

Aus der Klinik für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Pilotstudie zur Evaluierung und Implementierung eines Atemtests zur
Früherkennung von Plattenepithelkarzinomen in der Mundhöhle

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dorothee Pfitzner

aus Wunsiedel

Datum der Promotion: 13.12.2019

Inhaltsverzeichnis

Abstrakt (Deutsche Version)	4
Abstract (English version)	6
Einleitung	8
<i>Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich</i>	8
Definition, Ätiologie, Inzidenz	9
Symptomatik, Diagnostik, Nachweis.....	11
Klassifikation	13
Therapie.....	14
Prognose und Nachsorge.....	15
<i>Atemgasanalyse</i>	16
Definition, Relevanz als Diagnostikum in der Medizin.....	16
Flüchtige organische Substanzen (VOCs).....	18
Messmethoden Analyseverfahren	19
Patienten, Material und Methoden	21
<i>Patienten und Probanden</i>	21
Patienten.....	21
Probanden	22
<i>Studiendesign</i>	23
Durchführung der Studie	24
Versuchsaufbau	24
Vorbereitende Maßnahmen	25
Ablauf der Probeentnahme.....	28
Labortechnischer Ablauf, Thermodesorption, GC/MS.....	30
Analyseparameter	31
<i>Verbrauchsmaterialien und Geräte</i>	32
<i>Auswertung der Ergebnisse</i>	33
<i>Statistische Analyse</i>	33
Ergebnisse	34
Diskussion	41
<i>Bewertung der Ergebnisse</i>	41
<i>Limitationen</i>	43
<i>Einordnung in bestehende Literatur</i>	44
<i>Schlussfolgerung</i>	48
Literaturverzeichnis	50
Eidesstattliche Versicherung	55
Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.
Komplette Publikationsliste	57
Danksagung	58

Abkürzungsverzeichnis

PECA	Plattenepithelkarzinom
CVK	Campus Virchow Klinikum
CC3	Universitätsklinik der Zahn-Mund- und Kieferheilkunde Berlin
VOC	volatile organische Verbindungen
WHO	World Health Organisation
HPV	Humane Papillomaviren
UICC	Union internationale contre le cancer
ORN	Osteoradionekrose
BRONJ	Bisphosphonat assoziierte Osteonekrose des Kiefers
COPD	chronical obstructive disease, chronisch-obstruktive pulmonale Erkrankung
DRKS	Deutsches Register klinischer Studien
ICMJE	International Comitée of Medical Journal Editors
GC/MS	Gaschromatographie/Massenspektrometer
SIM	Selected Ion Monitoring
mVOC	microbial volatile organic compound; von Mikroorganismen produzierte flüchtige Substanzen
CAS-Nr	Chemical Abstracts Service number; eindeutige Registrierungsnummer für chemischen Stoff

Abstrakt (Deutsche Version)

Einleitung

Pro Jahr werden in Europa ca. 100.000 neu aufgetretene Plattenepithelkarzinome (PECA) im Kopf-Hals-Bereich diagnostiziert. Gleichzeitig versterben jährlich ca. 40.000 Patienten aufgrund eines Malignoms in diesem Bereich. Die Prognose bleibt damit trotz zahlreicher Fortschritte in der Therapie schlecht. Laut aktuellen Untersuchungen vergehen vom ersten Bemerkten der Veränderung bis zur Diagnosestellung im Durchschnitt sechs Monate. Dies hat zur Folge, dass sich 50% der Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose in einem intermediären oder fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung befinden. Die frühe Diagnose des PECA im Kopf-Hals-Bereich ist aber von elementarer Bedeutung für die Prognose unserer Patienten. Während frühe Stadien sowohl mit alleinigen operativen als auch strahlentherapeutischen Ansätzen in bis zu 90% geheilt werden können, sinkt die Fünf-Jahres-Überlebensrate für die intermediären und fortgeschrittenen Stadien auf 40% bzw. sogar unter 10%.

Die dargelegten Punkte verdeutlichen den dringenden Forschungsbedarf zur Verbesserung der Prognose. Ein einfacher, nichtinvasiver Früherkennungstest, der in der Lage ist, sowohl noch nicht erkannte Tumoren im Frühstadium zu erkennen, als auch symptomlose Rezidive zu diagnostizieren, ist bisher nicht etabliert.

Die Entwicklung eines solchen non-invasiven Erkennungstest als Atemtest ist das Ziel dieses Studienvorhabens.

Methodik

Der Nachweis flüchtiger organischer Verbindungen (sog. volatile organic compounds; VOCs) erfolgt über die Analyse der Ausatemluft des Patienten. In der hier vorgestellten Pilotstudie wurden *ex vivo* Atemproben von zehn Patienten mit PECA vor und nach chirurgischer Therapie mittels Gaschromatographie und gekoppelter Massenspektrometrie analysiert und zusätzlich mit denen gesunder Raucher korreliert.

Ergebnisse

Aus insgesamt 125 detektierten VOCs konnte ein Muster von acht spezifischen Verbindungen extrahiert werden, das bei allen Patienten mit PECA nachweisbar war. Die Konzentrationen von drei dieser Verbindungen fielen nach chirurgischer Therapie ab und waren bei fünf Patienten nicht mehr nachweisbar. Die

Konzentrationen der anderen fünf spezifischen Verbindungen des erkannten Musters stiegen postoperativ im Patientenkollektiv an und konnten auch bei gesunden Probanden nachgewiesen werden.

Schlussfolgerung

Für die Früherkennung von Kopf-Hals-Malignomen wäre ein solcher Atemtest sehr hilfreich. Das Sammeln von Atemproben ist außerdem einfach, schmerzlos, non-invasiv und jederzeit wiederholbar. Neben der Früherkennung wäre der Einsatz eines solchen Atemtests auch in der langjährigen Nachsorge von Tumorpatienten ein hilfreiches Diagnostikum, wobei größer angelegte und möglichst multizentrische Studien zur Verifizierung der Ergebnisse ausstehen.

Abstract (English version)

Introduction

About 100,000 newly diagnosed squamous cell carcinomas (PECA) in the head and neck area are diagnosed in Europe every year. At the same time, approximately 40,000 patients die due to a malignancy in this area every year. The prognosis remains poor despite numerous advances in therapy. According to recent studies, from the first notice of a change to the diagnosis, an average of six months passes. As a result, 50% of patients are in an intermediate or advanced stage of the disease at the time of initial diagnosis. However, the early diagnosis of PECA in the head and neck area is of fundamental importance for the prognosis of our patients. While early stages can be cured in up to 90% with both surgical and radiotherapeutic approaches alone, the 5-year survival rate for the intermediate and advanced stages drops to 40% and even below 10%, respectively.

The points outlined illustrate the urgent need for research to improve the prognosis. A simple, noninvasive screening test that is capable of detecting early unrecognized tumors as well as diagnosing asymptomatic recurrences has not been established yet. The development of such a non-invasive breath test is the aim of the presented pilot study.

Methods

Volatile organic compounds (VOCs) are detected by analyzing the exhaled air of the patient. In the pilot study presented here *ex vivo* breath samples of ten patients with PECA before and after surgical therapy were analyzed by gas chromatography and coupled mass spectrometry and additionally correlated with those of healthy smokers.

Results

From a total of 125 detected VOCs, a pattern of eight specific compounds could be extracted, which was detectable in all patients with PECA. The concentrations of three of these compounds dropped after surgical therapy and were no longer detectable in five patients. The concentrations of the other five specific compounds of the identified pattern increased postoperatively in the patient population and could also be detected in healthy volunteers.

Conclusion

For the early detection of head and neck malignancies such a breath test would be very helpful. Collecting breath samples is also simple, painless, non-invasive, and repeatable at any time. In addition to early detection, the use of such a breath test would be a helpful diagnostic tool in the long-term follow-up of tumor patients. Nevertheless, these results have to be verified with more patients in multicenter studies.

Einleitung

Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich

Der malignen Transformation von Zellen liegt ein multikausaler Prozess zugrunde. Neben genetisch-prädisponierenden Faktoren, sind es besonders exogene Kanzerogene (chemische, physikalische und biologische), die für die Karzinogenese des Plattenepithelkarzinoms (PECA) der Mundhöhle Gewicht tragen. So ist das Erkrankungsrisiko bei Individuen mit chronischem Alkohol- oder Tabakkonsum um das sechsfache erhöht (Talamini et al., 2002b).

Die Prognose der Erkrankung hängt maßgeblich vom Zeitpunkt der Diagnose ab. Aufgrund des meist schmerzlosen Wachstums und häufig fehlinterpretierten Befundes, wie zum Beispiel einer Druckstelle oder einer Bissverletzung folgt die Diagnosestellung im Durchschnitt sechs Monate verspätet (Hakim et al., 2011). Trotz enormer zahlreicher neuer Erkenntnisse und Fortschritte im diagnostischen und therapeutischen Bereich, ist es in den letzten Dekaden nicht gelungen, die Fünf-Jahres-Überlebensrate (Männer: 44%, Frauen: 61%) zu optimieren (Mehta et al., 2010). Die retrospektive Datenanalyse von Mehta beurteilt die Patientenkohorte mit oralen und oropharyngealen Plattenepithelkarzinomen im Zeitraum von 1975-2006. Während die Inzidenz der Patienten im fortgeschrittenen Tumorstadium von 23% auf 34% anstieg, sank die der Patienten mit gut differenzierten Tumoren von 33% auf 16%. Die Fünf-Jahres-Überlebensrate bei frühzeitig diagnostizierten Karzinomen liegt bei 80% und sinkt auf unter 20% bei Patienten, bei denen zum Zeitpunkt der Diagnose bereits lymphogene Metastasen nachzuweisen waren. Um die Fünf-Jahres-Überlebensrate durchschnittlich zu verbessern, muss im Bereich der Frühdiagnostik und der Nachsorge effizienter geforscht und entwickelt werden. Die Evidenz für ein profitables Screening-Verfahren zur Früherkennung von PECA im Kopf-Hals-Bereich steht noch aus (Thacker et al., 2016).

Definition, Ätiologie, Inzidenz

Als malignen Tumor bezeichnet man selbstständig schrankenlose Wachstumsprozesse, die eine regulative Beziehung zur Umgebung vermissen lassen. Benigne Tumore lassen sich von der Umgebung eindeutig abgrenzen, wachsen langsam und besitzen keine Tendenz zur Metastasierung. Als Beispiele hier zu nennen sind Fibrome, Lipome, Adenome, Hämangiome oder Lymphangiome.

Charakteristisch für maligne Neoplasien im Kopf-/Hals-Bereich sind invasives, infiltrierendes, destruierendes Wachstum und die Fähigkeit zur hämatogenen und/oder lymphogenen Metastasierung.

Bösartige Neoplasien im Kopf-/Hals-Bereich werden je nach Ursprungsgewebe in Lymphome, Sarkome oder Karzinome differenziert. In 90-95% der Fälle handelt es sich um eine maligne Transformation des Plattenepithels (Hakim et al., 2011, Parkin et al., 2005). Die restlichen fünf bis zehn Prozent implizieren verruköse Karzinome, Adenokarzinome, Mischtumoren mit teils epithelialen und teils mesenchymalen Anteilen, Sarkome, Melanome sowie Rhabdomyome. Am häufigsten betroffen sind Mundboden mit 39%, gefolgt von lateralem Zungenrand mit 35%, Mundschleimhaut und Gaumen, wobei dies in unterschiedlichen Regionen und Ethnien teilweise differiert (Larsen et al., 2009, Scully and Bedi, 2000).

Die Karzinogenese des PECAs im Mund-/Hals-Bereich ist ein Entstehungsprozess, der im Wesentlichen von exogenen Faktoren beeinflusst wird (Cheng et al., 2002). Risikofaktoren stellen vor allem chronischer Tabakkonsum und Alkoholabusus dar. Ein erhöhtes Transformationsrisiko besitzen die als präkanzerös einzustufenden Läsionen wie Erythro- oder Leukoplakie (Buszewski et al., 2009, Reichart et al., 2006). Regelmäßiger Tabak- oder Alkoholabusus erhöht das Erkrankungsrisiko um das 6-fache, eine Kombination beider Gewohnheiten steigert das Risiko der malignen Entartung um das 30-fache (Talamini et al., 2002a). Die in Tabak oder Alkohol enthaltenen kanzerogenen Noxen werden nicht nur systemisch über die Lunge oder Nahrung in den Blutkreislauf aufgenommen, sondern infiltrieren ebenfalls direkt in die Schleimhaut (Bavarva et al., 2014). Im Allgemeinen führen diese Substanzen zu einer Erhöhung freier Radikale im Körper beziehungsweise in bestimmten Geweben. Diese führen folglich zu oxidativem Stress und erhöhen somit das Mutationsrisiko der Zellen (Bavarva et al., 2014). Ebenso ist das Vorkommen

von HPV 16 (humanes Papillomavirus 16) im Serum nachweislich mit einem gesteigerten Risiko an PECA zu erkranken assoziiert (Dahlstrom et al., 2003).

Neben physikalischen Faktoren, wie beispielsweise einer erhöhten UV-, Röntgen- oder radioaktiven Strahlenbelastung oder chemischen Faktoren, wie Umwelt- und Luftverschmutzung, stellen unausgewogene Ernährung (reduzierte Aufnahme von Vitaminen und Antioxidantien), zu wenig physische Aktivität, chronische mechanische Irritationen (häufig bei unzureichend gesichertem Zahnersatz) und mangelnde Mundhygiene weitere mögliche Erkrankungsfaktoren dar (Li et al., 2014). Weltweit geht man von über 300.000 Neuerkrankungen jährlich aus (Gruber et al., 2014a). Somit stellt das Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle und des Rachens die sechshäufigste (Parkin et al., 2005) und in Entwicklungsländern bei Männern sogar die dritthäufigste Tumorerkrankung dar (Liao et al., 2000, Gupta and Johnson, 2014). Die jährliche Inzidenz der Patienten mit malignen Neoplasien im Bereich der Mundhöhle und des Rachens lag in der Bundesrepublik Deutschland 2012 bei zirka 13.000, wobei die Erkrankungsrate bei Männern bei 17,9 und bei Frauen bei 6,0 lag. Männer sind dreimal häufiger und - bei einem durchschnittlichen Erkrankungsalter von 61 Jahren - auch früher betroffen als Frauen (65 Jahre) (RKI, 2015).

Laut Robert-Koch-Institut und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. lag die 5-Jahres-Prävalenz im Jahre 2007 bei zirka 31.500 und mit einem deutlichen Anstieg 2010 mit ca. 49.000 Erkrankten.

Im Vergleich zu Männern (44%) zeigen Frauen eine günstigere 5-Jahres-Überlebensrate mit 61% (RKI, 2015).

Die PECAe der Mundhöhle haben aufgrund der Lokalisation und der engen Relation zu dem im Kopf- und Hals-Bereich stark ausgeprägten lymphatischen Versorgungssystem hohe Tendenz zur lymphogenen Metastasierung. In mehr als sechzig Prozent des Patientenkollektivs lassen sich regionäre Lymphknotenmetastasen diagnostizieren (Amann et al., 2014a).

Die Inzidenz zur Ausbildung von Fernmetastasen liegt zwischen 3 und 7% (Ridge, 2010).

Symptomatik, Diagnostik, Nachweis

Die Tatsache, dass zwei Drittel aller Patienten mit PECA der Mundhöhle zum Zeitpunkt der Diagnosestellung – dieser beträgt im Durchschnitt nach sechs Monaten – im intermediären oder fortgeschrittenen Stadium liegen, ist häufig der komplett fehlenden oder sehr unspezifischen Frühsymptomatik oder der Fehlinterpretation des Befundes geschuldet (Hakim et al., 2011, Guneri and Epstein, 2014).

Eine Verfeinerung der Leitlinien der NICE (The National Institute for Health and Care Excellence) durch Tikka et al. aus dem Jahre 2016 mit einer Patientenkohorte von über 4700 spezifiziert die Überweisungskriterien und deren optimale diagnostische Wirksamkeit. Die Arbeitsgruppe identifizierte neun relevante Symptome, von denen nur vier in der aktuellen Richtlinie der NICE enthalten waren. Dazu gehören: Heiserkeit, Dysphagie, Odynophagie, persistierendes Fremdkörpergefühl, intraorale Schwellung, orales Ulkus, Otagie, intraorale Spontanblutungen und die Kombination von Otagie mit Fremdkörperempfinden (Tikka et al., 2016).

