, S. Sheridan, L. Girard, M. Sato, Y. Kim, J. Pollack, M. Peyton, Y. Zou, J. M. Kurie, J. M. Dimaio, S. Milchgrub, A. L. Smith, R. F. Souza, L. Gilbey, X. Zhang, K. Gandia, M. B. Vaughan, W. E. Wright, A. F. Gazdar, J. W. Shay, J. D. Minna, *Cancer Res.* **2004**, *64*, 9027–9034.

- [31] P. P. Massion, D. P. Carbone, *Respir. Res.* **2003**, *4*, 12.
- [32] O. Barash, N. Peled, U. Tisch, P. A. Bunn, Jr., F. R. Hirsch, H. Haick, *Nanomedicine* **2012**, *8*, 580–589.
- [33] a) B. D. L. Costello, A. Amann, H. Al-Kateb, C. Flynn, W. Filipiak, T. Khalid, D. Osborne, N. M. Ratcliffe, *J. Breath Res.* **2014**, *8*, 014001; b) A. Amann, W. Miekisch, J. Schubert, B. Buszewski, T. Ligor, T. Jezierski, J. Pleil, T. Risby, *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2014**, *7*, 455–482.
- [34] M. Grammel, H. C. Hang, *Nat. Chem. Biol.* **2013**, *9*, 475–484.
- [35] a) J. A. Tayek, *J. Am. Coll. Nutr.* **1992**, *11*, 445–456; b) M. Jang, S. S. Kim, J. Lee, *Exp. Mol. Med.* **2013**, *45*, e45; c) M. K. Nakhleh, R. Jeries, A. Gharra, A. Binder, Y. Y. Broza, M. Pascoe, K. Dheda, H. Haick, *Eur. Respir. J.* **2014**, *43*, 1522–1525; d) J. Zhu, J. Jimenez-Diaz, H. D. Bean, N. A. Daphtary, M. I. Aliyeva, L. K. Lundblad, J. E. Hill, *J. Breath Res.* **2013**, *7*, 037106.
- [36] a) W. Filipiak, A. Filipiak, A. Sponring, T. Schmid, B. Zelger, C. Ager, E. Klodzinska, H. Denz, A. Pizzini, P. Lucciarini, H. Jamnig, J. Troppmair, A. Amann, *J. Breath Res.* **2014**, *8*, 027111; b) P. Mochalski, R. Al-Zoairy, A. Niederwanger, K. Unterkofler, A. Amann, *J. Breath Res.* **2014**, *8*, 046003; c) Y. Zhang, G. Gao, H. Liu, H. Fu, J. Fan, K. Wang, Y. Chen, B. Li, C. Zhang, X. Zhi, L. He, D. Cui, *Theranostics* **2014**, *4*, 154–162.
- [37] G. Preti, J. N. Labows, J. G. Kostelc, S. Aldinger, R. Daniele, *J. Chromatogr.* **1988**, *432*, 1–11.
- [38] a) P. Mochalski, J. King, A. Kupferthaler, K. Unterkofler, H. Hinterhuber, A. Amann, *J. Breath Res.* **2011**, *5*, 046010; b) P. Mochalski, J. King, A. Kupferthaler, K. Unterkofler, H. Hinterhuber, A. Amann, *Int. J. Toxicol.* **2012**, *31*, 267–275.
- [39] A. Amann, P. Mochalski, V. Ruzsanyi, Y. Y. Broza, H. Haick, *J. Breath Res.* **2014**, *8*, 016003.
