

Aus der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Analyse von volatilen organischen Verbindungen im menschlichen
Atem zur Diagnostik von oralen Plattenepithelkarzinomen –
Möglichkeiten und Grenzen

Analysis of volatile organic compounds in human breath for the
diagnosis of oral squamous cell carcinoma – possibilities and
limitations

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Sophia Mentel

Datum der Promotion: 03.03.2023

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis.....	3
Abbildungsverzeichnis.....	5
Abkürzungsverzeichnis	6
Zusammenfassung.....	7
1. Einleitung.....	10
1.1 Orales Plattenepithelkarzinom	10
1.2 Entwicklung der Atemgasanalyse	10
1.3 Stand der Forschung.....	12
1.4 Ziel der Arbeit	13
2. Material und Methoden.....	15
2.1 Studiendesign	15
2.2 Gaschromatographie – Ionenmobilitätsspektrometrie (GC-IMS).....	16
3. Ergebnisse	22
3.1 Studienteilnehmende	22
3.2 Datensortierung und Markierung der Areas.....	25
3.3 Datenanalyse	28
3.3.1 Vergleich der Daten Patientengruppe präoperativ und Kontrollgruppe.....	28
3.3.2 Vergleich der Daten Patientengruppe prä- und postoperativ	33
3.4 Machine Learning	41
4. Diskussion	42
4.1 Zusammenfassung und Interpretation der Ergebnisse.....	42
4.2 Bewertung der Ergebnisse.....	43
4.3 Bewertung der Methode und Limitationen der Studie.....	45
4.4. Weiterführende Fragestellungen	46
4.5 Klinische Anwendung der Ergebnisse	47

5. Schlussfolgerungen	48
Literaturverzeichnis	49
Anhang	54
Eidesstattliche Versicherung	56
Anteilerklärung an der erfolgten Publikation.....	57
Auszug aus der Journal Summary List	58
Druckexemplar der ausgewählten Publikation.....	60
Lebenslauf.....	72
Komplette Publikationsliste	73
Danksagung	74

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Probanden der Patientengruppe (n=35).....	22
Tabelle 2: Probanden aus der Patientengruppe mit postoperativer Messung (n=22).....	22
Tabelle 3: Ausdehnung des Primärtumors bei den Probanden der Patientengruppe mit präoperativer Messung (n=35), T nach TNM-Klassifikation (9).....	23
Tabelle 4: Lokalisation des Primärtumors bei den Probanden der Patientengruppe mit präoperativer Messung (n=35), Lokalisation nach ICD-10 (50).....	23
Tabelle 5: Ausdehnung des Primärtumors bei den Probanden der Patientengruppe mit prä- und postoperativer Messung (n=22), T nach TNM-Klassifikation (9)	23
Tabelle 6: Lokalisation des Primärtumors bei den Probanden der Patientengruppe mit prä- und postoperativer Messung (n=22), Lokalisation nach ICD-10 (50)	24
Tabelle 7: Durchgeführte Therapie bei den Patienten mit postoperativer Messung (n=22)	24
Tabelle 8: Anzahl manuell markierter Areas	27
Tabelle 9: Auswertung von sieben manuell markierten Areas im Vergleich der präoperativen Daten der Patientengruppe und der Kontrollgruppe, positiver Driftmodus	30
Tabelle 10: Abgleich von Area 50, 52, 58, 74, 86 und 115 mit der Raumluft (nur bei Nachweis).....	31
Tabelle 11: Auswertung von drei manuell markierten Areas im Vergleich der präoperativen Daten der Patientengruppe und der Kontrollgruppe, negativer Driftmodus	32
Tabelle 12: Abgleich von Area 6, 14 und 19 mit der Raumluft (nur bei Nachweis)	33
Tabelle 13: Auswertung von neun manuell markierten Areas nach Tumorresektion im Vergleich der Patientengruppe prä- und postoperativ, positiver Driftmodus	35
Tabelle 14: Abgleich von Area 41, 52 und 115 mit der Raumluft (nur bei Nachweis)	36
Tabelle 15: Auswertung der Quantifizierung von sechs manuell markierten Areas im Vergleich der Patientengruppe prä- und postoperativ und Raumluftabgleich, positiver Driftmodus	38
Tabelle 16: Auswertung von drei manuell markierten Areas nach Tumorresektion im Vergleich der Patientengruppe prä- und postoperativ, negativer Driftmodus	40
Tabelle 17: Abgleich von Area 6, 14 und 19 mit der Raumluft (nur bei Nachweis)	40
Tabelle 18: Ergebnisse Machine Learning.....	41
Tabelle 19: Auswertung <i>Gallery Plot</i> Plug-in-Modul der Daten, positiver Driftmodus.....	54