In der deutschen Leitlinie zum Mundhöhlenkarzinom („Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms“, AWMF-Register-Nummer 007-100OL) wird außer den bereits genannten Symptomen weiterhin auf das Vorliegen von unklaren Parästhesien an Zunge, Zähnen oder Lippe, spontane Zahnlockerungen, Foetor ex ore, persistierendes Fremdkörpergefühl, Schleimhautdefekten oder Ulzerationen, ausstrahlender Schmerzen, unspezifischer Schwellungen im Mund-/Halsbereich oder Heiserkeit hingewiesen.

Suspekte Veränderungen im Gewebe der Kopf-Hals-Region präsentieren sich klinisch meist erst im fortgeschrittenen Stadium in Form von exophytischen oder indurierenden Gewebeläsionen. Häufig zeigt sich ein zentrales Ulkus mit derbem Randwall. Unbehandelt führt das fortschreitende Wachstum zu funktionellen Beeinträchtigungen wie Dysphagie, erschwerte Nahrungsaufnahme, Problemen beim Kauen durch Veränderung der Okklusion oder beim Sprechen und – bei Infiltration des Tumors in den Knochen – zu spontanen Frakturen des Kieferknochens.

Als Orientierungshilfe bei suspekten Läsionen in Kopf-/Hals-Bereich evaluierte die Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF) eine praxisorientierte S-Leitlinie der Klasse 3.

Eine S3-Leitlinie beinhaltet eine systematische Evidenzbasis, die aus Expertenbefragungen und Publikationen zusammengestellt und in einer

Konsensuskonferenz begutachtet, evaluiert und letztendlich implementiert wird.

Die Leitlinie der deutschen Krebsgesellschaft e. V. und deutsche Krebshilfe e. V. geben für die Diagnostik des Mundhöhlenkarzinoms die Empfehlung, dass alle Patienten mit einer mehr als zwei Wochen bestehenden unklaren Schleimhautveränderung unverzüglich zur Abklärung zu einem Spezialisten überwiesen werden sollen.

Es ist ebenso erwiesen, dass die Heilungschance bei frühzeitig erkannten Neoplasien mit einer deutlich günstigeren Prognose einhergehen.

Trotz der hohen Inzidenz des PECAs gibt es bis dato keine Evidenz für ein effektives Frühdiagnostikinstrument.

Diese Tatsachen, zum einen die deutlich verspätete Diagnosestellung und zum anderen die Korrelation zwischen Diagnosezeitpunkt und damit verbundener Heilungschance verdeutlichen die Tragweite der Früherkennung maligner Prozesse der Mundhöhle. Die Relevanz einer effizienteren Diagnosemöglichkeit, besonders im frühen und meist auch unspezifischen Stadium von PECA der Mundhöhle ist nicht von der Hand zu weisen und bedarf mehr wissenschaftlicher Aufmerksamkeit.

Die klinische Diagnostik beinhaltet eine ausführliche Anamneseerhebung mit Inspektion, Palpation und Funktionsprüfung des betroffenen Bereichs.

Je nach Indikationsstellung finden Computertomographie (CT), Magnetresonanztomographie (MRT) konventionelle zweidimensionale Röntgendiagnostik (Panoramaschichtaufnahme), digitale Volumetomographie, Röntgenaufnahme des Thorax, Sonographie des Halses und Oberbauch und nuklearmedizinische Untersuchung (Positronen-Emissions-Tomographie, Szintigraphie) Anwendung.

Eine Biopsie der suspekten Läsion zum Aufschluss über die histologische Differenzierung (grading) ist zwingend erforderlich. Um Artefakte des Kontrastmittelverhaltens am Primärtumor zu vermeiden, sollte diese nach bildlicher Darstellung des Tumors erfolgen. Andernfalls können Gewebereinblutungen die Resultate der bildgebenden Diagnostik verfälschen.

Die Evaluation des lokalen Befunds über Tumorart und –ausdehnung, das Vorhandensein von Lokoregionären Metastasen oder Fernmetastasen bestimmt die Auswahl der Therapie.

Klassifikation

Um maligne Neoplasien besser klassifizieren zu können, wurde 1950 von der Union international contre Cancer (UICC) die TNM-Klassifikation eingeführt und international übernommen.

T(=Tumor) beschreibt die maximale Ausdehnung des Primärtumors und gegebenenfalls die Invasion in benachbarte Strukturen (TX, Tis, T0-T4, T4a-T4b) (O'Sullivan and Shah, 2003), N (=Nodes) bezieht sich auf das Fehlen oder Vorhandensein von lokoregionäre Lymphknotenmetastasen (NX, N0, N1, N2a-N2c, N3) und M (Metastasen) auf das Vorhandensein beziehungsweise das Fehlen von Fernmetastasen (MX, M0, M1) (Patel and Shah, 2005).

TNM-KLASSIFIKATION von Kopf-Hals-Tumoren basierend auf der siebten Edition der UICC (Sobin and Wittekind, 2002, Farasat et al., 2011)

PRIMÄRTUMOR:

Tx: Primärtumor ist nicht beurteilbar

T0: kein Anhalt für Primärtumor

Tis: Carcinoma in situ

T1: Tumorgröße ≤ 2 cm

T2: Tumorgröße $> 2 - 4$ cm

T3: Tumorgröße > 4 cm

T4: Tumor infiltriert benachbarte Strukturen (eine oberflächliche Erosion des Knochens berechtigt nicht zur Einstufung in einen T4-Tumor)

T4a: Infiltration durch kortikalen Knochen, in tiefe/äußere Muskulatur der Zunge, in die Kieferhöhle oder Gesichtshaut

T4b: Infiltration des Spatium masticatorum, Proc. pterygoides, Schädelbasis, A. carotis interna (Umschließung), nicht resektabel

LYMPHKNOTEN

Nx: Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden

N0: Keine regionären Lymphknotenmetastasen

N1: Metastase(n) in solitärem ipsilateralen Lymphknoten $1 \leq 3$ cm

N2a: Metastase(n) in solitärem ipsilateralen Lymphknoten $> 3-6$ cm

N2b: Metastasen in multiplen ipsilateralen Lymphknoten ≤ 6 cm

N2c: Metastasen in bilateralen oder kontralateralen Lymphknoten ≤ 6 cm

N3: Metastase(n) > 6 cm

In der Mittellinie gelegene Lymphknoten gelten als ipsilateral; bei in der Mittellinie gelegenen Primärtumoren gilt der Befall von Lymphknoten einer Seite als ipsilateral.

FERNMETASTASEN:

Mx: Das Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden

M0: Keine Fernmetastasen

M1: Nachweisbare Fernmetastasen

Auf Grundlage der TNM-Klassifikation wird die Stadieneinteilung (staging) vorgenommen, die den Stand der Tumorerkrankung genauer erfasst.

Die Graduierung erfolgt durch die histologische Untersuchung nach der Biopsie. Das sogenannte „grading“ gibt die Differenzierung der Tumorzellen an. Die Einteilung reicht von „G1“ mit hoch differenzierten Gewebezellen und hoher Übereinstimmungsrate mit dem ursprünglichen Gewebe bis zu „G4“ mit undifferenziertem beziehungsweise anaplastischen Zellen, die dem Ursprungsgewebe nicht mehr zugeordnet werden können. Die Aggressivität des transformierten Gewebes korreliert mit dem histologischen Differenzierungsgrad, das heisst, der Malignitätsgrad ist umso höher, je stärker die Zellen differenziert sind.

Die evaluierte Kategorie durch „staging“ und „grading“ ist richtungsweisend für Therapie und Prognose (Moncrieff et al., 2009).

Therapie

Die Bewertung der prognostisch günstigsten Therapie wird nach Staging und Grading interdisziplinär unter Beteiligung der Fachdisziplinen Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Strahlentherapie, Onkologie, Pathologie und Radiologie gestellt.

Die Therapie eines Karzinoms des Mund-, Kiefer- und Gesichtsbereich stellt nicht nur eine körperliche Belastung für den Patienten dar. Eine chirurgische Intervention in dieser Region hat meist vielfach sichtbare Folgen und führt nicht selten zu

Einschränkungen wichtiger Körperfunktionen wie Artikulation, Mastikation und Schlucken. Die Behandlung kosmetischer und seelischer Folgen, sowie die postoperative Lebensqualität sind daher in das Behandlungskonzept mit einzubeziehen.

Die chirurgische Intervention ist bestimmt durch die Lokalisation beziehungsweise Ausdehnung des Primärtumors und der gegebenenfalls betroffenen Lymphknoten, sowie die Erreichbarkeit tumorfreier Resektionsgrenzen.

Bei mindestens 40% aller Patienten mit PECA der Mundhöhle lassen sich Metastasen in den regionären Halslymphknoten prädiagnostisch detektieren, bei 15-34% der unauffälligen Befunde der T3/T4-gestagten Patienten sind okkulte Metastasen der Halslymphknoten zu finden (Lea et al., 2010).

Die kurative Therapie stellt die Resektion des Mundhöhlenkarzinoms dar, die adjuvant, je nach Befund, posttherapeutisch mit Radiotherapie und/oder mit Chemotherapie erfolgt. Eine elektive Neck-dissection wird auch bei unauffälligen Lymphknotenstatus (cN0) und unabhängig der T-Kategorie durchgeführt und zählt zum Standard in der Behandlung von PECA der Mundhöhle (D'Cruz et al., 2009).

Bei bereits klinisch auffälligen Lymphknotenbefund (cN+) liegt die Indikation zur modifizierten radikalen oder radikalen Lymphknotenausräumung vor.

Ob bei T1 und T2 eine adjuvante Therapie durchgeführt wird, kann letztendlich erst nach dem histopathologischen Befund des Tumorexzidats und der Lymphknoten entschieden werden. Patienten im fortgeschrittenen Stadium T3 und T4 werden zusätzlich mit Strahlentherapie und/oder Chemotherapie behandelt. Bernier et al. haben gezeigt, dass eine Kombination beider Therapien die Komplikationsrate deutlich reduziert (Bernier et al., 2004).

Prognose und Nachsorge

Der relevanteste prognostische Faktor für die 5-Jahres-Überlebensrate ist die Infiltration der Tumorzellen in die umliegenden Lymphknoten und Ausbildung von Metastasen. Das Vorhandensein von Metastasen reduziert die Überlebensrate signifikant (Montoro et al., 2008). Diese Faktoren sind bestimmt durch den Zeitpunkt der Diagnosestellung. Eine weitere beeinflussende Wirkung hat die Tumorgröße, die wiederum eng mit der Rezidivgefahr korreliert (Woolgar et al., 1999). Die 5-Jahres-

Überlebensrate bei Patienten ohne lymphogener Metastasierung liegt bei ca. 86% und sinkt bei Patienten mit Metastasen der Halslymphknoten auf 44% (Woolgar, 1996). Eine großangelegte Vergleichsstudie von Layland et al (Layland et al., 2005) mit einer Gruppe von 3.887 Patienten bestätigt den engen Zusammenhang zwischen Metastasierung in die regionären Lymphknoten und einer gesteigerten Sterberate. Montoro et al. prognostizieren eine niedrigere Überlebensrate bei den Patienten mit bilateralem Lymphknotenbefall verglichen mit ipsilateraler Metastasierung der Lymphknoten (Montoro et al., 2008).

Die Statistik der Rezidivgefahr liegt bei Karzinomen im Mundhöhlenbereich bei 20% (Wolff et al., 2012), bei 76% dieser Patienten entwickelt sich das Rezidiv in den ersten zwei Jahren. Diese Tatsache verdeutlicht die hohe Relevanz für einen dem Patienten individuell angepassten Nachsorgeplan. Generell finden die Nachsorgetermine in den ersten zwei Jahren in einem Intervall von drei Monaten statt. Die Kontrolle der Lymphknoten erfolgt sonographisch. Weitere bildgebende Verfahren wie CT oder MRT geben Aufschluss über den Lokalbefund und dienen der Detektion von möglichen Zweittumoren und werden in den ersten zwei Jahren nach erfolgter Therapie im Abstand von sechs Monaten durchgeführt. Bei Beschwerdefreiheit ist ab dem dritten Jahr eine Kontrolluntersuchung alle sechs Monate einzuhalten. Ab dem fünften posttherapeutischen Jahr sind die gängigen Früherkennungsuntersuchungen durchzuführen.

Atemgasanalyse

Definition, Relevanz als Diagnostikum in der Medizin

Schon Hippokrates (460–370 v. Chr.) sah die Nase als eines seiner präzisesten diagnostischen Hilfsmittel an. Der Urvater der Ärzte betrachtete bereits vor 2400 Jahren den Geruch von Atem, Schweiß und Urin als wichtigen Indikator für körperliche Leiden. So wurde bereits damals ein süßlich-fruchtiger Azetongeruch (Propylketon) in der Ausatemluft bei Patienten mit Stoffwechselkrankheiten (Barnett et al., 1969), starker Zersetzungsgeruch mit Lungenabszessen oder Ammoniakgeruch des Urins mit Nierenleiden in Verbindung gebracht (Schubert et al., 1998). Es liegt also nahe, dass der Atem als ein elementares Instrument in der Diagnostik von Krankheiten verwendet werden kann. Den Grundstein, der die

Forschung im Bereich der Atemgasanalytik intensiviert setzte der doppelte Nobelpreisträger Linus Pauling. Er veröffentlichte 1971 den Nachweis von mehr als 250 unterschiedlichen flüchtigen organischen Substanzen (engl. volatile organic compounds, VOCs) in der menschlichen Expirationsluft (Pauling et al., 1971).

So zeigt die Atemgasanalytik eine neuartige Methode zur Erkennung pathologischer Prozesse des Organismus auf. Es basiert auf der Detektion bestimmter VOCs in der Expirationsluft, deren Ursprung auf physiologische oder pathologische Metabolismusvorgänge im Organismus zurückzuführen sind (Pleil and Lindstrom, 1997). Das Exhalat des Patienten wird auf kleinste Verbindungen untersucht, wobei die gesuchten flüchtigen organischen Verbindungen im Konzentrationsbereich von parts per million (ppm) bis parts per trillion (ppt) liegen. Der Grundgedanke dieser Idee ist, dass Tumorzellen einen anderen - nicht-physiologischen - Stoffwechsel haben und somit auch andere Metabolite produzieren, die durch Haut, Ausscheidungsprodukte oder Atem aus dem Organismus eliminiert werden.

Der größte Nutzen dieses Diagnostikums ist, dass die Pro

benahme schmerzlos und non-invasiv ist. Der Patient ist keinen Risiken oder Nebenwirkungen sowie Strahlenbelastung durch bildgebende prädiagnostische Verfahren ausgesetzt. Die Probenahme kann bei gesunden kräftigen, als auch bei Kindern oder geschwächten, älteren Patienten beliebig oft, ortsunabhängig und reproduzierbar durchgeführt werden (Phillips et al., 2014). Ferner besteht kein erhöhtes Eingriffsrisiko für den Patienten, wie vergleichsweise bei der Biopsie.

Riely et al. belegte 1974 anhand von Tierversuchen, dass die Konzentration klein-kettiger Hydrogenkarbonate (Bsp. Ethanon, 1-Pentane) mit dem oxidativen Stresslevel korreliert. So hat man die Hypothese aufgestellt, dass bestimmte VOC-Konzentrationen der Ausatemluft als Indikator bei der Lipidperoxidation dienen. Als Resultat detektierte Riely erhöhte Konzentrationen von Ethanen oder 1-Pentanen bei erhöhtem oxidativen Stress (Riely et al., 1974).

Das wissenschaftliche und technische Interesse ist geweckt und die Hypothese, dass viele spezifische Verbindungen in der Expirationsluft mit pathologischen Veränderungen des Organismus assoziiert sind, wird durch zahlreiche neue Erkenntnisse bestätigt (Schmutzhard et al., 2008, Queralto et al., 2014, Phillips et al., 1999a, Phillips et al., 2014, Peng et al., 2010, Hakim et al., 2011, Gruber et al., 2014b, Filipiak et al., 2010, Buszewski et al., 2007, Amann et al., 2014b)

Amann bezeichnete die VOCs als „Exposome“, deren Konzentrationsveränderung

das Spiegelbild metabolischer oder (patho-)physiologischer Prozesse darstellte. Bisweilen sind es weit über 3.000 VOCs, die in der Expirationsluft detektiert wurden (Phillips et al., 1999b) und die wertvolle diagnostische Hinweise über den Gesundheitszustand des Patienten vermitteln konnten. Ein führender Wissenschaftler im Bereich der Atemgasanalytik ist der amerikanische Forscher Michael Phillips. In einer Studie von 2016 untersuchten Phillips et al die Atemgasanalysen von 54 Frauen mit Biopsie-gesicherten Mammakarzinom und verglichen diese mit denen von 204 gesunden Frauen. Die Auswertung der Exhalate erfolgte wie in unserer Studie mittels Gaschromatographie und Massenspektrometrie. Es fanden sich 21 spezifische Biomarker in den Analysen, anhand derer er die Frauen mit Mammakarzinom identifizieren konnte (Phillips et al., 2016). Durch zahlreiche und großangelegte Studien hat Phillips et al durch Identifizierung krankheitsspezifischer Marker in der Expirationsluft von Patienten bereits Methoden bei der Diagnostik von Brust- (Phillips et al., 2003b, Phillips et al., 2014) und Lungenkrebs (Phillips et al., 2003a) entwickelt, die sich in der Anwendung befinden.