- [40] a) J. C. Anderson, A. L. Babb, M. P. Hlastala, *Ann. Biomed. Eng.* **2003**, *31*, 1402–1422; b) W. Miekisch, P. Fuchs, S. Kamysek, C. Neumann, J. K. Schubert, *Clin. Chim. Acta* **2008**, *395*, 32–37; c) M. E. O'Hara, T. H. Clutton-Brock, S. Green, C. A. Mayhew, *J. Breath Res.* **2009**, *3*, 027005; d) A. Tangerman, E. G. Winkel, *J. Breath Res.* **2010**, *4*, 017003; e) S. C. Basak, D. Mills, H. A. El-Masri, M. M. Mumtaz, D. M. Hawkins, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2004**, *16*, 45–55; f) P. Martinez-Lozano, L. Zingaro, A. Finiguerra, S. Cristoni, *J. Breath Res.* **2011**, *5*, 016002; g) C. J. Meulenbergh, H. P. Vijverberg, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2000**, *165*, 206–216; h) S. Paterson, D. Mackay, *Br. J. Ind. Med.* **1989**, *46*, 321–328; i) T. Peyret, P. Poulin, K. Krishnan, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2010**, *249*, 197–207.
- [41] a) J. King, H. Koc, K. Unterkofler, P. Mochalski, A. Kupferthaler, G. Teschl, S. Teschl, H. Hinterhuber, A. Amann, *J. Theor. Biol.* **2010**, *267*, 626–637; b) J. King, K. Unterkofler, G. Teschl, S. Teschl, H. Koc, H. Hinterhuber, A. Amann, *J. Math. Biol.* **2011**, *63*, 959–999.
- [42] P. L. Kalliomäki, O. Korhonen, V. Vaaranen, K. Kalliomäki, M. Koponen, *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **1978**, *42*, 83–90.
- [43] M. Jakubowski, S. Czerczak, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2009**, *28*, 311–315.
- [44] A. C. Guyton, J. E. Hall, *Textbook of Medical Physiology*, 11. Aufl., Elsevier, Philadelphia, **2006**.
- [45] B. Schatowitz, G. Gercken, *J. Chromatogr.* **1988**, *425*, 257–268.
- [46] L. Dormont, J. M. Bessiere, A. Cohuet, *J. Chem. Ecol.* **2013**, *39*, 569–578.
- [47] M. Gallagher, C. J. Wysocki, J. J. Leyden, A. I. Spielman, X. Sun, G. Preti, *Br. J. Dermatol.* **2008**, *159*, 780–791.
- [48] A. M. Curran, P. A. Prada, K. G. Furton, *J. Forensic Sci.* **2010**, *55*, 50–57.
- [49] H. Murota, S. Matsui, E. Ono, A. Kijima, J. Kikuta, M. Ishii, I. Katayama, *J. Dermatol. Sci.* **2015**, *77*, 3–10.
- [50] a) T. Abaffy, M. G. Moller, D. D. Riemer, C. Milikowski, R. A. DeFazio, *Metabolomics* **2013**, *9*, 998–1008; b) L. F. Campbell, L. Farmer, S. M. George, P. B. Farrant, *BMJ Case Rep.* **2013**, *2013*; c) A. D'Amico, R. Bono, G. Pennazza, M. Santonico, G. Mantini, M. Bernabei, M. Zarlenga, C. Roscioni, E. Martinelli, R. Paollesse, C. Di Natale, *Skin Res. Technol.* **2008**, *14*, 226–236; d) J. Kwak, M. Gallagher, M. H. Ozdener, C. J. Wysocki, B. R. Goldsmith, A. Isamah, A. Faranda, S. S. Fakharzadeh, M. Herlyn, A. T. Johnson, G. Preti, *J. Chromatogr. B* **2013**, *931*, 90–96; e) D. Pickel, G. P. Manucy, D. B. Walker, S. B. Hall, J. C. Walker, *Appl. Anim. Behav. Sci.* **2004**, *89*, 107–116.
- [51] a) P. Mochalski, J. King, K. Unterkofler, H. Hinterhuber, A. Amann, *J. Chromatogr. B* **2014**, *959*, 62–70; b) P. Mochalski, K. Unterkofler, H. Hinterhuber, A. Amann, *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 3915–3923.