Tabelle 20: Auswertung *Gallery Plot* Plug-in-Modul der Daten Patientengruppe präoperativ und Kontrollgruppe, negativer Driftmodus 54

Tabelle 21: Auswertung *Gallery Plot* Plug-in-Modul der Daten Patientengruppe prä- und postoperativ, positiver Driftmodus..... 55

Tabelle 22: Auswertung *Gallery Plot* Plug-in-Modul der Daten Patientengruppe prä- und postoperativ, negativer Driftmodus..... 55

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Aufbaus vom BreathSpec®.....	17
Abbildung 2: Chromatogramme von Pat. 1 (links: präoperativ, rechts: postoperativ), gemessen im positiven Driftmodus (Nummerierung entsprechend Table 1 (49)). Die x-Achse gibt die IMS-Driftzeit in <i>ms</i> , die y-Achse die Zeit des GC-Messdurchlaufs in <i>sec</i> und die z-Achse die Intensität des Substanzsignals in <i>V</i> an.....	26
Abbildung 3: Chromatogramme von Patient 11 präoperativ (Nummerierung entsprechend Table 1 (49)) (oben) und einer Kontrollgruppenmessung (unten) im positiven Driftmodus mit den sieben Areas 16, 50, 52, 58, 74, 86, 115 der detaillierten Analyse, entsprechend den Kriterien ausgewählt. Die x-Achse gibt die IMS-Driftzeit in <i>ms</i> , die y-Achse die Zeit des GC-Messdurchlaufs in <i>sec</i> und die z-Achse die Intensität des Substanzsignals in <i>V</i> an	29
Abbildung 4: <i>Gallery Plot</i> Plug-in-Modul von den Areas 14, 6, 19 aus dem Vergleich der Patientengruppe präoperativ (Patient 32, 22, 21, 20, 31, 19, 18, 16, 15, 11(49)) und der Kontrollgruppe mit entsprechender Raumluft, negativer Driftmodus	32
Abbildung 5: Chromatogramme von Patient 11 (Nummerierung entsprechend Table 1 (49)) (oben: präoperativ, unten: postoperativ) im positiven Driftmodus mit den neun Areas 1, 16, 36, 41, 52, 58, 86, 115, 119 der detaillierten Analyse, entsprechend den Kriterien ausgewählt. Die x-Achse gibt die IMS-Driftzeit in <i>ms</i> , die y-Achse die Zeit des GC-Messdurchlaufs in <i>sec</i> und die z-Achse die Intensität des Substanzsignals in <i>V</i> an.....	34
Abbildung 6: Reporter Plug-in-Modul bei 5 Probanden (Patient 1,5,6,13,9(49)) mit Markierung der analysierten sechs Areas (Nummerierung der Areas entsprechend Legende rechts) zur Suche nach Mustern in ihrer Veränderung zwischen prä- und postoperativer Messung, positiver Driftmodus. Die x-Achse gibt die Driftzeit/ <i>ms</i> , die y-Achse die Zeit des GC-Messdurchlaufs/ <i>sec[μmin]</i> und die z-Achse die Intensität des Substanzsignals in <i>V</i> an	37
Abbildung 7: Chromatogramme von Patient 11 (Nummerierung entsprechend Table 1 (49)) (oben: präoperativ, unten: postoperativ) im negativen Driftmodus mit den drei Areas 6, 14, 19 der detaillierten Analyse, entsprechend den Kriterien ausgewählt. Die x-Achse gibt die IMS-Driftzeit in <i>ms</i> , die y-Achse die Zeit des GC-Messdurchlaufs in <i>sec</i> und die z-Achse die Intensität des Substanzsignals in <i>V</i> an.....	39