Im medizinischen Alltag etablierte Analyseverfahren sind beispielsweise der Atemtest zur Kontrolle des Blutalkohols, Helicobacter pylori-Nachweistest, der H₂-Atemtest bei Galaktose- oder Laktoseintoleranz oder Kohlendioxid-Test zur Kontrolle von COPD-Patienten (Amann et al., 2014a).

Aktuell findet man im Bereich der Atemgasanalyse relevante Studien in der Diagnostik entzündlicher Darmerkrankungen (Hicks et al., 2015), pulmonaler Erkrankungen wie Tuberkulose (Phillips et al., 2012), Lungenkarzinome (Phillips et al., 2015) bei der Diagnosestellung von Schizophrenie (Phillips et al., 1993) oder in der Früherkennung maligner Neoplasien (Schmidt and Podmore, 2015, Amann et al., 2014a, Filipiak et al., 2010, Gruber et al., 2014b, Hakim et al., 2011, Peng et al., 2010, Phillips et al., 2003a, Queralto et al., 2014),

Wesentliches Interesse der Analyse von VOCs außerhalb der Medizin findet sich in Bereichen der Umwelttechnik und der Werkstoffindustrie.

Flüchtige organische Substanzen (VOCs)

99,03% des Gesamtvolumens der atmosphärischen Luft fällt auf Stickstoff (78,08%

Volumenanteil) und Sauerstoff (20,95%). In absteigender Reihe finden sich Gase wie Argon, Kohlendioxid, Neon, Helium, Methan, Krypton, Wasserstoff, Stickstoffmonoxid, Kohlenmonoxid und Xenon mit 0,000009 Volumenprozent.

Der Volumenanteil, der für diese Studie relevanter endogener oder exogener Inhaltsstoffe liegt bei 10-100 ppb (parts per billion), Methan ausgenommen (Phillips et al., 1999b).

Die Bezeichnung flüchtige organische Verbindungen (engl. volatile organic compounds, VOCs) ist nach WHO ein Sammelbegriff für kohlenstoffhaltige Verbindungen (Methan ausgenommen), die im niedrigen Temperaturbereich gasförmig vorliegen. Aufgrund des hohen Dampfdruckes bzw. niedrigen Siedepunktes verdampfen die Verbindungen leicht.

Es gibt keine einheitliche Definition für den Begriff VOC. In der Richtlinie 2004/42/EG der EU-Kommission werden VOCs als jene organischen Verbindungen definiert, die bei normalen Druckverhältnissen einen Siedepunkt (oder Siedebeginn) von höchstens 260°C haben (EU-Kommission, 2008).

Gemäß der WHO werden sie nach ihren Siedepunkten eingeteilt in Very VOC (Siedebereich zwischen 50 und 100°C), VOC (Siedebereich zwischen 100 und 240°C) und Semi VOC (Siedebereich zwischen 240 bis ca. 400 °C).

VOCs gelangen über unterschiedliche Wege in die Expirationsluft und lassen sich in drei Gruppen einordnen. Das sind zum einen die exogenen Substanzen beziehungsweise deren Metabolite, die beispielsweise durch Inspiration, Konsum von Nahrungs- oder Genussmitteln, Kosmetika oder Pharmaka oder über dermale Adsorption aufgenommen werden. Die zweite Gruppe stammt aus Stoffwechsel- oder Zersetzungsprozessen der Mundhöhle. Die dritte und für uns von besonderem Interesse geltende Gruppe sind die endogenen Analyte, die durch Metabolismus oder pathologische Vorgänge gebildet werden. Die Analyse dieser VOCs gibt sowohl Aufschluss über normale physiologische biochemische Prozesse, als auch über pathologische Vorgänge des Organismus.

Messmethoden Analyseverfahren

In den letzten zwanzig Jahren stieg das wissenschaftliche Interesse am Exhalat als diagnostisches Medium. Das erfolgsversprechende Potential dieser non-invasiven

Testmöglichkeit zur Früherkennung oder generell zur Diagnostik maligner Erkrankungen wird durch zahlreiche Publikationen und großangelegte Pilotstudien belegt (Schmutzhard et al., 2008, Hicks et al., 2015, Phillips et al., 2014, Phillips et al., 2003b, Gruber et al., 2014b).

Ein standardisiertes Analyseverfahren zur Atemgasanalyse hat sich noch nicht durchsetzen können.

Schmutzhardt et al nutzten in ihrer Pilotstudie 1l-Teflon Beutel als Sammelbehälter für die Expirationsluft, dessen Inhalt mittels Positronen-Emissions-Reaktion und anschließender Massenspektrometrie ausgewertet wurde. Sie verglichen die Analysedaten von 22 PECA-Patienten mit denen von Gesunden, Hochrisiko-Patienten (regelmäßiger Tabak- und Alkoholkonsum) und posttherapeutischen Probanden mit dem Ergebnis, dass Acetonitrile in signifikant hoher Konzentration bei der PECA-Gruppe und in der Hochrisiko-Gruppe vorkamen. Der Anteil an Isoprenen lag bei der Patientengruppe am höchsten und war in der Kontrollgruppe signifikant niedriger (Schmutzhard et al., 2008).

Gruber et al. stellten in einer Pilotstudie 22 orale PECA-Patienten mit 21 Patienten mit benignen oralen Tumoren mit 19 gesunden Probanden gegenüber. Die Probenentnahme wurde mit einer Atemmaske durchgeführt, die zum einen bei Inspiration exogene Verbindungen der Umgebung, und zum anderen bei Expiration die Totraumluft eliminierte. Als Sammelmedium für das Exhalat verwendete Gruber Mylar-Beutel, die als chemisch inert gelten. Die Atemproben wurden mittels Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie (GC/MS) analysiert. Nach der ersten Auswertung wurden die auffälligen Werte mit der Spektralbibliothek abgeglichen. Es ergaben sich signifikant erhöhte Konzentrationswerte der VOCs bei Ethanol, 2-Propenenitrile (=Acrylonitrile) und Undekan. Zu Ethanol ist zu sagen, dass die Werte nicht zwingend mit Alkoholismus zu tun haben, da nur 13% der Studienteilnehmer regelmäßig Alkohol konsumierten. 2-Propenenitrile zählt zu den Kanzerogenen der Klasse 2B und ist unter anderem in Tabak und Autoabgasluft enthalten. Interessanterweise fanden sich ebenso erhöhte Konzentrationswerte von 2-Propenenitril in einer ähnlich aufgebauten Studie zur Atemgasanalyse von Magen-Karzinom-Patienten (Amal et al., 2016). Undekan ist ein typisches Alkan, dass bei erhöhtem oxidativen Stress als Produkt der Lipidoxidation zu finden ist. Es wurde in signifikant niedrigerer Konzentration bei gesunden Probanden detektiert (Gruber et al., 2014b).

Bouza et al verglichen 52 Atemproben, davon 26 PECA-Patienten und 26 gesunde Probanden. Die Exhalate wurden unter Verwendung von drei-Liter-Tedlarbeuteln gesammelt und mittels Festphasen-Mikroextraktion und anschließender GC/MS analysiert (Bouza et al., 2017).

Ziel dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Detektion und Validierung volatiler organischer Verbindungen (VOCs) aus der Expirationsluft von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle, die mit der Karzinogenese assoziiert sind. Hierfür wurden von Patienten sowohl prä-, als auch postoperative Exhalate analysiert und mit denen gesunder Raucher korreliert.

Patienten, Material und Methoden

Patienten und Probanden

Patienten

Der Pilotstudie liegt ein positives Votum der Ethikkommission der Charité - Universitätsmedizin zugrunde (Antragsnummer: EA4/049/14). Zusätzlich wurde die Pilotstudie an dem Deutschen Register Klinischer Studien (DRKS) registriert: DRKS00009539.

Alle Patienten wurden aus der Abteilung für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie der Charité (CVK) und am Institut für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde (CC3) Universitätsmedizin Berlin akquiriert und unabhängig von dieser Studie leitlinienkonform therapiert.

Die Patientengruppe (n=10) im Alter zwischen 47 und 76 Jahren wurde nach dem Tumorstaging der Studie zugeteilt.

Einschlusskriterien für das Patientenkollektiv war ein histologisch gesichertes primäres PECA der Mundhöhle oder des Oropharynx. Das Karzinom wurde ausschließlich durch chirurgische Intervention behandelt, eine adjuvante Therapie sollte in der Planung nicht vorgesehen sein. Der Karnovsky-Index des Patienten entsprach mindestens 80%. Der/die Studienteilnehmer/in besaßen die Fähigkeit (sprachlich, körperlich und geistig) das Wesen der Studie zu verstehen und erklären

sich bereit an der Studie teilzunehmen. Die operative Therapie musste noch ausstehen.

Patienten mit vorangegangenen malignen Erkrankungen, schweren internistischen Begleiterscheinungen (Myokardinfarkt, Kardiomyopathie, Herzinsuffizienz, NYHA III/IV, schwere COPD, Niereninsuffizienz, nicht eingestellter Diabetes mellitus), HIV-Infektionen, AIDS-Erkrankung, Drogenabhängigkeit oder einem Karnofsky-Index kleiner als 80% wurden aus der Studie ausgeschlossen.

Abbruchkriterien (Dropout) der Studie richteten sich nach dem Patientenzustand und beinhalteten das Auftreten von Ausschlusskriterien während der Therapie oder Unterbrechungen des Studienprotokolls aufgrund akuter ernsthafter Ereignisse, die eine Änderung des Behandlungsplanes forderten.

Aus der Gruppe der oben beschriebenen Patienten ging die Gruppe für die zweite, postoperative Messung hervor.

Die Atemprobe erfolgte frühestens 28 und spätestens 43 Tage nach erfolgreicher operativen Entfernung des Plattenepithelkarzinoms.

Die Patienten waren vor den Atemproben mindestens acht Stunden nüchtern. Mundhygienemaßnahmen und Angewohnheiten wie Tabakkonsum wurden vor der Messung untersagt.

Probanden

Die Kontrollgruppe (n=4) wurde per Aushang über die Studie informiert. Alle Probanden waren aktuell Raucher (< 10 pack years) und konsumierten gelegentlich Alkohol (< 50g/ Woche). Sie waren in der Lage (sprachlich, körperlich und geistig) das Wesen der Studie zu verstehen und erklärten freiwillig die Bereitschaft an der Studie teilzunehmen. Das Probandenalter lag zwischen dem 32. und 48. Lebensjahr und der Karnofsky-Index über 80%.

Ausschlusskriterien waren chronischer Zigaretten- (>10 pack years) und intensiver Alkoholkonsum (>50g/ Woche), vorangegangene maligne Erkrankungen, schwere internistische Begleiterkrankungen (Myokardinfarkt, Kardiomyopathie, Herzinsuffizienz, NYHA III/IV, schwere COPD, Niereninsuffizienz, nicht eingestellter Diabetes mellitus), HIV-Infektion, AIDS-Erkrankung und/oder Drogenabhängigkeit.

Die Probanden waren bei den Atemproben seit mindestens acht Stunden nüchtern. Mundhygienemaßnahmen und Angewohnheiten wie Tabakkonsum wurden vor der Messung untersagt.

Studiendesign

Wir haben in dieser klinisch prospektiven Pilotstudie (proof of principle) die prä- und postoperativen Resultate der alveolären Atemgasanalysen von zehn Patienten mit gesichertem PECA der Mundhöhle mit den Atemgasanalyseergebnissen von vier gesunden Probanden gegenübergestellt. Beide Vergleichsgruppen konsumierten Tabak und gelegentlich Alkohol.

Unabhängig von der Pilotstudie erhielten alle Patienten die leitlinienkonforme Therapie. Die gesicherte Diagnose wurde nach der physischen Untersuchung in Kombination mit CT und / oder MRT und anschließender Biopsie gestellt. Alle Studienteilnehmer wurden über die Einschlusskriterien rekrutiert und die Atemproben unter gleichen, kontrollierten Standards gesammelt. Die Atemproben der Patientengruppe wurden prä- und postoperativ entnommen.

Durchführung der Studie

Die Patienten- und Probandenselektion erfolgte im Zeitraum zwischen November 2014 und September 2015 in der Abteilung für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie der Universitätsklinik Charité Berlin, Campus Virchow-Klinikum (CVK) und der Abteilung für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde Univrsitätsklinik Charité Berlin. Die Patienten wurden über die Studie und die Möglichkeit der Teilnahme aufgeklärt und informiert. Nach 24 Stunden erfolgte die freiwillige Einwilligung, diese wurde schriftlich über die Einverständniserklärung festgehalten. In der Anamnese wurden insbesondere die Ein- und Ausschlusskriterien abgefragt.

Die Durchführung der Probenahme fand bei allen Studienteilnehmern unter gleichen standardisierten Bedingungen und im gleichen Untersuchungsraum statt. Eine Säuberung des Proberaums mit chemischen Detergenzien blieb für mindestens 24 Stunden vor der Atemspende aus. Auch die Studienteilnehmer wurden instruiert Hygienemaßnahmen wie Zähne putzen, Gesichtsreinigung oder Einkremen zu unterlassen.

Die Atemgasprobe erfolgte bei allen Teilnehmern am Morgen im nüchternen Zustand. Die Beprobung der Sammelbehälter nahm zirka zehn Minuten des Probanden in Anspruch und wurde protokollarisch und pseudonymisiert dokumentiert.

Versuchsaufbau

Mit allen teilnehmenden Patienten und Probanden wurde die Atemspendeprozedur vorab geübt. Patienten gaben eine Atemprobe vor chirurgischer Intervention, sowie postoperativ ab. Die zweite Atemspende erfolgte frühestens vier Wochen nach dem ersten Eingriff, um die Konzentration der VOCs, die durch Heilungsprozesse freigesetzt wurden zu minimieren. Die Probanden gaben jeweils nur zu einem Zeitpunkt eine Atemprobe ab. Die Atemtestapparatur (Abbildung 1) wurde bei der Beprobung von den Patienten selbst festgehalten. Mundstück, Bakterien-, Viren- und Sputumfänger, sowie Totraumbeutel sind Einmalartikel und wurden für jeden Patienten separat bereitgestellt. Im mittleren Teil ist ein Druckregler zwischen geschaltet und sollte während der Atemgasprobe den Wert von 20mbar nicht überschreiten. Im Inneren des Sammelrohrs verjüngt sich das Lumen und bestimmt

damit die Fließgeschwindigkeit des Atems. Der Aktivkohlefilter dient der Eliminierung exogener Verbindungen aus der Umgebungsluft während der Inspiration bzw. der Lungenreinigung vor der Atemspende. Am hinteren Lumen des Sammelrohrs ist der Mylarbeutel mittels Lueranschluss befestigt, in dem letztendlich das Exhalat aufgefangen wird.