- [52] N. De Giovanni, N. Fucci, *Curr. Med. Chem.* **2013**, *20*, 545–561.
- [53] a) H. Barzantny, J. Schroder, J. Strotmeier, E. Fredrich, I. Brune, A. Tauch, *J. Biotechnol.* **2012**, *159*, 235–248; b) J. Marshall, K. T. Holland, E. M. Gribbon, *J. Appl. Bacteriol.* **1988**, *65*, 61–68; c) A. Natsch, S. Derr, F. Flachsmann, J. Schmid, *Chem. Biodiversity* **2006**, *3*, 1–20.
- [54] a) X. N. Zeng, J. J. Leyden, A. I. Spielman, G. Preti, *J. Chem. Ecol.* **1996**, *22*, 237–257; b) A. M. Curran, S. I. Rabin, P. A. Prada, K. G. Furton, *J. Chem. Ecol.* **2005**, *31*, 1607–1619; c) D. J. Penn, E. Oberzaucher, K. Grammer, G. Fischer, H. A. Soini, D. Wiesler, M. V. Novotny, S. J. Dixon, Y. Xu, R. G. Brereton, *J. R. Soc. Interface* **2007**, *4*, 331–340.
- [55] E. Ruge, *Sitzungsber. Akad. Wiss.* **1862**, *42*, 739–762.
- [56] D. H. Calloway, *Gastroenterology* **1966**, *51*, 383–389.
- [57] C. S. Probert, I. Ahmed, T. Khalid, E. Johnson, S. Smith, N. Ratcliffe, *J. Gastrointest. Liver Dis.* **2009**, *18*, 337–343.
- [58] J. H. Cummings, *Gut* **1981**, *22*, 763–779.
- [59] M. T. Yokoyama, J. R. Carlson, *Am. J. Clin. Nutr.* **1979**, *32*, 173–178.
- [60] A. Gostner, M. Blaut, V. Schaffer, G. Kozianowski, S. Theis, M. Klingeborg, Y. Dombrowski, D. Martin, S. Ehrhardt, D. Taras, A. Schwirtz, B. Kleessen, H. Luhrs, J. Schaubert, D. Dorbath, T. Menzel, W. Scheppach, *Br. J. Nutr.* **2006**, *95*, 40–50.
- [61] N. Homann, *Addict. Biol.* **2001**, *6*, 309–323.
- [62] W. J. Lee, K. Hase, *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 416–424.
- [63] C. Huttenhower, D. Gevers, R. Knight, S. Abubucker, J. H. Badger, A. T. Chinwalla, H. H. Creasy, A. M. Earl, M. G. Fitzgerald, R. S. Fulton, M. G. Giglio, K. Hallsworth-Pepin, E. A. Lobos, R. Madupu, V. Magrini, J. C. Martin, M. Mitreva, D. M. Muzny, E. J. Sodergren, J. Versalovic, A. M. Wollam, K. C. Worley, J. R. Wortman, S. K. Young, Q. D. Zeng, K. M. Aagaard, O. O. Abolude, E. Allen-Vercoe, E. J. Alm, L. Alvarado, G. L. Andersen, S. Anderson, E. Appelbaum, H. M. Arachchi, G. Armitage, C. A. Arze, T. Ayvaz, C. C. Baker, L. Begg, T. Belachew, V. Bhonagiri, M. Bihan, M. J. Blaser, T. Bloom, V. Bonazzi, J. P. Brooks, G. A. Buck, C. J. Buhay, D. A. Busam, J. L. Campbell, S. R. Canon, B. L. Cantarel, P. S. G. Chain, I. M. A. Chen, L. Chen, S. Chhibba, K. Chu, D. M. Ciulla, J. C. Clemente, S. W. Clifton, S. Conlan, J. Crabtree, M. A. Cutting, N. J. Davidovics, C. C. Davis, T. Z. DeSantis, C. Deal, K. D. Delehaunty, F. E. Dewhirst, E. Deych, Y. Ding, D. J. Dooling, S. P. Dugan, W. M. Dunne, A. S. Durkin, R. C. Edgar, R. L. Erlich, C. N. Farmer, R. M. Farrell, K. Faust, M. Feldgarden, V. M. Felix, S. Fisher, A. A. Fodor, L. J. Forney, L. Foster, V. Di Francesco, J. Friedman, D. C. Friedrich, C. C. Fronick, L. L. Fulton, H. Y. Gao, N. Garcia, G. Giannoukos, C. Giblin, M. Y. Giovanni, J. M. Goldberg, J. Goll, A. Gonzalez, A. Griggs, et al., *Nature* **2012**, *486*, 207–214.