Abkürzungsverzeichnis

GC-IMS	<i>Gaschromatographie gekoppelt mit Ionenmobilitätsspektrometrie</i>
GS-MS.....	<i>Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie</i>
PECA.....	<i>Plattenepithelkarzinom</i>
VOCs.....	<i>volatile organic compounds</i>
HNC	<i>head and neck cancer</i>
HNSCC.....	<i>head and neck squamous cell carcinoma</i>

Zusammenfassung

Deutsche Version

Hintergrund

Jährlich erkranken in Deutschland rund 13.900 Menschen an einem Karzinom des Mund- und Rachenraums. Die Diagnose erfolgt häufig erst in einem fortgeschrittenen Stadium der Krankheit, was zu einer Verschlechterung der Prognose führt. Die Atemgasanalyse könnte in der Zukunft eine vielversprechende Möglichkeit der Erkennung verschiedener pathologischer Veränderungen darstellen, weshalb bereits vielfältig für unterschiedliche Erkrankungen geforscht wird. Ziel dieser Arbeit war die Detektion eines tumorspezifischen Musters von volatilen organischen Verbindungen (englisch.: volatile organic compounds, kurz: VOCs) des menschlichen Atems bei Patienten mit einem oralen Plattenepithelkarzinom (PECA).

Methode

Die Atemluft von 35 Patienten mit histologisch gesichertem oralem PECA wurde mit der Atemluft einer gesunden Kontrollgruppe (n=50) mittels Gaschromatographie-Ionenmobilitätsspektrometrie verglichen. Anschließend ist bei 22 der 35 Patienten mit oralem PECA eine zweite Messung nach Resektion des Tumors durchgeführt und mit der ersten präoperativen Messung gegenübergestellt worden. In den generierten Chromatogrammen wurden die Gruppen anhand von manuell markierten Areas, die VOCs charakterisieren, auf Unterschiede geprüft. Zusätzlich wurden die Daten mithilfe eines Machine Learning Ansatzes automatisiert untersucht.

Ergebnisse

Eine Area, die bei 46 % der Patienten mit oralem PECA und lediglich in 9 % der Kontrollgruppe ($p < 0,001$) nachgewiesen wurde, ist postoperativ bei 10 von 14 Patienten nicht mehr detektierbar. Es konnte ein Unterschied zwischen den Areas von erkrankten und gesunden Teilnehmenden gezeigt werden. Zwischen erster und zweiter Messung der Patientengruppe lässt sich ein wiederkehrendes postoperatives Muster der Areas erkennen.

Die mittels Machine Learning erstellten Modelle konnten mit einer durchschnittlichen Genauigkeit von bis zu 85 % bzw. 74 % zwischen den Patienten mit oralem PECA und der Kontrollgruppe bzw. zwischen der ersten und zweiten Messung der Patientengruppe differenzieren.

Schlussfolgerung

Die Atemgasanalyse stellt eine Möglichkeit der schnellen und nicht-invasiven Diagnosemethode verschiedener Erkrankungen dar. Die Beeinflussung der Atemluft durch exogene Faktoren muss mittels eines standardisierten Probenprotokolls so gering wie möglich gehalten werden. Die Überprüfung der gefundenen VOCs und VOC-Muster und ihre Assoziation mit dem oralen PECA durch weiterführende Studien ist notwendig, um die Daten zu validieren und eine größere klinische Anwendung zu ermöglichen.