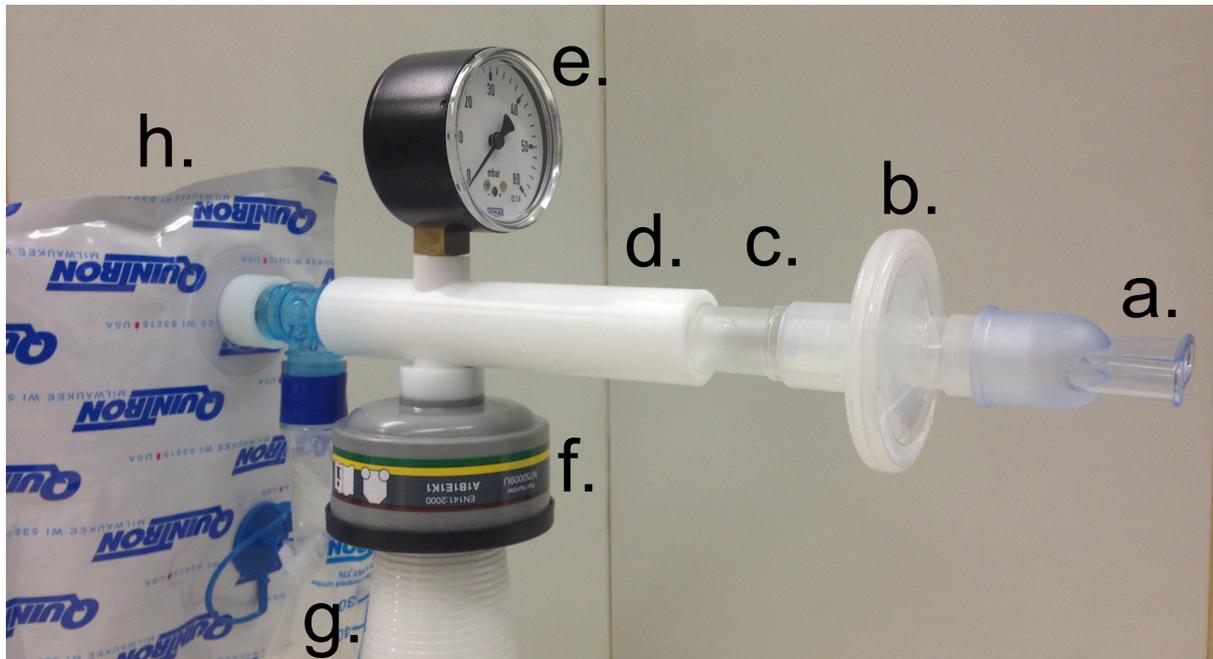


Abbildung 1: Aufbau der Atemtestapparatur. (a) Mundstück, (b) Bakterien-, Viren- und Sputumfilter, (c) Adapter, (d) Sammelrohr mit Flussbegrenzung (e) Druckmesser (f) Aktivkohlefilter (g) Totraumbeutel (h) Mylarbeutel.

Vorbereitende Maßnahmen

Alle verwendeten Mylarbeutel wurden unter Hochdruck und Hitze, sowie mit nachgereinigtem Stickstoff der Qualität 5.0 mit einem Volumenstrom von 100 ml/min gespült. Abbildung 2 zeigt ein Full-Scan-Chromatogramm eines Mylarbeutels dessen Peaks durch die Spektralbibliothek ermittelt wurden und damit als materialspezifische VOCs von den Analyseergebnissen der Studienteilnehmer extrahiert wurden.

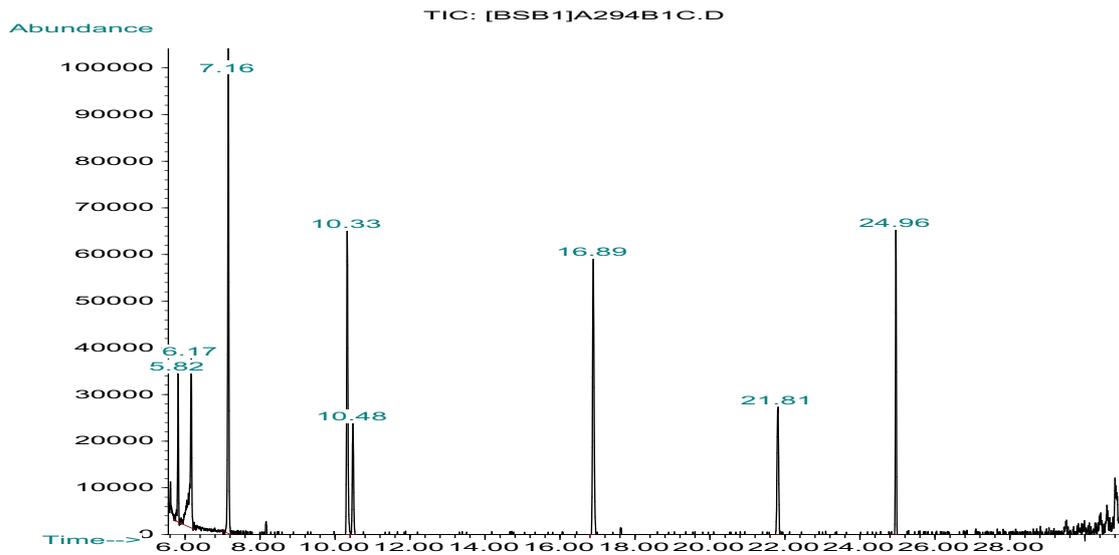


Abbildung 2: Full-scan-Chromatogramm eines gereinigten Mylarbeutels. Die Peaks wurden als materialspezifische flüchtige Verbindungen identifiziert und aus den Gesamtergebnissen extrahiert.

Die Apparatur wurde vor Beprobung für mindestens zwei Stunden mittels einer Saugpumpe (SKC Aircheck Sampler (224-PCX)) gereinigt und bis zur Messung in sterilen Aluminiumbehältern aufbewahrt.

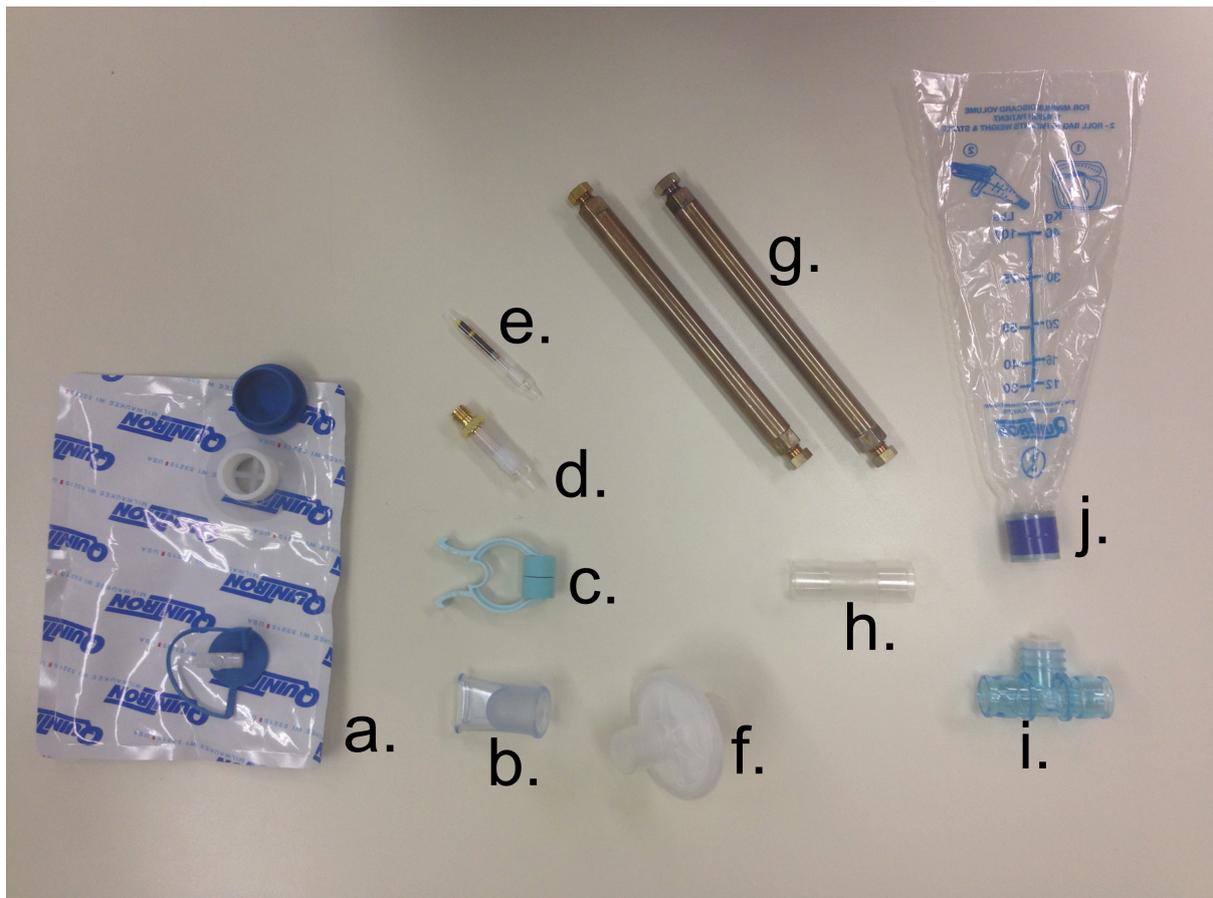


Abbildung 3: *Verwendete Materialien: (a) Mylar-Beutel mit Luer-Anschluss und integriertem Rückstoßventil und Ventilanschluss für das Absaugsystem zur Übertragung auf Tenax-Röhrchen, (b) Mundstück, (c) Nasenklemme, (d) Adapter zwischen Mylar-Beutel auf TENAX-Röhrchen, (e) Kohlefilter für Absaugpumpe, (f) Bakterien-, Viren- und Sputumfilter, (g) TENAX-Röhrchen (h) Adapter zwischen Atemfilter und Analyzer Offline Kit, (i) T-Verbindungsstück, (j) Totraumbeutel.*

Herstellung und Vorbereitung der Thermodesorptionsröhrchen (TDS-Röhrchen)

Die TDS-Röhrchen wurden in einem standardisierten laborspezifischen Verfahren hergestellt und mit Tenax TA 60/80mesh als Adsorbens befüllt. Die Messautomaten des Labors sind auf die jeweiligen TDS-Röhrchen kalibriert. In einem Glasröhrchen wurde zuerst Glaswolle, dann 200mg Tenax (Polyphenylenoxid) und zuletzt ein Drahtnetz gegeben, wobei erst- und letztgenanntes hauptsächlich zur Fixierung des Tenax diene. Das gefüllte Tenax-Röhrchen wurde in einem Messingbehälter aufbewahrt, der zu beiden Seiten gasdicht verschließbar war.

Vor der Probeentnahme wurden die Tenax-Sammelröhrchen sorgfältig konditioniert. Dazu wurden sie 1,5 Stunden lang bei einer Temperatur von 280°C mit nachgereinigtem Stickstoff der Qualität 5.0 mit einem Volumenstrom von 100 ml/min gespült. Die Wirksamkeit der Konditionierung wurde durch einen Tagesblindwert überprüft. Die gereinigten Adsorbationsröhrchen wurden in ausgeheizten verschlossenen Messingbehältern (150°C im Trockenschrank) und in Taschen aus Aktivkohlevlies (schadstoffadsorbierendes Gewebe) gelagert. Nach erfolgter Konditionierung waren die Tenax-Sammelröhrchen bei Lagerung in schadstoffarmer Atmosphäre bis zu 4 Wochen verwendbar.

Ablauf der Probeentnahme

Die Probeentnahme aller Probanden und Patienten erfolgte zu gleichen standardisierten Bedingungen und fand am Morgen statt. Die Teilnehmer waren zum Zeitpunkt der Messung nüchtern. Nahrungs- oder Flüssigkeitsaufnahme, Zigarettenkonsum, hygienische Maßnahmen wie beispielsweise Zähne putzen, sowie körperliche Anstrengung vor der Atemprobe wurden den Teilnehmern untersagt.

Zu Beginn jeder Probeentnahme waren die vorbereitenden Maßnahmen durchgeführt und die Apparatur lag zur Probeentnahme bereit. Anschließend erfolgte die Instruktion des Probanden.

Die Apparatur wurde mit einer Hand festgehalten, der Nasengang durch eine Klemme verschlossen und der Teilnehmer wurde angewiesen mindestens drei Minuten über die Atemgasmaske zu inhalieren und in die Umgebungsluft auszuatmen. Über den integrierten Kohlefilter der Atemgasapparatur, sowie den Bakterien-, Viren und Sputumfänger am Mundstück wurden 99,99% der exogenen VOCs aus der Umgebung subtrahiert. Nach beschriebener „Lungenreinigung“ wurde der Patient aufgefordert, durch die Atemgasmaske auszuatmen (Abbildung 4). Ein zwischengeschalteter Druckregler gab hierbei die Expirationsgeschwindigkeit vor, die zwischen 15 und 20mbar liegen sollte, was einer Fließgeschwindigkeit von ca. 50ml pro Sekunde entsprach. Im Regelfall genügten maximal zwei Ausatemzyklen zur Befüllung des 750ml fassenden Mylarbeutels. Die Totraumatemung wurde durch einen Totraumfilter, der dem Mylarbeutel vorgeschaltet war, extrahiert. Zwischen

Mylarbeutel und Atemmaske befand sich ein Rückschlagventil, sodass die gesammelte Atemluft auch bei erneuter Inspiration nicht entweichen konnte. Es war bei diesem Vorgang darauf zu achten, dass der Proband nicht zu stark gegen den Druck ausatmet. Wenn die verlangsamte Expiration für den Studienteilnehmer zu anstrengend wurde, sollte die restliche Ausatemluft in die Umgebung abgeatmet werden. Um Messfehler auszuschließen, wurde der Expirationsvorgang wiederholt und ein zweiter, gereinigter Beutel befüllt.



Abbildung 4: Ablauf der Probenahme durch Studienteilnehmer.

Der Inhalt der befüllten Mylarbeutel wurde direkt im Anschluss auf das Thermodesorptionssammelröhrchen (TDS-Röhrchen, Tenax-Röhrchen) übertragen. Der Messingcontainer, der das Tenax-Röhrchen beinhaltet, wurde an der einen Seite mit der Gaspumpe (GSA SA 350ex-Pumpe) und auf der anderen Seite mit dem gefüllten Mylarbeutel über sterile Teflonschläuche und Teflonadapter gasdicht verbunden. Durch Aktivierung der Pumpfunktion wird die gesammelte Expirationsluft durch das Adsorptionsröhrchen gesogen und die flüchtigen organischen Spurenstoffe an Tenax gebunden.

Die Sammelbehälter wurden im schadstoffarmen Aktivkohlefließtaschen innerhalb der nächsten 2 Stunden zur weiteren Analyse ins Labor gebracht.

Labortechnischer Ablauf, Thermodesorption, GC/MS

Die labortechnische Untersuchung erfolgte maximal zwei Stunden nach der Probeentnahme. Der Vorteil der gewählten Messtechnik lag in der quantitativen und qualitativen Spurenanalytik von Substanzen mit geringer Nachweisgrenze im Bereich von ppm bis ppt. Diese analytische Methode eignete sich zum effizienten und lösungsmittelfreien Herauslösen leichtflüchtiger Verbindungen mit geringsten Konzentrationen. Gebundene flüchtige organische Verbindungen wurden von den beladenen Tenax-Röhrchen mittels Thermodesorption auf den Kapillar-Gaschromatographen übertragen, von dort in einzelne Stoffkomponenten aufgetrennt und im Massenspektrometer analysiert.

Bei der Thermodesorption wurden die beladenen Röhrchen aus den Messingbehältern mit Hilfe einer speziell gebogenen Pinzette entnommen und in das Rack des Probengebers eingesetzt. Die zu untersuchenden Substanzen wurden von den Tenax-Röhrchen thermisch desorbiert (Temperatur am Ende der Desorption 280°C), das heißt bei kontinuierlicher Temperaturerhöhung - abhängig von der jeweiligen Desorptionstemperatur des Stoffes - wurden die einzelnen Substanzen von Tenax gelöst und von dem des Desorptionsofen durchströmenden Trägergas (Helium) auf das Kaltaufgabesystem(KAS-System) transportiert.

Die desorbierten Stoffe wurden in einer mit flüssigem Stickstoff geeisten Kühlfalle fokussiert (Temperatur der Kühlfalle -80°C), hierbei wurde ein mit Tenax gefüllter Glas-Liner verwendet.

Zu Beginn der gaschromatographischen Trennung wurde die Kühlfalle mit einer Initialtemperatur von -80°C kontinuierlich um 12°C/s bis auf 280°C aufgeheizt. Durch das rasche Aufheizen revaporisierte das Stoffgemisch und wurde mit dem Trägergasstrom (Helium, „mobile Phase“) auf die Trennsäule (stationäre Phase) transferiert.

Die Stoffkomponenten banden und lösten sich an der Kapillarsäule zu substanzspezifisch unterschiedlichen Zeiten und traten letztendlich zeitlich durch ihre Retentionszeit aufgetrennt in den Detektor ein.