- [64] J. K. Nicholson, E. Holmes, J. Kinross, R. Burcelin, G. Gibson, W. Jia, S. Pettersson, *Science* **2012**, *336*, 1262–1267.
- [65] S. F. Solga, *World J. Gastroenterol.* **2014**, *20*, 9017–9025.
- [66] a) S. Chiappin, G. Antonelli, R. Gatti, E. F. De Palo, *Clin. Chim. Acta* **2007**, *383*, 30–40; b) E. Kaufman, I. B. Lamster, *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **2002**, *13*, 197–212; c) D. A. Kidwell, J. C. Holland, S. Athanaselis, *J. Chromatogr. B* **1998**, *713*, 111–135; d) T.

- Pfaffe, J. Cooper-White, P. Beyerlein, K. Kostner, C. Punyadeera, *Clin. Chem.* **2011**, 57, 675–687.
- [67] R. M. Nagler, O. Hershkovich, S. Lischinsky, E. Diamond, A. Z. Reznick, *J. Invest. Med.* **2002**, 50, 214–225.
- [68] a) S. Alagendran, G. Archunan, S. V. Prabhu, B. E. Orozco, R. G. Guzman, *Indian J. Dent. Res.* **2010**, 21, 165–168; b) E. Kaufman, I. B. Lamster, *J. Clin. Periodontol.* **2000**, 27, 453–465; c) J. G. Kostelc, P. R. Zelson, G. Preti, J. Tonzetich, *Clin. Chem.* **1981**, 27, 842–845; d) M. Kusano, E. Mendez, K. G. Furton, *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, 400, 1817–1826; e) D. P. Lima, D. G. Diniz, S. A. Moimaz, D. H. Sumida, A. C. Okamoto, *Int. J. Infect. Dis.* **2010**, 14, e184–e188; f) H. J. Martin, S. Riazanskaia, C. L. P. Thomas, *Analyst* **2012**, 137, 3627–3634; g) H. A. Soini, I. Klouckova, D. Wiesler, E. Oberzaucher, K. Grammer, S. J. Dixon, Y. Xu, R. G. Brereton, D. J. Penn, M. V. Novotny, *J. Chem. Ecol.* **2010**, 36, 1035–1042.
- [69] P. R. Ortiz de Montellano, *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, Springer US, New York, **2005**.
- [70] F. P. Guengerich, T. Shimada, *Chem. Res. Toxicol.* **1991**, 4, 391–407.
- [71] X. Ding, L. S. Kaminsky, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2003**, 43, 149–173.
- [72] S. A. J. Vaziri, N. C. Hughes, H. Sampson, G. Darlington, M. A. S. Jewett, D. M. Grant, *Pharmacogenetics* **2001**, 11, 7–20.
- [73] a) P. Mochalski, J. King, M. Haas, K. Unterkofer, A. Amann, G. Mayer, *BMC Nephrol.* **2014**, 15, 43; b) P. Mochalski, J. King, M. Klieber, K. Unterkofer, H. Hinterhuber, M. Baumann, A. Amann, *Analyst* **2013**, 138, 2134–2145.