Abstract

Background

Every year, around 13,900 people in Germany suffer from head and neck cancer. Due to a late diagnosis, the tumour is often in an advanced stage which leads to a worsening of the prognosis. Breath analysis represents a promising possibility for early detection of different pathogenic changes, as it has already been researched for various diseases. In this study the volatile organic compounds (VOCs) in human breath are investigated for disease-specific changes in patients with an oral squamous cell carcinoma (OSCC).

Methods

Breath samples of 35 patients with histologically confirmed OSCC were compared with breath samples of healthy control group participants (n=50) using gas chromatography-ion mobility spectrometry. Also, in 22 of the 35 patients with OSCC, a second measurement was performed after curative surgery and compared with the first measurement of the patient. In the generated chromatograms, the groups were checked for differences using manually marked areas that characterize VOCs. In addition, the data was automatically examined using a machine learning approach.

Results

An area was detected in 46 % of all patients with OSCC and only in 9 % of the control group ($p < 0,001$), which was not detectable postoperatively in 10 out of 14 patients. A difference between the areas of sick and healthy participants could be shown. Between first and second measurement of the patients, a postoperative pattern of areas has been identified.

The models created using machine learning were able to differentiate with an average accuracy of up to 85 % and 74 % respectively between the patients with OSCC and the control group or between the first and second measurements of the patient group.

Conclusion

Breath analysis represents a promising approach on a fast and non-invasive method for the diagnosis of various diseases. The influence of exogenous factors on breathing air must be kept as low as possible using a standardised sample protocol. It is necessary to verify the VOCs and VOC patterns found and their association with OSCC by further studies, validating the data and enabling a greater clinical application.

1. Einleitung

1.1 Orales Plattenepithelkarzinom

Die bösartigen Neubildungen der Lippe, Mundhöhle und des Pharynx (ICD-10 C00-C14) standen in Deutschland im Jahr 2016 an 7. Stelle der Krebsneuerkrankungen bei Männern, bei Frauen an 15. Stelle (1). In 87 % der Fälle handelt es sich hierbei histologisch um ein Plattenepithelkarzinomen (PECA). Insgesamt erkranken Männer häufiger und auch drei Jahre früher als Frauen (Männer im Mittel mit 63 Jahren, Frauen mit 66 Jahren). Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt für Frauen bei 63 %, für Männer bei 47 %. Mitverantwortlich für diesen Unterschied ist, dass bei jeder vierten bis fünften Frau der Tumor in einem frühen Stadium erkannt wird (UICC-Stadium: 0/I), bei Männern ist dies nur bei jeder siebten Erkrankung der Fall (1). Die Prognose bei Erstdiagnose ist maßgeblich vom Stadium des Tumors zu diesem Zeitpunkt abhängig (2-4). Als Hauptrisikofaktoren für die Entstehung eines oralen PECA sind Tabak- und Alkoholkonsum bekannt (5). Eine Vielzahl anderer Risikofaktoren wie chronische Viruserkrankungen, z.B. oropharyngeale HPV-Infektionen und HIV-Infektionen, Immunsuppression und sozioökonomischer Status sind bereits identifiziert (6). Zur Diagnostik von verdächtigen Veränderungen werden bildgebende Verfahren durchgeführt, sowie Biopsien entnommen und pathohistologisch untersucht (7). Eine Möglichkeit der rein nicht-invasiven Untersuchung existiert nicht (8). Nach gesicherter Diagnose gibt es verschiedene Möglichkeiten der Therapie, entsprechend der S3-Leitlinie: neben einer alleinigen chirurgischen Therapie oder alleinigen Strahlentherapie kann auch eine Strahlentherapie mit einer Chemotherapie kombiniert oder eine Verbindung von chirurgischer Therapie mit Strahlen- und Chemotherapie gewählt werden (9). Durch die Entfernung des Primärtumors entstehende Defekte und Funktionseinschränkungen werden mittels rekonstruktiver Maßnahmen versorgt.