Von dort wurden die Analyte in die vakuumisierte Ionisationskammer des Massenspektrometers eingeführt und durch Kollision mit Elektronen ionisiert. Die instabilen Ionen zerfielen in kleinere Relikte. Durch dieses Verfahren ließ sich ein Masse-zu-Ladung-Verhältnis herstellen, wodurch sich die Substanzen bestimmen ließen. Man erhielt jeweils die Massenspektren mit charakteristischen Molpeaks, die sich anhand bereits bekannter Peakmuster identifizieren ließen und Rückschlüsse auf dessen Struktur- und Summenformel zuließen. Nach Methoden von internen Standards und externen Bibliotheken erfolgte die Auswertung der Ergebnisse über Vergleichsgemische.

Analyseparameter

Die Probenaufgabe erfolgte mithilfe eines Kaltaufgabesystems im Split-Modus bei 10 ml/min. Das GC/MS-System arbeitete bei einem konstanten Fluss von 1,7 ml/min, während die Auftrennung in einem Temperaturprogramm erfolgte. Die Datenakquisition ergab sich über ein PC-basiertes Datensystem via HPIB-Schnittstelle und die gaschromatographische Akquisition mit GC/MS im Selected-Ion-Monitoring (SIM) bzw. Full-Scan-Modus. Der SIM-Modus bietet im Vergleich zum Full-Scan-Modus deutlich höhere Empfindlichkeit bei der Detektion leichtflüchtiger Verbindungen. Ionen, die im Massenbereich von 19 bis 400 m/z lagen, wurden im Scan-Modus aufgezeichnet. In der SIM-Methode waren die Ionen für die entsprechenden Substanzen in den verschiedenen Retentionszeitfenstern enthalten. Für die qualitative Auswertung (Bibliotheksvergleich) weiterer Substanzen wurde ein im Full-Scan-Modus aufgenommenes Chromatogramm herangezogen. Dazu wurden im Chromatogramm bis zu 150 Peaks automatisch integriert (ohne manuelle Korrektur des Intergrationsergebnisses). Die Massenspektren wurden anhand eines algorithmisierten Vergleichs (Probability Based Matching, PBM) den in den verwendeten Spektralbibliotheken enthaltenen Referenzspektren mit der höchsten Übereinstimmung zugeordnet. Die Qualität der Übereinstimmung wurde im Ergebnis des Bibliotheksvergleichs in Prozent angegeben. Es wurden ausschließlich eindeutige Ergebnisse verwendet. Überlagerte Peaks (mehrere Substanzen mit

nahezu oder vollständig identischer Retentionszeit konnten daher nicht berücksichtigt werden.

Verbrauchsmaterialien und Geräte

In Tabelle 1 und 2 sind die Verbrauchsmaterialien und Geräte, die für den experimentellen Teil der Studie notwendig waren aufgelistet.

Tabelle 1) Verwendete Materialien während der Probeentnahme.

Geräte / Instrumente	Hersteller
Baumwollhandschuhe	ARA Arbeitsschutz, by iCES MEDIA GmbH, Breitenstraße 34, 84051 Mettenbach, BRD
Bakterien,- Viren- und Sputumfilter	GVS eG, In den Seewiesen 26 / Gebäude 18 89520 Heidenheim, BRD
Mundstück	GVS eG, In den Seewiesen 26 / Gebäude 18 89520 Heidenheim, BRD
Nasenklemme	GVS eG, In den Seewiesen 26 / Gebäude 18 89520 Heidenheim, BRD
Analyzer Offline Collection Kit	ECO MEDICS AG, CH-8635 Duernten, Schweiz
GSA SA 350ex-Pumpe	DEHA Haan & Wittmer GmbH, Keltenstrasse 8, 71296 Heimsheim, BRD
SKC Aircheck Sampler Model 224-PCX	SKC Inc., 863 Valley View Road 84, PA 15330 U.S.A.
Mylar-Beutel (1L)	QuinTron Instrument Company, Inc., 3712 West Pierce Street, Milwaukee, WI, USA
Teflonschlauch	GC-Chromatographie Service GmbH, Am Parir 27, 52379 Langerwehe, BRD
TENAX®	ALAB GmbH, Wilsnacker Straße 15, 10559 Berlin, BRD

Tabelle 2) verwendete Materialien zur VOC-Analyse

Thermodesorptionseinheit	GERSTEL GmbH & Co.KG, Eberhard-Gerstel-Platz 1, 45473 Mühlheim, BRD
Agilent GC 6890N (GC)	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
Agilent MSD 5973 Network (MS)	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
Gerstel Maestro E.02.02.1431 (Datensystem)	GERSTEL GmbH & Co.KG, Eberhard-Gerstel-Platz 1, 45473 Mühlheim, BRD
VOC_EEMA.L, W8N05ST.L (Spektralbibliothek)	ALAB GmbH, Wilsnacker Straße 15, 10559 Berlin, BRD

Auswertung der Ergebnisse

Statistische Analyse

Ziel unserer Pilotstudie war die Evaluierung des Potentials Atemgasanalysen als diagnostisches Instrument von PECA der Mundhöhle verwenden zu können. Die Absicht war, die Detektion und Beurteilung von Konzentrationsunterschieden bestimmter flüchtiger Verbindungen prä- und postoperativ genommener Atemproben mit gesunden Atemproben zu vergleichen.

Aufgrund des Pilotcharakters der Studie war die Patientenzahl limitiert auf zehn.

Die ermittelten VOC-Muster wurden mittels Jack-Knife/ Leave-One-Out-Kreuzvalidierung und n-fach Kreuzvalidierung verifiziert.

Bei der Jack-Knife/ Leave-One-Out-Methode wurde jeweils eine Probe aus der Testgruppe exkludiert, während die Vorhersage des ausgelassenen Probanden mittels n-1-Datensatz ermittelt wurde. Diesen Vorgang haben wir mit jeder Probe der Studienteilnehmergruppe durchlaufen.

Bei der n-fachen Kreuzvalidierung wurden „n“-Prozent aus dem Datensatz der Studiengruppe herausgenommen. Der Datensatz wurde zur Validierung der Vorhersagbarkeit verwendet und kontrolliert. 20-, 30- und 40-fache Kreuzvalidierungstest wurden durchgeführt.

Konzentrationszunahmen sowie –abnahmen bei prä- und postoperativen Probeentnahme wurden bei jedem Patienten markiert, gezählt und miteinander, sowie mit den Ergebnissen der gesunden Probandengruppe verglichen.

Ergebnisse

Zunächst sei erwähnt, dass die Probeentnahme der Expirationsluft mit keinerlei negativen Nebenwirkungen für die Studienteilnehmer verbunden war. Die Testung erfolgte in der Zeit zwischen November 2014 und September 2015. Ein Studienteilnehmer aus der Patientengruppe musste aufgrund eines akuten Myokardinfarkts und anschließender intensivmedizinischer Betreuung aus der Studie ausgeschlossen werden.

Die Ergebnisse unserer Pilotstudie zur VOC-Detektion wurden im Dezember 2017 in der Fachzeitschrift *Otolaryngology- Head and Neck Surgery* publiziert und als Poster auf der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie 2018 in Dresden präsentiert.

Tabelle 3 zeigt die 125 detektierten Verbindungen einschließlich ihrer CAS-Nummer, die aus den Atemgasanalysen der Patienten und Probanden stammen. Unter den leicht flüchtigen Verbindungen fanden sich Alkane, Alkene, aromatische und chlorierte Kohlenwasserstoffe, Terpene, Siloxane, monovalente Alkohole und deren Ester, Ketone, cyclische Ether, Glycole, höhere Aldehyde, Fettsäureester, Heterocyclen und Phenole, ebenso VOCs mikrobiellen Ursprungs. Verbindungen, die aus Blindproben der Umgebungsluft oder Mylarbeuteln stammen, wurden aus der Analyse eliminiert.

Table 3: In Atemproben detektierte 125 VOCs der Studienteilnehmer sortiert nach Stoffklassen.

VOCs	CAS-ID	Alkene	
Alkane		1-Hepten	592-76-7
2,4-Dimethylheptan	2213-23-2	1-Octen	111-66-0
2-Phenylethanol	60-12-8	1-Dodecen	112-41-4
Methylisobutylketon (MIBK)	108-10-1	4-Vinylcyclohexen	100-40-3
Tyrosol	501-94-0	Aromaten	
Tryptophol	526-55-6	Benzol	71-43-2
n-Hexan	110-54-3	Toluol	108-88-3
n-Heptan	142-82-5	Ethylbenzol	100-41-4
n-Octan	111-65-9	m-/p-Xylol	1330-20-7
n-Nonan	111-84-2	o-Xylol	95-47-6
n-Decan	124-18-5	Styrol	100-42-5
n-Undecan	1120-21-4	1,3,5-Trimethylbenzol	108-67-8
n-Dodecan	112-40-3	1,2,4-Trimethylbenzol	95-63-6
n-Tridecan	629-50-5	1,2,3-Trimethylbenzol	526-73-8
n-Tetradecan	629-59-4	i-Propylbenzol	98-82-8
n-Pentadecan	629-62-9	n-Propylbenzol	103-65-1
n-Hexadecan	544-76-3	3-/4-Ethyltoluol	620-14-4/ 622-96-8
2-Methylpentan	107-83-5	2-Ethyltoluol	611-14-3
3-Methylpentan	96-14-0	α -Methylstyrol	98-83-9
Methylcyclopentan	96-37-7	1-Methyl-4-	99-87-6
Cyclohexan	110-82-7	Isopropylbenzol	
2-Methylhexan	591-76-4	Indan	496-11-7
3-Methylhexan	589-34-4	1-Ethyl-3,5-	934-74-7
Methylcyclohexan	108-87-2	dimethylbenzol	
1,4-Dimethylcyclohexan	589-90-2	1,2,3,4-	119-64-2
2,3-Dimethylheptan	3074-71-3	Tetrahydronaphthalin	
2,2,4,6,6-	13475-82-6	Naphthalin	91-20-3
Pentamethylheptan		2-Methylnaphthalin	91-57-6
2,2,4,4,6,8,8-	4390-04-9	1-Methylnaphthalin	90-12-0
Heptamethylnonan		1,4-Diethylbenzol	105-05-5

Chlornaphtaline	
1-Chlornaphthalin	90-13-1

Chlorierte Kohlenwasserstoffe	
Trichlormethan	67-66-3
Trichlorethen	79-01-6
Tetrachlorethen	127-18-4
Chlorbenzol	108-90-7
1,4-Dichlorbenzol	106-46-7

Terpene	
α -Pinen	80-56-8
β -Pinen	127-91-3
Δ -3-Caren	13466-78-9
α -Terpinen	99-86-5
Limonen	138-86-3
Eucalyptol	470-82-6
β -Linalool	78-70-6
Longifolen	475-20-7

Siloxane	
Hexamethylcyclotrisiloxan (D3)	541-05-9
Octamethylcyclotetrasiloxan (D4)	556-67-2
Decamethylcyclopentasiloxan (D5)	541-02-6

Einwertige Alkohole	
Isobutanol	78-83-1
1-Butanol	71-36-3
2-Ethyl-1-hexanol	104-76-7
Benzylalkohol	100-51-6

Ester einwertiger Alkohole	
Methylacetat	79-20-9
Ethylacetat	141-78-6
Isopropylacetat	108-21-4
Methacrylsäuremethylester	80-62-6
Isobutylacetat	110-19-0
n-Butylacetat	123-86-4

Ketone	
Methylethylketon (2-Butanon, MEK)	78-93-3
Cyclohexanon	108-94-1
Acetophenon	98-86-2
Benzophenon	119-61-9
Ethylisobutylketon	623-56-3

Zyklische Ether	
2-Methylfuran	534-22-5
Tetrahydrofuran	109-99-9

Glykole, Glykolether, Glykolester	
1,2-Propylenglykolmonomethylether (PGMM)	107-98-2
Ethylenglykolmonobutylether (EGMB)	111-76-2
1,2-Propylenglykolmonobutylether (PGMB)	5131-66-8
Propylenglykolmonomethyletheracetat (PGMMA)	108-65-6
Ethylenglykolmonobutyletheracetat (EGMBA)	112-07-2

Höhere Aldehyd	
n-Butanal	123-72-8
3-Methyl-1-butanal	590-86-3
n-Hexanal	66-25-1
n-Octanal	124-13-0
n-Nonanal	124-19-6
Benzaldehyd	100-52-7
Furfural	98-01-1

Fettsäureester, Dicarbonsäureester	
Tetradecansäureisopropylester	110-27-0

Heterocyclen	
1,4-Dioxan	123-91-1

Weichmacher	
Diisobutylphthalat (DIBP)	84-69-5

Phenole	
2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol (BHT)	128-37-0

mVOCs	
Dimethylsulfid	75-18-3
3-Methylfuran	930-27-8
2-Methyl-2-butanol	75-85-4
3-Methyl-2-butanon	563-80-4
2-Pentanon	107-87-9
2-Pentanol	6032-29-7
2,5-Dimethylfuran	625-85-5
3-Methyl-1-butanol	123-51-3
Pyrazin	290-37-9
2-Methyl-1-butanol	137-32-6
Dimethyldisulfid	624-92-0
1-Pentanol	71-41-0
2-Hexanon	591-78-6
Dimethylsulfoxid	67-68-5
1-Hexanol	111-27-3
2-Heptanon	110-43-0
2-Octanon	111-13-7
1-Octanol	111-87-5
2-Isopropyl-3-methoxy-pyrazin	25773-40-4
4-Hydroxyanisol	150-76-5

Sonstige ungesättigte Verbindungen	
Acrylnitril	107-13-1

Sonstige Verbindungen	
2-Butanonoxim	96-29-7

Patienten und Probanden

Die Atemgasanalysen wurden bei allen Studienteilnehmern zu gleichen Bedingungen (Ort, Tageszeit, labortechnische Untersuchung) in standardisierter Form durchgeführt.

Tabelle 4 zeigt die relevanten anamnestischen und klinischen Eigenschaften der Patienten (n=10) und Probanden (n=4). Die Patienten wurden nach Geschlecht,

Alter, Lokalisation der Neoplasie, der staging- und TNM-Kategorie genauer klassifiziert.

Aufgrund eines postoperativen Myokardinfarkts und anschließender intensivmedizinischer Betreuung gab es einen dropout aus dem Patientenkollektiv zu beklagen.

Tabelle 4: Anamnestische und klinische Parameter der inkludierten (#1-10) Patienten, sowie Probanden (#11-14).

#	Geschlecht	Alter	Lokalisation des Tumors	UICC-Stage	TNM	Tage zwischen Erst- und Zweitmessung
1	w	59	Zunge	III	pT2 pN1	32
2	m	69	Mundboden	II	pT2 pN0	41
3	m	47	Mundboden	I	pT1 pN0	43
4	m	49	Mundboden	I	pT1 pN0	33
5	w	57	Oropharynx	II	pT2 pN0	32
6	w	76	Wangenschleimhaut	III	pT2 pN1	42
7	m	58	Mundboden	II	pT2 pN0	33
8	m	58	Zunge	III	pT3 pN1	28
9	m	74	Mundboden	III	pT2 pN0	35
10	m	48	Mundboden	IVB	pT4a pN2c	34
11	w	32	-	-	Kontrolle	-
12	w	40	-	-	Kontrolle	-
13	w	38	-	-	Kontrolle	-
14	m	48	-	-	Kontrolle	-

Sowohl die Patienten, als auch die Probanden haben jeweils zwei Atemproben abgegeben beziehungsweise zwei Mylarbeutel befüllt (Abbildung 5). So konnten Artefakte oder Messfehler erkannt und ausgeschlossen werden.

Die Identifizierung der unbekanntem Stoffgemische erfolgte über die chromatographische Auftrennung in einzelne Inhaltsstoffe, weiter wurden die Analyte im Massenspektrometer qualitativ und quantitativ analysiert und mittels Bibliotheksabgleich verifiziert.

In Abbildung 5 sind zwei Full-scan Chromatogramme dargestellt, diese zeigen die chromatographische Auftrennung zweier Atemanalysen eines Patienten.