- [74] O. Marom, F. Nakhoul, U. Tisch, A. Shiban, Z. Abassi, H. Haick, *Nanomedicine* **2012**, 7, 639–650.
- [75] G. Valacchi, C. De Luca, P. W. Wertz, *Mediators Inflammation* **2010**, 398926.
- [76] R. A. Stein, J. F. Mead, *Chem. Phys. Lipids* **1988**, 46, 117–120.
- [77] J. R. Stradling, G. A. Chadwick, A. J. Frew, *Thorax* **1985**, 40, 364–370.
- [78] a) Y. Y. Broza, R. Kremer, U. Tisch, A. Gevorkyan, A. Shiban, L. A. Best, H. Haick, *Nanomedicine* **2013**, 9, 15–21; b) G. Peng, M. Hakim, Y. Y. Broza, S. Billan, R. Abdah-Bortnyak, A. Kuten, U. Tisch, H. Haick, *Br. J. Cancer* **2010**, 103, 542–551; c) A. Bajtarevic, C. Ager, M. Pienz, M. Klieber, K. Schwarz, M. Ligor, T. Ligor, W. Filipiak, H. Denz, M. Fiegl, W. Hilbe, W. Weiss, P. Lukas, H. Jamnig, M. Hackl, A. Haidenberger, B. Buszewski, W. Miekisch, J. Schubert, A. Amann, *BMC Cancer* **2009**, 9, 348.
- [79] P. Mochalski, K. Unterkofer, P. Spanel, D. Smith, A. Amann, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2014**, 28, 1683–1690.
- [80] a) G. Peng, U. Tisch, O. Adams, M. Hakim, N. Shehada, Y. Y. Broza, S. Billan, R. Abdah-Bortnyak, A. Kuten, H. Haick, *Nat. Nanotechnol.* **2009**, 4, 669–673; b) N. Peled, M. Hakim, P. A. Bunn, Jr., Y. E. Miller, T. C. Kennedy, J. Mattei, J. D. Mitchell, F. R. Hirsch, H. Haick, *J. Thorac. Oncol.* **2012**, 7, 1528–1533.
- [81] a) H. M. Liebich, *J. Chromatogr.* **1983**, 273, 67–75; b) B. J. Novak, D. R. Blake, S. Meinardi, F. S. Rowland, A. Pontello, D. M. Cooper, P. R. Galassetti, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, 104, 15613–15618; c) M. Schivo, A. A. Aksenov, L. C. Yeates, A. Pasamontes, C. E. Davis, *Front Endocrinol.* **2013**, 4, 163.
- [82] a) Y. Y. Broza, H. Haick, *Nanomedicine* **2013**, 8, 785–806; b) N. Queralto, A. N. Berliner, B. Goldsmith, R. Martino, P. Rhodes, S. H. Lim, *J. Breath Res.* **2014**, 8, 027112; c) M. Castro, B. Kumar, J. F. Feller, Z. Haddi, A. Amari, B. Bouchikhi, *Sens. Actuators B* **2011**, 159, 213–219; d) S. K. Jha, K. Hayashi, R. D. S. Yadava, *Measurement* **2014**, 55, 186–195; e) P. J. Mazzone, X. F. Wang, Y. Xu, T. Mekhail, M. C. Beukemann, J. Na, J. W. Kemling, K. S. Suslick, M. Sasidhar, *J. Thorac. Oncol.* **2012**, 7, 137–142; f) C. M. Robroeks, J. J. van Berkel, J. W. Dallinga, Q. Jobsis, L. J. Zimmermann, H. J. Hendriks, M. F. Wouters, C. P. van der Grinten, K. D. van de Kant, F. J. van Schooten, E. Dompeling, *Pediatr. Res.* **2010**, 68, 75–80.

Eingegangen am 7. Januar 2015

Online veröffentlicht am 31. Juli 2015

Übersetzt von Dr. Burkard Neuß, Jülich