1.2 Entwicklung der Atemgasanalyse

Unterschiede in der Atemluft von Menschen mit verschiedenen Krankheitsbildern wurden schon von Hippokrates (4.-5. Jh. v. Chr.) beschrieben. Die „moderne“ Atemgasforschung beginnt allerdings erst Ende des 18. Jahrhunderts. Zunächst wurde Kohlenstoffdioxid als Bestandteil der Atemluft beschrieben. Im 19. Jahrhundert konnte Aceton im Atem und Urin des Menschen nachgewiesen werden (10). Heutzutage ist bekannt, dass die Expirationsluft aus eingeatmetem Stickstoff (79 %), Sauerstoff (15 %), Kohlenstoffdioxid (< 5 %), Argon (< 1 %) und Wasser besteht. Weniger als ein Prozent des menschlichen Atems stellen volatile organische Verbindungen (englisch: *volatile organic compounds*, VOCs) dar, welche

organische Moleküle sind, die sich bei Umgebungstemperatur in gasförmigem Zustand befinden (11). Im Jahre 1971 war es Pauling et al mit der Gaschromatographie (GC) möglich mehr als 250 verschiedene VOCs im menschlichen Atem zu beschreiben (12). 1999 konnte Phillips et al mittels GC gekoppelt mit Massenspektrometrie (GC-MS) über 3.000 unterschiedliche VOCs in der Atemluft von 50 Probanden detektieren, wobei eine große interindividuelle Varianz festgestellt wurde (13).

Die medizinische Forschung hat ein vermehrtes Interesse daran entwickelt, anhand von Atemgasanalysen spezifische pathologische Veränderungen diagnostizieren zu können. Besonders zur Detektion von Atemwegserkrankungen wie Lungenkarzinom, Asthma bronchiale oder chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (14), aber auch beim Mammakarzinom (15, 16) und gastrointestinalen Karzinomen (17) konnten bisher vielversprechende Ergebnisse veröffentlicht werden. Noch handelt es sich nicht um eine flächendeckend klinisch anwendbare Methode, aber mit der Atemgasanalyse besteht der Wunsch nach einer nicht-invasiven, einfach durchführbaren Diagnostik zur Früherkennung und Verlaufskontrolle von Pathologien im menschlichen Körper (18). Dabei beruhen sämtliche Forschungshypothesen auf der Annahme, dass sich die endogenen VOCs erkrankter Individuen von denen gesunder Individuen in Vorkommen, Intensitäten oder Mustern unterscheiden (19). VOCs entstehen bei allen Stoffwechselprozessen im Körper. Sie werden vom Gewebe über das Blut zu den Alveolen transportiert und durch den dortigen Gasaustausch mittels Diffusion an die Expirationsluft abgegeben (20). Die Zusammensetzung der VOCs in der Atemluft kann durch externe Faktoren beeinflusst werden, wie Umgebungsluft (19), Medikamente (21) und konsumierte Lebens- und Genussmittel (22), aber auch von krankheits- oder entzündungsbedingten Veränderungen der körpereigenen Stoffwechselprozesse (23, 24). Es wird vermutet, dass aufgrund der veränderten Stoffwechselprozesse von Krebszellen Unterschiede in den VOCs der Atemluft entstehen (25). Auch im Rahmen von lokalen oder systemischen Infektionen zeigen sich assoziierte VOCs: Bakterien, Pilze und Parasiten besitzen einen eigenen Stoffwechsel, der spezifische VOCs produziert (20). Der Harnstoff-Atemtest existiert bereits zur Detektion einer Helicobacter-pylori-Infektion und wird klinisch angewendet (26). Als Analysemethoden werden in der Atemgasforschung unterschiedliche Techniken genutzt, am häufigsten findet jedoch die GS-MS in unterschiedlichen Kombinationen mit anderen Verfahren Anwendung (15).