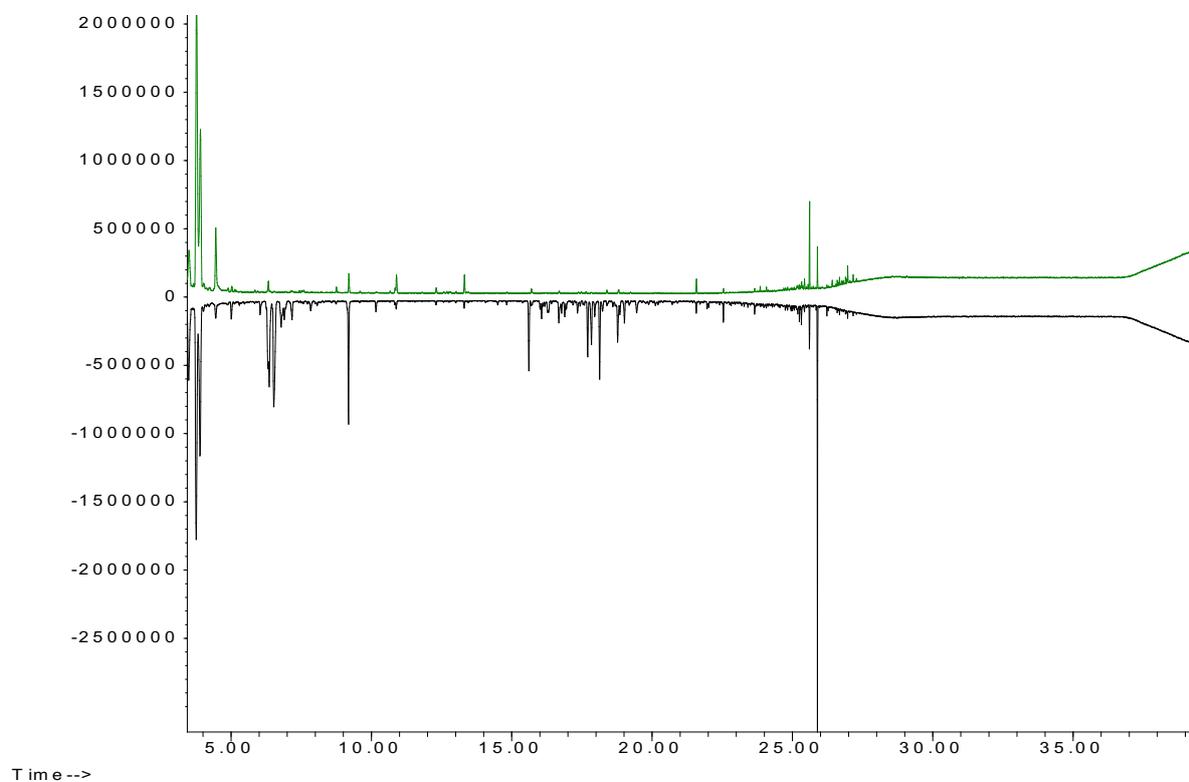


Abbildung 5: Zwei überlagerte Full-Scan-Chromatogramme einer Doppelprobe.

Die ermittelten Analysedaten vor und nach chirurgischer Exzision wurden für jeden Patienten beurteilt und verglichen.

Auffälligkeiten, wie etwa der Abfall oder Anstieg bestimmter Verbindungskonzentrationen wurden markiert und gezählt. Wenn eine Verbindung bei mehr als sechs Patienten nachweisbar war, wurde diese Substanz mit dem Analyseergebnis der gesunden Probandengruppe verglichen.

Insgesamt fanden sich 21 relevante VOCs, die wiederum mit den Ergebnissen der Kontrollgruppe verglichen wurden. Ein Muster von acht dieser 21 Verbindungen war bei allen Patienten mit PECA zu finden (Tabelle 5). Drei der acht detektierten Verbindungen zeigten bei vier Patienten postoperativ einen signifikanten Abfall und waren bei fünf Patienten nicht mehr nachweisbar. In dieser Korrelation konnten bereits charakteristische Muster für die Gruppe des Patientenkollektivs aufgedeckt werden.

Tabelle 5: Konzentrationsveränderungen spezifischer VOCs des Patientenkollektivs (1-10): T: Tumorklassifizierung, N: Lymphknotenbeteiligung, - Konzentrationsabfall postoperativ, -- postoperativ nicht mehr nachweisbar, + Konzentrationsanstieg postoperativ, ++ Anstieg um den 8,4-101,5-fachen Faktor, 0: keine Konzentrationsunterschiede ermittelt. DDS: Dimethyl-Disulfid, D5: Decamethylcyclopentasiloxan, PX: P-Xylen, MEK: Methyl-Ethyl-Keton, DBH: Dibutylhydroxytoluen, NHE: n-Heptan, TOL: Toluol, 1HE: 1-Hepten.

	T	N	DDS	D5	PX	MEK	DBH	NHE	TOL	1HE
1	2	1	-	+	0	+	-	0	+	0
2	2	0	-	+	--	+	-	++	0	0
3	1	0	--	-	0	-	-	+	+	+
4	1	0	--	-	-	++	+	++	++	++
5	2	0	--	-	0	++	+	++	++	++
6	2	1	-	--	+	++	++	++	++	++
7	2	0	--	0	--	++	+	++	++	++
8	3	1	-	0	--	-	+	-	-	-
9	2	0	--	--	-	-	+	-	+	-
10	4	1	+	-	-	+	+	-	-	-

Die Konzentration von Dimethyl Disulfid (DDS) sank bei allen Patienten mit T2/T3 Tumoren und bei fünf Patienten war die Verbindung postoperativ gar nicht mehr nachzuweisen.

DDS wird in der Natur hauptsächlich von Pflanzen und Pilzen freigesetzt und wird als ein aasartiger Geruch charakterisiert, der Insekten anlockt und somit zur Bestäubung und Sporenverbreitung dient. Diese methylierten Schwefelverbindungen findet man in der Pflanzenwelt in der Familie der Aronstabgewächse und bei den Pilzen wie beispielsweise der Stinkmorchel. DDS ist als Neurotoxin einzustufen (Dugravot et al., 2003).

Konzentrationen von Decamethylcyclopentasiloxane (D5) und P-Xylene (PX) sanken bei fünf Patienten auf Null.

Die anderen fünf Verbindungen stiegen postoperativ an und waren ebenso im gesunden Kollektiv präsent. Methyl-Ethyl-Ketone (MEK) und Dibutylhydroxytoluene (DBH) stiegen bei sieben Patienten mit einem durchschnittlichen Faktor von 5,8 beziehungsweise 2,2. Bei einem Patienten war MEK nur postoperativ zu messen. Beiden Verbindungen werden antioxidative Eigenschaften zugesprochen.

Die Verbindungen n-Heptane (NHE), Toluene (TOL) und 1-Heptene (1H) stiegen mit einem Faktor von 17,9, 9,2 beziehungsweise 21,5 an.

Diskussion

Bewertung der Ergebnisse

In unserer Pilotstudie haben wir die grundsätzliche Möglichkeit evaluiert, inwiefern ein Atemtest als diagnostisches Instrument bei der Erkennung von PECA im Mund-Hals-Bereich einsetzbar und qualitativ aussagekräftig ist. Atemproben von Patienten mit PECA der Mundhöhle wurden vor und nach operativer Intervention analysiert und mit den Atemproben gesunder Raucher korreliert. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass sich trotz der limitierten Patientenzahl bestimmte VOC-Muster aus der Patientengruppe prä- und postoperativ signifikant verändert haben und sich beiden Teilnehmergruppen anhand der Atemgasanalysen eindeutig unterscheiden ließen.

Methodische Standards in diesem relativ jungen Forschungsgebiet waren nur begrenzt vorhanden. Im Rahmen dieser Pilotstudie wurde versucht, eine möglichst einfache Methode der Beprobung zu finden und diese in den klinischen Alltag integrieren zu können.

Die Aussagekraft unserer Ergebnisse wird im Folgenden diskutiert.

Die Konzentrationen der ermittelten 125 VOCs liegen im Bereich von parts per million (ppm) und parts per billion (ppb). Es handelt sich hierbei also um ein hochsensitives Messverfahren mit standardisierten Messabläufen und kalibrierten Analyseprozessen. Aufgrund dieser Gegebenheit ergibt sich eine Schwachstelle des Analyseverfahrens und möglicherweise einer der Gründe, warum sich noch kein standardisiertes Messverfahren durchsetzen konnte. Multiple Einflussgrößen, die die Messergebnisse verfälschen bzw. verändern können sind beispielsweise Apparatur spezifische Eigenschaften wie materialeigene Substanzen, probandenspezifische Faktoren, wie den Stoffwechsel betreffende Allgemeinerkrankung oder vor der Messung durchgeführte Hygienemaßnahmen oder auch im besonderen Maße die Parameter der Umgebungsluft, wie Inhaltsstoffe des Reinigungsmittels, die zur Säuberung des Raums verwendet wurden. Auch laborspezifische Kalibrierungen von Messautomaten und internen Standards können bei gleichen Analyten unterschiedliche Werte erbringen.

Um diesen Einflussgrößen entgegen zu wirken haben wir in unserer Studie die Atemproben jeweils im gleichen Raum, zu gleichen Tageszeiten und nach gleichen Standards durchgeführt. Alle Teilnehmer wurden vor der eigentlichen Atemspende zur „Lungenreinigung“ angewiesen. Diese erfolgte durch die speziell angefertigte Atemapparatur aus inerten Material durch welche die Teilnehmer fünf Minuten inhalierten und in die Umgebungsluft ausatmeten. Die zwischengeschalteten Aktivkohlefilter versprechen eine 99,9%ige Eliminierung kleinster Partikel der Umgebungsluft. Der Examinationsraum wurde mindestens 24 Stunden vorher gereinigt und vor der Atemspende jeweils eine Stunde vorher mit Frischluft gelüftet.

Alle Messungen fanden am Morgen statt und die Testpersonen waren angehalten, Hygienemaßnahmen, Aufnahme von Nahrung oder Flüssigkeiten, Habits wie Rauchen mindestens acht Stunden vor dem Zeitpunkt der Atemspende zu unterlassen. Die von uns verwendeten Mylarbeutel gelten als chemisch inert und wurden jeweils vor Gebrauch thermisch mit Stickstoffgas gereinigt und auf Reinheit geprüft. Die Mylarbeutel zeigten sich den Tedlar-Beuteln überlegen, da in den Tedlar-Beuteln materialspezifische Verbindungen gefunden wurden (Bouza et al., 2017). Geraten die Tedlar-Beutel zu stark unter Druck, wenn man beispielsweise die Volumengröße zu klein wählt, kommt es zu Mikrorissen, wodurch wiederum Verbindungen frei werden, die das Analyseergebnis verfälschen können, so Bouza. Ebenso wurde die gesamte Apparatur vor jeder Messung mit SKC Aircheck Sampler

Model 224-PCX zwei Stunden vor der Messung mit gereinigter Luft gesäubert. Die Atemproben wurden in einem Labor mit dem immer wieder gleichen Chromatographen analysiert und mit internen Standards, sowie externen Spektralbibliotheken spezifiziert.

Die limitierte Anzahl an Teilnehmern ist dem Pilotcharakter unserer Studie geschuldet. Es galt zunächst, dass wir hier die Machbarkeit der Studie und das Potential der Ausatemluft als diagnostisches Instrument zeigen wollten, was die Ergebnisse deutlich darlegen. So ließen sich in unserer Patientengruppe drei VOCs identifizieren, deren Konzentration postoperativ gesunken war. Diese VOCs konnten bei gesunden Probanden nicht detektiert werden. Betrachtet man diese VOCs, führt das nach der Auswertung mittels Jack-Knife-Methode und Kreuzvalidierung zu einer Vorhersagerate von 100 Prozent. Bei einer Teilnehmeranzahl von n=14 muss diese Quote jedoch noch durch größer angelegte Studien evaluiert werden.

Nicht erklärbar ist die Tatsache, dass bei einem Patienten mit fortgeschrittenem Tumor und Lymphknotenbefall (pT4 pN2c) ein Anstieg der DDS-Konzentration zu verzeichnen war. Mit dem Verdacht auf einen Residualtumor wurde fünf Monate postoperativ ein Baseline-CT angefertigt, das weder klinisch noch radiologisch Hinweise auf Residuen oder Rezidive gab.

Um eine genauere Vorhersage treffen zu können, stehen weitere Langzeitstudien mit größeren Kohorten aus. Nach den hier gewonnenen Erkenntnissen ist es sinnvoll, in den Ergebnissen nach bestimmten VOC-Muster zu suchen, anstatt nur nach dem Anstieg und Abfall einzelner VOCs zu suchen. Neben den erhöhten Konzentrationswerten von DDS, wurden auch bei D5, sowie bei PX hohe Emissionswerte detektiert, während Verbindungen wie MEK, DBH, NHE, TOL, 1HE maximal in geringen Konzentrationen nachzuweisen waren.

Limitationen

Die Einschränkung, die sich aus unserer Studie ergab, liegt in der Art- und Weise der Atemprobe mittels der Atemmaske. Um optimale Ergebnisse erzielen zu können, muss der Proband bei einem kontinuierlichen Druck von 15-20cm Wassersäule ausatmen. Dies gewährleistet einen kontinuierlichen Atemfluss und die Kontamination aus dem nasopharyngealen Bereich kann somit ausgeschlossen werden. In der Praxis hat sich gezeigt, dass die Durchführung der Atemprobe nicht

für alle Probanden problemlos durchzuführen war, was an der physischen Beeinträchtigung lag.

Ein zweiter limitierender Faktor unserer Studie ergab sich durch die unterschiedlichen Standorte von Ort der Messung und Ort der Analyse mittels GC/MS. Der Transport der Sammelbehälter, die im Labor ausgewertet werden, ist sowohl zeit-, als auch kostenintensiv. Eine Analyse der Proben direkt am Ort der Beprobung wäre wünschenswert.

Der Pilotcharakter der Studie stellt einen weiteren limitierenden Faktor zur Aussagekraft der Studie dar, die Ergebnisse müssten in einer größer angelegten Studie verifiziert werden. Gegebenenfalls könnte man anhand der erzielten Ergebnisse spezifisch empfindliche Sensoren entwickeln, um direkt vor Ort eine Auswertung durchzuführen (Point-of-Care-Diagnostikum).

Einordnung in bestehende Literatur

Die Arbeitsgruppe um Prof. Haick befasste sich intensiv mit dem biochemischen Ursprung und Metabolismus von Malignom-bezogenen VOCs, den sogenannten Marker-VOCs und publizierte 2014 eine Liste mit 115 tumorspezifischen VOCs (Haick et al., 2014).

Gruber et al zeigten signifikante VOC-Konzentrationsunterschiede in der Expirationsluft von PECA-Patienten, Patienten mit benignen oralen Tumoren und gesunden Probanden (Gruber et al., 2014b).

Schmutzhard et al verglichen in ihrer Studie die Ergebnisse von PECA-Patienten mit denen von Gesunden, von Hochrisiko-Probanden (chronischer Alkohol- und Tabakkonsum) und von PECA-Patienten sechs Monate nach erfolgreicher Therapie. Schmutzhard publizierte 2008 als einer der Ersten über „volatile organische Verbindungen als diagnostischer Marker für Kopf-Hals-Tumoren“. Die Kollekte des Atems erfolgte in einen ein-Liter-Telfonbeutel, dieser gilt als chemisch inert und sollte die Ergebnisse nicht verfälschen. Die Analyse des Exhalats wurde mittels Proton-Transfer-Massenspektrometrie durchgeführt. Die Technik hierbei besteht in der Affinität der VOCs zum Oxoniumion, während der Analyt als Protonenakzeptor fungiert. Im Detektor wird die Konzentration der gebundenen Protonen gemessen und dadurch die Konzentration des gebundenen Moleküls bzw des VOCs bestimmt.

Aus insgesamt 209 Messungen ergaben sich 42 VOCs, die die Kontrollgruppen signifikant unterschieden. Jedoch blieb eine genaue Identifizierung der Verbindungen aus. In unserer Arbeit wurden insgesamt 125 verschiedene VOCs detektiert, bei acht VOC-Analysedaten zeigten sich bemerkenswerte Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Die geringe Anzahl an detektierten VOCs erklärt sich, abgesehen von der niedrigeren Teilnehmerzahl sicherlich auch durch die gewählte Versuchsanordnung. In der Studie von Schmutzhard erfolgt die Atemprobe indem der Proband direkt in einen Teflonbeutel expiriert. In unserer Arbeit erfolgt die Beprobung der Sammelbehälter mittels einer Atemmaske, die durch einen Aktivkohlefilter bei Inspiration des Patienten 99,9% der Umgebungs-VOCs eliminiert. Um den Effekt der Filtrierung zu verstärken, ist der Proband angewiesen fünf Minuten vor Befüllung des Mylar-Beutels eine Lungenreinigung vorzunehmen. Durch gezielte Inspiration über die Maske und Expiration in die Umgebungsluft werden 99,99% der exogenen VOCs filtriert, während die Inspiration durch die Nase durch eine Nasenklemme unterbunden wurde.