1.3 Stand der Forschung

Auch Veränderungen der Atemluft in Assoziation mit einem Karzinom des Mund- und Rachenraums werden seit mehr als einem Jahrzehnt erforscht. Hierbei ist zu beachten, dass je nach Studie die Pathohistologie und Lokalisation der untersuchten Karzinome variiert. In der englischsprachigen Wissenschaft wird häufig von *head and neck cancer* (HNC) gesprochen, womit sämtliche maligne Neoplasien, unabhängig von der Pathohistologie, von Lippe, Mundhöhle, Larynx, Pharynx, Speicheldrüsen, Nase und Nasennebenhöhlen und der Gesichtshaut zusammengefasst werden (27). Außerdem unterscheiden sich Studiendesign und Analysetechniken. Die 2017 veröffentlichte Pilotstudie, welche dieser Studie vorausgegangen ist, arbeitete mit einem sehr ähnlichen Design (28). Die Atemluftproben von zehn Patienten mit oralem PECA wurden sowohl mit vier gesunden Kontrollgruppen-Teilnehmenden verglichen als auch mittels zweiter Messung nach kurativer chirurgischer Therapie auf mögliche Veränderungen durch die Entfernung des Tumors untersucht. Mittels GC-MS konnten acht Substanzen in Assoziation mit dem oralen PECA gebracht werden, von denen drei postoperativ nicht mehr nachweisbar waren. Ein anderes Design ist bei einer im Jahr 2008 publizierten Studie gewählt worden, in der die Atemluft von 22 Patienten mit einem PECA des Mund- und Rachenraums (HNSCC) mit drei Kontrollgruppen (gesunde Probanden, Probanden mit hohem Risikoprofil für pathogene orale Veränderungen und Probanden, die sich in mindestens sechsmonatiger Remission nach operativer Therapie befanden) verglichen wurde (29). Mit der Proton-Transfer-Reaktions-Massenspektrometrie (PTR-MS) konnte eine statistisch signifikante Differenz zwischen den Substanzen im Atem der Patienten mit HNSCC und den drei Kontrollgruppen gezeigt werden. 2011 wurden Daten einer Studie veröffentlicht, bei der die Atemluft von 22 Patienten mit HNC (ohne histologische Differenzierung), 25 Lungenkrebspatienten und 40 Kontrollgruppenteilnehmenden mittels *NA-NOSE* (*Nanoscale Artificial Nose*), einem künstlichen Riechsystem, basierend auf einer Reihe von hochreaktiven Gassensoren, und GC-MS untersucht worden ist (30). Auch hier zeigte sich, dass die *NA-NOSE* eindeutig zwischen den drei Gruppen unterscheiden konnte und mit GC-MS eine statistisch signifikante Differenz in der Zusammensetzung der Atemluft der Gruppen detektiert worden ist. Ebenfalls in einer dualen Analyse wurde 2014 die Atemluft von 22 Patienten mit einem HNSCC, 21 Patienten mit einem benignen Tumor des Larynx oder Pharynx und 19 gesunden Kontrollgruppenteilnehmenden beurteilt (31). Dabei ist sowohl mit GC-MS als auch mit auf Nanomaterial basierten Sensoren untersucht worden. Mittels GC-MS konnten drei Substanzen als potenzielle Marker für HNSCC ermittelt und anhand der Analyse der Sensorenmessungen erneut klar zwischen den HNSCC Patienten und den anderen beiden Gruppen unterschieden