Anhand der VOC-Konzentrationen aus der Gruppe der Acetonitrile, welche besonders in der Patienten- und Hochrisikogruppe erhöht waren und der Isoprene, deren Konzentration von krank zu gesund signifikant abnahm konnte er die Kohorten voneinander differenzieren (Schmutzhard et al., 2008).

Ein ähnlicher Versuchsaufbau mit unterschiedlicher Fragestellung wird in der Studie von Bouza et al aus dem Jahre 2017 beschrieben. Er zeigt in seiner Arbeit den Versuch auf, VOCs aus der Atemluft und der Umgebungsluft des Karzinoms der Mundhöhle als Biomarker für Patienten mit oralem PECA zu verwenden. Bouza untersucht nicht nur den Atem und die Luft, die die Läsion umgibt mittels Festphasen-Mikroextraktion gefolgt von Gaschromatografie gekoppelt mit Massenspektrometrie. Er nützt die Lokalisation des oralen Karzinoms, um die Umgebungsluft aus unmittelbarer Nähe des Mundhöhlenkarzinoms zu sammeln, analysiert diese und vergleicht die gewonnenen Resultate miteinander.

Die Atemgasprobe erfolgt pro Patient (n=26) und gesundem Proband (n=26) in einem ein-Liter und einem drei-Liter Tedlarbeutel. Jedoch stellte sich heraus, dass es bei dem ein-Liter-Beutel zu Wandspannungen kam, weshalb es zu materialspezifischen Freisetzung kleinster Verbindungen kam. Darüber hinaus erwiesen sich die Peakintensitäten für die drei-Liter-Beutel als überlegen, da diese im Vergleich höhere Werte aufgrund der größeren Probevolumina erzielten.

Die Resultate der Atemproben ergaben, dass Verbindungen wie Undecan, Dodecan, Decanal, Benzaldehyde, 3,7-Dimethylnonan, 1-Octen und Hexadecan als potentielle Biomarker für PECA in Frage kommen. Die Ergebnisse der Analyse der Mundhöhle zeigten Benzaldehyde, Toluol und Styrol als relevante Biomarker (Bouza et al., 2017).

Buszewski stellte die Atemgasanalysen von Rauchern, Passivrauchern und Gesunden gegenüber. In dieser Studie wurden endogene und exogene, nitrogenenthaltene VOCs differenziert beurteilt. Wie zu erwarten, zeigten die exogenen VOCs, die größtenteils von Inhaltsstoffen des Tabaks stammten, signifikante Konzentrationsanstiege von Gesunden, Passivrauchern und Rauchern. Die als kanzerogen eingestuften Substanzen wie Benzene, 2,5-Dimethyl-Furan und Toluene sind gemeinhin in allen Atemproben nachzuweisen, jedoch in vielfach erhöhten Konzentrationen bei Rauchern. Mit diesen Erkenntnissen wird die Wahrscheinlichkeit des Karzinomrisikos evaluiert (Buszewski et al., 2009).

Der Forschungsbereich der Atemgasdiagnostik erfährt mehr und mehr Interesse und bereits publizierte Forschungsergebnisse sind erfolgsversprechend.

Das Konzept der hier vorgestellten Pilotstudie ist der Vergleich von prä- und postoperativen Atemproben derselben Patienten nach R0-Resektion des Tumors. Die Analyseergebnisse werden den Resultaten gesunder rauchender und gelegentlich alkoholkonsumierender Probanden gegenübergestellt.

Ein analytischer Vergleich der Konzentrationsunterschiede der Atemproben von PECA-Patienten der Mundhöhle prä- und postoperativ ist in der Literatur bis dato nicht beschrieben und unser Ansatz, die Behandlungsreaktion aufzuzeigen, die durch eine Abnahme von spezifischen VOCs nach Resektion des Tumors auftritt, ist neu. In modifizierter Herangehensweise verglich Altomare 2015 die Atemgasanalysen von Patienten mit kolonrektalem Karzinom vor und nach kurativer Therapie mit dem Ergebnis, dass nach 24 Monaten elf VOCs nicht mehr nachzuweisen waren. Seine Forschungsergebnisse sind vielversprechend. Eine hohe Sensitivität und Spezifität unterstreichen das Potential der Atemgasdiagnostik als Diagnostik- und Nachsorgeinstrument (Altomare et al., 2015).

Im Bereich des PECA der Mundhöhle steht dieser Vergleich noch aus. In unserer Arbeit werden die Konzentrationsunterschiede identifizierter flüchtiger Substanzen diskutiert, die sich von prä- zu postoperativ ergaben. Die Resultate wurden mit den Analysedaten gesunder Probanden verglichen. Anhand der Ergebnisse der

Auswertung lassen sich Charakteristika der einzelnen VOCs ableiten und liefern somit hilfreiche Erkenntnisse für den Bereich der Diagnostik, Vorsorge und Nachsorge von PECA der Mundhöhle.

Eine ähnliche Versuchsanordnung wie die unsere mittels Atemmaske ist in der Arbeit von Hakim et al beschrieben (Hakim et al., 2011). In seiner Studie vergleicht er die Atemgasanalysen von 22 Patienten mit PECA im Kopf-Hals-Bereich mit den Auswertungen von 40 gesunden Probanden und 25 Lungenkarzinom-Patienten. Das Versuchsprotokoll gibt an, dass zu jeder standardisierten Messung eine Raumluftanalyse durchgeführt wurde. Diese bestätigte, dass durch den zwischengeschalteten Aktivkohlefilter 99,99% der exogenen VOCs aus der Umgebungsluft eliminiert wurden. In der Atemapparatur ist ein Totraumfilter integriert. Durch den Druckregulator für die Expiration soll der Proband gleichmäßig bei 10-15cm Wassersäule ausatmen, bei diesem Druck ist das Gaumensegel des Teilnehmers gespannt und der Nasengang verschlossen. In unserer Arbeit wurde eine Nasenklemme verwendet, um die Verfälschung durch Luft aus dem Nasengang auszuschließen. Durch die Apparatur ist es möglich, ausschließlich die gewünschte alveoläre Luft zu sammeln. Die anschließende Analyse erfolgt mittels GC-MS und/oder mit der sogenannte NA-NOSE (Nanoscale artificial NOSE). Die NA-NOSE ist ein künstliches olfaktorisches System, dessen hochsensible Gasnanosensoren kleinste Konzentrationen flüchtiger Substanzen und deren Konzentrationsunterschiede detektiert. Das System basiert auf der Detektion mittels fünf unterschiedlich beschichteter Goldnanopartikel-Sensoren.

In der Studie von Hakim et al konnte mittels NA-NOSE eine klare Unterscheidung zwischen den 16 Kopf-Hals-Tumor-Patienten und den 26 gesunden Probanden erfolgen. Die weitere Analyse mit GC-MS ergab sechs VOCs, die eine Differenzierung zwischen den Tumor-Patienten und den Gesunden zuließ. Vergleicht man die sechs VOCs mit unseren Analysedaten findet man Übereinstimmungen in Stoffgruppen der Heptanen und Hexanonen, die nur kleinste Unterschiede in der Struktur aufweisen. Auch Limone und P-Xylene wurden in Haicks Studie detektiert, diese schloss er als exogene Krankenhaus-VOCs aus.

Die Tatsache, dass die Ergebnisse zwischen Hakims und unserer Studie nicht komplett übereinstimmen, führt zu mehreren Überlegungen:

Die Kalibrierung laborspezifischen Automaten weicht in geringem Maße voneinander ab, sowie die Strukturformeln in beiden Ergebnissen. Weiter ist zu beachten, dass die verwendeten Bibliotheken zur Identifikation der VOCs unterschiedlich waren.

Ebenso könnte sich die Tatsache durch die unterschiedliche Lokalisation der Karzinome erklären. In unserer Studie waren es PECA der Mundhöhle und/ oder mit Angrenzung an die pharyngeale oder laryngeale Region, während die Patientenkohorte von Hakim hauptsächlich Karzinome im Pharynx- oder Larynx-Bereich aufwies. Diese Beobachtung legt den Gedanken nah, dass Atemgasanalysen nicht nur der Detektion von malignen Geschehen dienen, sondern auch Hinweise auf dessen Lokalisation geben könnten. Es stehen noch weitere Studien aus, um diese Fragen zu diskutieren.

Eine andere vielversprechende Methode zur Detektion bestimmter VOC-Muster beschreibt Leunis et al. in ihrer Kohortenstudie von 36 Patienten mit PECA des Kopf-Hals-Bereichs und 23 gesunden Probanden (Leunis et al., 2014). Bei ihrer Methode wird der Atem der Studienteilnehmer in Tedlar-Beuteln gesammelt und schließlich durch eine „elektronische Nase“ (E-Nose) ausgewertet. Die Einsatzbereiche der E-Nose liegen in der Diagnostik von Tuberkulose, renaler Dysfunktionen, urinaler Infektionen, chronisch obstruktiver Lungenerkrankungen (COPD) oder von Lungen- und Prostatakarzinomen. Außerhalb der Medizin wird die E-Nose in der Lebensmittelindustrie oder beispielsweise zur Detektion chemischer oder explosiver Agentien verwendet. Die Elektrische Nase ist ein technischer Messautomat bestehend aus 12 Metalloxid-Sensoren, der durch Widerstands- oder Konduktionswechsel der Sensoren Daten zu Gaskonzentrationen beziehungsweise bestimmte VOC-Muster liefert. In seinen Ergebnissen konnte Leunis et al. mit einer Sensitivität von 90% und einer Spezifität von 80% die beiden Kohorten voneinander unterscheiden. Jedoch ergeben sich aus der gewählten Methode keine identifizierten VOCs, sondern nur bestimmte VOC-Muster.

Schlussfolgerung

Unsere Pilotstudie konnte nachweisen, dass es im Atem von Patienten mit PECA im Kopf-/Hals-Bereich Muster spezifischer volatiler organischer Verbindungen gibt, die nach operativer Therapie nicht mehr nachweisbar sind. Wir konnten die

grundsätzliche Durchführbarkeit eines Atemtests zur Tumoridentifikation bestätigen, wobei eine Bestätigung unserer Ergebnisse mit einer größeren Fallzahl aussteht, um einen Atemtest zur Diagnostik des PECA zu etablieren und gegebenenfalls auch in der regelmäßigen Rezidivdiagnostik einzusetzen.

Literaturverzeichnis

- ALTOMARE, D. F., DI LENA, M., PORCELLI, F., TRAVAGLIO, E., LONGOBARDI, F., TUTINO, M., DEPALMA, N., TEDESCO, G., SARDARO, A., MEMEO, R. & DE GENNARO, G. 2015. Effects of Curative Colorectal Cancer Surgery on Exhaled Volatile Organic Compounds and Potential Implications in Clinical Follow-up. *Ann Surg*, 262, 862-6; discussion 866-7.
- AMAL, H., LEJA, M., FUNKA, K., SKAPARS, R., SIVINS, A., ANCANS, G., LIEPNIECE-KARELE, I., KIKUSTE, I., LASINA, I. & HAICK, H. 2016. Detection of precancerous gastric lesions and gastric cancer through exhaled breath. *Gut*, 65, 400-7.
- AMANN, A., MIEKISCH, W., SCHUBERT, J., BUSZEWSKI, B., LIGOR, T., JEZIERSKI, T., PLEIL, J. & RISBY, T. 2014a. Analysis of exhaled breath for disease detection. *Annual review of analytical chemistry*, 7, 455-82.
- AMANN, A., MOCHALSKI, P., RUZSANYI, V., BROZA, Y. Y. & HAICK, H. 2014b. Assessment of the exhalation kinetics of volatile cancer biomarkers based on their physicochemical properties. *Journal of breath research*, 8, 016003.
- BARNETT, D., TASSOPOULOS, C. N. & FRASER, T. R. 1969. Breath acetone and blood sugar measurements in diabetes. *Clinical science*, 37, 570.
- BAVARVA, J. H., TAE, H., MCIVER, L. & GARNER, H. R. 2014. Nicotine and oxidative stress induced exomic variations are concordant and overrepresented in cancer-associated genes. *Oncotarget*, 5, 4788-98.
- BERNIER, J., DOMENGE, C., OZSAHIN, M., MATUSZEWSKA, K., LEFEBVRE, J. L., GREINER, R. H., GIRALT, J., MAINGON, P., ROLLAND, F., BOLLA, M., COGNETTI, F., BOURHIS, J., KIRKPATRICK, A. & VAN GLABBEKE, M. 2004. Postoperative irradiation with or without concomitant chemotherapy for locally advanced head and neck cancer. *The New England journal of medicine*, 350, 1945-52.
- BOUZA, M., GONZALEZ-SOTO, J., PEREIRO, R., DE VICENTE, J. C. & SANZ-MEDEL, A. 2017. Exhaled breath and oral cavity VOCs as potential biomarkers in oral cancer patients. *J Breath Res*, 11, 016015.
- BUSZEWSKI, B., KESY, M., LIGOR, T. & AMANN, A. 2007. Human exhaled air analytics: biomarkers of diseases. *Biomedical chromatography : BMC*, 21, 553-66.
- BUSZEWSKI, B., ULANOWSKA, A., LIGOR, T., DENDERZ, N. & AMANN, A. 2009. Analysis of exhaled breath from smokers, passive smokers and non-smokers by solid-phase microextraction gas chromatography/mass spectrometry. *Biomedical chromatography : BMC*, 23, 551-6.
- CHENG, L., STURGIS, E. M., EICHER, S. A., SPITZ, M. R. & WEI, Q. 2002. Expression of nucleotide excision repair genes and the risk for squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer*, 94, 393-7.
- D'CRUZ, A. K., SIDDACHARI, R. C., WALVEKAR, R. R., PANTVAIDYA, G. H., CHAUKAR, D. A., DESHPANDE, M. S., PAI, P. S. & CHATURVEDI, P. 2009. Elective neck dissection for the management of the N0 neck in early cancer of the oral tongue: need for a randomized controlled trial. *Head & neck*, 31, 618-24.
- DAHLSTROM, K. R., ADLER-STORTHZ, K., ETZEL, C. J., LIU, Z., DILLON, L., EL-NAGGAR, A. K., SPITZ, M. R., SCHILLER, J. T., WEI, Q. & STURGIS, E. M. 2003. Human papillomavirus type 16 infection and squamous cell carcinoma of the head and neck in never-smokers: a matched pair analysis. *Clin Cancer Res*, 9, 2620-6.
- DUGRAVOT, S., GROLLEAU, F., MACHEREL, D., ROCHETAING, A., HUE, B., STANKIEWICZ, M., HUIGNARD, J. & LAPIED, B. 2003. Dimethyl disulfide exerts insecticidal

- neurotoxicity through mitochondrial dysfunction and activation of insect K(ATP) channels. *J Neurophysiol*, 90, 259-70.
- EU-KOMMISSION 2008. Mitteilung der Kommission an den Rat. EG2004/42/EG.
- FARASAT, S., YU, S. S., NEEL, V. A., NEHAL, K. S., LARDARO, T., MIHM, M. C., BYRD, D. R., BALCH, C. M., CALIFANO, J. A., CHUANG, A. Y., SHARFMAN, W. H., SHAH, J. P., NGHIEM, P., OTLEY, C. C., TUFARO, A. P., JOHNSON, T. M., SOBER, A. J. & LIEGEOIS, N. J. 2011. A new American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous squamous cell carcinoma: creation and rationale for inclusion of tumor (T) characteristics. *J Am Acad Dermatol*, 64, 1051-9.
- FILIPIAK, W., SPONRING, A., FILIPIAK, A., AGER, C., SCHUBERT, J., MIEKISCH, W., AMANN, A. & TROPPEMAIR, J. 2010. TD-GC-MS analysis of volatile metabolites of human lung cancer and normal cells in vitro. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 19, 182-95.
- GRUBER, M., TISCH, U., JERIES, R., AMAL, H., HAKIM, M., RONEN, O., MARSHAK, T., ZIMMERMAN, D., ISRAEL, O., AMIGA, E., DOWECK, I. & HAICK, H. 2014a. Analysis of exhaled breath for diagnosing head and neck squamous cell carcinoma: a feasibility study. *Br J Cancer*, 111, 790-8.
- GRUBER, M., TISCH, U., JERIES, R., AMAL, H., HAKIM, M., RONEN, O., MARSHAK, T., ZIMMERMAN, D., ISRAEL, O., AMIGA, E., DOWECK, I. & HAICK, H. 2014b. Analysis of exhaled breath for diagnosing head and neck squamous cell carcinoma: a feasibility study. *British journal of cancer*, 111, 790-8.
- GUNERI, P. & EPSTEIN, J. B. 2014. Late stage diagnosis of oral cancer: components and possible solutions. *Oral Oncol*, 50, 1131-6.
- GUPTA, B. & JOHNSON, N. W. 2014. Emerging and established global life-style risk factors for cancer of the upper aero-digestive tract. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, 15, 5983-91.
- HAICK, H., BROZA, Y. Y., MOCHALSKI, P., RUZSANYI, V. & AMANN, A. 2014. Assessment, origin, and implementation of breath volatile cancer markers. *Chemical Society reviews*, 43, 1423-49.
- HAKIM, M., BILLAN, S., TISCH, U., PENG, G., DVROKIND, I., MAROM, O., ABDAH-BORTNYAK, R., KUTEN, A. & HAICK, H. 2011. Diagnosis of head-and-neck cancer from exhaled breath. *British journal of cancer*, 104, 1649-55.
- HICKS, L. C., HUANG, J., KUMAR, S., POWLES, S. T., ORCHARD, T. R., HANNA, G. B. & WILLIAMS, H. R. 2015. Analysis of Exhaled Breath Volatile Organic Compounds in Inflammatory Bowel Disease: A Pilot Study. *Journal of Crohn's & colitis*.
- LARSEN, S. R., JOHANSEN, J., SORENSEN, J. A. & KROGDAHL, A. 2009. The prognostic significance of histological features in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*, 38, 657-62.
- LAYLAND, M. K., SESSIONS, D. G. & LENOX, J. 2005. The influence of lymph node metastasis in the treatment of squamous cell carcinoma of the oral cavity, oropharynx, larynx, and hypopharynx: N0 versus N+. *The Laryngoscope*, 115, 629-39.
- LEA, J., BACHAR, G., SAWKA, A. M., LAKRA, D. C., GILBERT, R. W., IRISH, J. C., BROWN, D. H., GULLANE, P. J. & GOLDSTEIN, D. P. 2010. Metastases to level IIb in squamous cell carcinoma of the oral cavity: a systematic review and meta-analysis. *Head & neck*, 32, 184-90.

- LEUNIS, N., BOUMANS, M. L., KREMER, B., DIN, S., STOBBERINGH, E., KESSELS, A. G. & KROSS, K. W. 2014. Application of an electronic nose in the diagnosis of head and neck cancer. *Laryngoscope*, 124, 1377-81.
- LI, K., HUSING, A. & KAAKS, R. 2014. Lifestyle risk factors and residual life expectancy at age 40: a German cohort study. *BMC Med*, 12, 59.
- LIAO, P. H., CHANG, Y. C., HUANG, M. F., TAI, K. W. & CHOU, M. Y. 2000. Mutation of p53 gene codon 63 in saliva as a molecular marker for oral squamous cell carcinomas. *Oral oncology*, 36, 272-6.
- MEHTA, V., YU, G. P. & SCHANTZ, S. P. 2010. Population-based analysis of oral and oropharyngeal carcinoma: changing trends of histopathologic differentiation, survival and patient demographics. *Laryngoscope*, 120, 2203-12.
- MONCRIEFF, M., SANDILLA, J., CLARK, J., CLIFFORD, A., SHANNON, K., GAO, K. & O'BRIEN, C. 2009. Outcomes of primary surgical treatment of T1 and T2 carcinomas of the oropharynx. *The Laryngoscope*, 119, 307-11.
- MONTORO, J. R., RICZ, H. A., SOUZA, L., LIVINGSTONE, D., MELO, D. H., TIVERON, R. C. & MAMEDE, R. C. 2008. Prognostic factors in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Brazilian journal of otorhinolaryngology*, 74, 861-6.
- O'SULLIVAN, B. & SHAH, J. 2003. New TNM staging criteria for head and neck tumors. *Seminars in surgical oncology*, 21, 30-42.
- PARKIN, D. M., BRAY, F., FERLAY, J. & PISANI, P. 2005. Global cancer statistics, 2002. *CA: a cancer journal for clinicians*, 55, 74-108.
- PATEL, S. G. & SHAH, J. P. 2005. TNM staging of cancers of the head and neck: striving for uniformity among diversity. *CA: a cancer journal for clinicians*, 55, 242-58; quiz 261-2, 264.
- PAULING, L., ROBINSON, A. B., TERANISHI, R. & CARY, P. 1971. Quantitative analysis of urine vapor and breath by gas-liquid partition chromatography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 68, 2374-6.
- PENG, G., HAKIM, M., BROZA, Y. Y., BILLAN, S., ABDAL-BORTNYAK, R., KUTEN, A., TISCH, U. & HAICK, H. 2010. Detection of lung, breast, colorectal, and prostate cancers from exhaled breath using a single array of nanosensors. *British journal of cancer*, 103, 542-51.
- PHILLIPS, M., BASA-DALAY, V., BLAIS, J., BOTHAMLEY, G., CHATURVEDI, A., MODI, K. D., PANDYA, M., NATIVIDAD, M. P., PATEL, U., RAMRAJE, N. N., SCHMITT, P. & UDWADIA, Z. F. 2012. Point-of-care breath test for biomarkers of active pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*, 92, 314-20.
- PHILLIPS, M., BAUER, T. L., CATANEO, R. N., LEBAUER, C., MUNDADA, M., PASS, H. I., RAMAKRISHNA, N., ROM, W. N. & VALLIERES, E. 2015. Blinded Validation of Breath Biomarkers of Lung Cancer, a Potential Ancillary to Chest CT Screening. *PLoS One*, 10, e0142484.
- PHILLIPS, M., BEATTY, J. D., CATANEO, R. N., HUSTON, J., KAPLAN, P. D., LALISANG, R. I., LAMBIN, P., LOBBES, M. B., MUNDADA, M., PAPPAS, N. & PATEL, U. 2014. Rapid point-of-care breath test for biomarkers of breast cancer and abnormal mammograms. *PloS one*, 9, e90226.
- PHILLIPS, M., CATANEO, R., LEBAUER, C., MUNDADA, M. & SAUNDERS, C. 2016. Breath mass ion biomarkers of breast cancer. *J Breath Res*.
- PHILLIPS, M., CATANEO, R. N., CUMMIN, A. R., GAGLIARDI, A. J., GLEESON, K., GREENBERG, J., MAXFIELD, R. A. & ROM, W. N. 2003a. Detection of lung cancer with volatile markers in the breath. *Chest*, 123, 2115-23.

- PHILLIPS, M., CATANEO, R. N., DITKOFF, B. A., FISHER, P., GREENBERG, J., GUNAWARDENA, R., KWON, C. S., RAHBARI-OSKOU, F. & WONG, C. 2003b. Volatile markers of breast cancer in the breath. *The breast journal*, 9, 184-91.
- PHILLIPS, M., GLEESON, K., HUGHES, J. M., GREENBERG, J., CATANEO, R. N., BAKER, L. & MCVAY, W. P. 1999a. Volatile organic compounds in breath as markers of lung cancer: a cross-sectional study. *Lancet*, 353, 1930-3.
- PHILLIPS, M., HERRERA, J., KRISHNAN, S., ZAIN, M., GREENBERG, J. & CATANEO, R. N. 1999b. Variation in volatile organic compounds in the breath of normal humans. *Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications*, 729, 75-88.
- PHILLIPS, M., SABAS, M. & GREENBERG, J. 1993. Increased pentane and carbon disulfide in the breath of patients with schizophrenia. *Journal of clinical pathology*, 46, 861-4.
- PLEIL, J. D. & LINDSTROM, A. B. 1997. Exhaled human breath measurement method for assessing exposure to halogenated volatile organic compounds. *Clinical chemistry*, 43, 723-30.
- QUERALTO, N., BERLINER, A. N., GOLDSMITH, B., MARTINO, R., RHODES, P. & LIM, S. H. 2014. Detecting cancer by breath volatile organic compound analysis: a review of array-based sensors. *Journal of breath research*, 8, 027112.
- REICHART, P. A., PHILIPSEN, H. P. & SCIUBBA, J. J. 2006. Die neue WHO-Klassifikation der Tumoren des Kopfes und des Halses. *Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie*, 10, 1-2.
- RIDGE, J. A. 2010. We show pictures, they show curves. *Archives of otolaryngology--head & neck surgery*, 136, 1170-5.
- RIELY, C. A., COHEN, G. & LIEBERMAN, M. 1974. Ethane evolution: a new index of lipid peroxidation. *Science*, 183, 208-10.
- RKI. 2015. *Krebs in Deutschland 2011/2012* [Online]. Robert Koch-Institut. [Accessed].
- SCHMIDT, K. & PODMORE, I. 2015. Current Challenges in Volatile Organic Compounds Analysis as Potential Biomarkers of Cancer. *Journal of biomarkers*, 2015, 981458.
- SCHMUTZHARD, J., RIEDER, J., DEIBL, M., SCHWENTNER, I. M., SCHMID, S., LIRK, P., ABRAHAM, I. & GUNKEL, A. R. 2008. Pilot study: volatile organic compounds as a diagnostic marker for head and neck tumors. *Head & neck*, 30, 743-9.
- SCHUBERT, J. K., MULLER, W. P., BENZING, A. & GEIGER, K. 1998. Application of a new method for analysis of exhaled gas in critically ill patients. *Intensive care medicine*, 24, 415-21.
- SCULLY, C. & BEDI, R. 2000. Ethnicity and oral cancer. *Lancet Oncol*, 1, 37-42.
- SOBIN, L. H. & WITTEKIND, C. 2002. *TNM classification of malignant tumours*, New York ; [Chichester], Wiley-Liss.
- TALAMINI, R., BOSETTI, C., LA VECCHIA, C., DAL MASO, L., LEVI, F., BIDOLI, E., NEGRI, E., PASCHE, C., VACCARELLA, S., BARZAN, L. & FRANCESCHI, S. 2002a. Combined effect of tobacco and alcohol on laryngeal cancer risk: a case-control study. *Cancer causes & control : CCC*, 13, 957-64.
- TALAMINI, R., BOSETTI, C., LA VECCHIA, C., DAL MASO, L., LEVI, F., BIDOLI, E., NEGRI, E., PASCHE, C., VACCARELLA, S., BARZAN, L. & FRANCESCHI, S. 2002b. Combined effect of tobacco and alcohol on laryngeal cancer risk: a case-control study. *Cancer Causes Control*, 13, 957-64.
- THACKER, K. K., KASTE, L. M., HOMSI, K. D. & LEHEW, C. W. 2016. An assessment of oral cancer curricula in dental hygiene programmes: implications for cancer control. *Int J Dent Hyg*, 14, 307-313.

- TIKKA, T., PRACY, P. & PALERI, V. 2016. Refining the head and neck cancer referral guidelines: a two centre analysis of 4715 referrals. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 54, 141-50.
- WOLFF, K. D., FOLLMANN, M. & NAST, A. 2012. The diagnosis and treatment of oral cavity cancer. *Dtsch Arztebl Int*, 109, 829-35.
- WOOLGAR, J. A. 1996. Carcinoma of the tongue: pathological considerations in management of the neck. *J R Soc Med*, 89, 611-5.
- WOOLGAR, J. A., ROGERS, S., WEST, C. R., ERRINGTON, R. D., BROWN, J. S. & VAUGHAN, E. D. 1999. Survival and patterns of recurrence in 200 oral cancer patients treated by radical surgery and neck dissection. *Oral Oncol*, 35, 257-65.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Dorothee Pfitzner, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Pilotstudie zur Evaluierung und Implementierung eines Atemtests zur Früherkennung von Plattenepithelkarzinomen in der Mundhöhle“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an erfolgter Publikation

Frau Dorothee Pfitzner hatte folgenden Anteil an der Publikation:

Hartwig S, Raguse JD, **Pfitzner D**, Preissner R, Paris S, Preissner S.
Volatile Organic Compounds in the Breath of Oral Squamous Cell Carcinoma Patients: A Pilot Study.
Otolaryngol Head Neck Surg. 2017 Dec;157(6):981-987. doi: 10.1177/0194599817711411.
PMID: 28585450, Impact-Faktor: 2,444

Beitrag im Einzelnen:

- Umfassende Einarbeitung in den Stand der Literatur hinsichtlich Atemgasanalyse, sowie Diagnostik und Therapie von Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle
- Einarbeitung in die Untersuchungsmethoden im Labor, im Speziellen Gaschromatographie und Massenspektrometrie
- Mitarbeit beim Aufbau des Studiendesigns, dabei vor allem
 - o Durchführung zahlreicher Vorversuche zur Versuchsdurchführung
 - o umfangreiche Vorversuche zur Ermöglichung der Standardisierung der Beprobung und der Überführung auf Tenax
- Mitarbeit bei der Erstellung der Atemgas-Protokolle
- Mitarbeit bei der Durchführung der Atemtests an Patienten und Probanden
- Mitarbeit bei der Auswertung der Ergebnisse und Aufarbeitung der Daten
- Kontrolle des Manuskripts

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Komplette Publikationsliste

Publikation

Hartwig S, Raguse JD, Pfitzner D, Preissner R, Paris S, Preissner S.
Volatile Organic Compounds in the Breath of Oral Squamous Cell Carcinoma Patients: A Pilot Study.
Otolaryngol Head Neck Surg. 2017 Dec;157(6):981-987. doi: 10.1177/0194599817711411.
PMID: 28585450, Impact-Faktor: 2,444

Kongressbeitrag

Hartwig S, Raguse JD, Pfitzner D, Preissner R, Paris S, Heiland M, Preissner S.
Der Atemtest als Tumorscreening. Ergebnisse einer Pilotstudie zur VOC-Detektion.
Poster Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie (DGMKG)
2018 in Dresden

Danksagung

"Auf strenges Ordnen, raschen Fleiß // Erfolgt der allerschönste Preis; // Dass sich das Werk vollende, // Genügt ein Geist für tausend Hände." - Faust II, Vers 11507 ff. / Faust.

Und dass das Werk sein Ende fand, dafür gilt Frau PD Dr. Saskia Preißner der größte Dank. Ihre Engels Geduld mit mir als Schülerin, Ihre offene und ehrliche Kritik haben mir den Weg geebnet, an das Ende dieser Promotionschrift zu glauben.

Ohne ihre wertvolle und schöpferische Ideengebung, die mir den Zugang in das wissenschaftliche Arbeiten und in die Thematik möglich gemacht haben, möchte ich mich in aller Aufrichtigkeit und mit dem größtmöglichen Respekt bedanken. Mit ihrer Leidenschaft zur Wissenschaft steckt sie Ihre Umwelt an und schafft Begeisterung für jene Praktiker, die einst immun für Theorie der Lehre erschienen. Ihr Durchhaltevermögen, Ihre integre Kollegialität waren mir stets die Quelle der Inspiration und Motivation. Ohne Ihren technischen Support im IT-Bereich hätte sich meine Lebensdauer wohl deutlich verkürzt, auch dafür meinen herzlichen Dank liebe Doktormutter.

Ich möchte mich auch ganz aufrichtig bei meinem Zweitbetreuer PD Dr. Stefan Hartwig bedanken, der mich in der Akquise, Vorbereitung und Durchführung des experimentellen Teils tatkräftig und bedingungslos unterstützt hat, vielen Dank!

Ein ganz besonderes Dankeschön gilt meinem Ehemann, der mir immer wieder Selbstvertrauen, Willenskraft und Zuversicht geschenkt hat. Er wurde nie müde mir zu sagen, wie stolz er auf mich ist, dass ich das Projekt Dissertation abschließe. Lieber John, dein Seelenbalsam war für mich das wichtigste Zugpferd die Arbeit weiterzuführen und abzuschließen, vielen Dank.

Ein großer Dank gilt meinen Eltern, die immer an mich geglaubt haben und mich auf allen Wegen begleitet und unterstützt haben.

Ich danke meinen Geschwistern und meiner Schwiegerfamilie für Ihre moralische Unterstützung und Motivation. Ein riesengroßes Dankeschön geht an meiner Schwester Ute und ihrer Familie für die Rückendeckung, für ihre Zeit und Geduld, die mir besonders in den zeitintensiven Phasen so viel zusätzliche Energie und Qualität geschenkt hat.