werden. Eine weitere Analysemethode wurde in der 2017 veröffentlichten Studie zum Vergleich von 26 Probanden mit oralem PECA und 26 gesunden Probanden gewählt: Es fand zunächst mittels Festphasenmikroextraktion (englisch: *solid-phase micro extraction*, SPME) eine Vorkonzentrierung der Atemluft statt, die anschließend mit GC-MS analysiert wurde (32). Hierzu musste bei jedem Probanden eine Probe der Atemluft und der Mundhöhlenluft genommen werden. Die Analyse der Atemluft zeigte neun Substanzen, die in Assoziation mit einem oralen PECA stehen können. Bei der Mundhöhlenluft ließ sich ein möglicher Marker des oralen PECA benennen. Im Jahr 2019 wurde die Atemluft von 23 Patienten mit HNSCC und 21 gesunden Probanden mittels Selected-Ion-Flow-Tube-Massenspektrometrie (englisch: *selected ion flow tube-mass spectrometry*, SIFT-MS) durch ausgewählte Ionenüberwachung von 91 VOCs, die bereits als potenzielle Marker für HNSCC identifiziert worden waren, untersucht (33). Hierbei zeigte eine Substanz eine signifikant höhere Konzentration in der Gruppe der HNSCC Patienten, sodass eine Assoziation mit der malignen Veränderung angenommen wurde. Ebenfalls mit SIFT-MS wurde in der 2020 veröffentlichten Studie gearbeitet, bei der 50 ausgewählte Patienten mit HNC und 50 Kontrollgruppenteilnehmende verglichen wurden (34). Es konnte ein VOC Muster bei den HNC Patienten mit einer Sensitivität von 80 % und Spezifität von 86 % identifiziert werden. Weitere Studien sind ausschließlich mit der Analysemethode der Elektronischen Nase (e-Nose, elektronisches Gerät mit zwölf Metalloxidsensoren) durchgeführt worden, allesamt durch eine Forschungsgruppe in Maastricht geleitet. In der 2013 veröffentlichten Studie konnte durch die e-Nose zwischen 36 HNSCC Patienten und 23 Kontrollgruppenteilnehmenden (teilweise mit benignen Vorerkrankungen) unterschieden werden (Sensitivität: 90 %, Spezifität: 80 %) (35). 2016 wurde mittels e-Nose mit einer Genauigkeit von 93 % zwischen der Atemluft von 52 HNSCC Patienten und 32 Lungenkrebspatienten differenziert (36). Im Jahr 2019 zeigte eine Studie, dass mit der e-Nose in 83 % der Fälle zwischen den Atemproben von 20 Patienten mit einem HNSCC-Rezidiv und 20 sich in Remission von einem vorangegangenen HNSCC befindenden Probanden unterschieden werden konnte (37). In einer weiteren 2020 veröffentlichten Studie, bei der durch eine in der Hand haltbare e-Nose geatmet wurde, erfolgte in 72 % der Fälle eine richtige Differenzierung zwischen 91 Patienten mit HNSCC und 72 gesunden Probanden (38).

1.4 Ziel der Arbeit

Durch weitere Forschung im Bereich der Atemgasanalyse des oralen PECA besteht die Hoffnung, eine Optimierung der Früherkennung und Verlaufskontrolle zu ermöglichen, was sich positiv auf die Prognose der Erkrankung auswirken könnte (39). Das Design dieser Studie unterscheidet sich von sämtlichen in 1.3 beschriebenen Studien. Einzig die vorausgegangene

Pilotstudie untersuchte ebenfalls die Atemluft der Patienten mit oralem PECA nach erfolgter Tumorresektion. Durch diesen longitudinalen Vergleich vor und nach operativer Therapie soll die interindividuelle Varianz der Atemluft einzelner Personen besser berücksichtigt und als potenzieller Bias verhindert werden. Auch ermöglicht es den Rückschluss, dass eine detektierte postoperative Veränderung in direkter Verbindung mit dem oralen PECA stehen könnte. Außerdem wurde bei keiner der bisherigen Studien mit GC gekoppelt mit Ionenmobilitätsspektrometrie (GC-IMS) gearbeitet, was somit die Erprobung einer neuen Analyseverfahren auf diesem Bereich darstellt, bei der keine Vorkonzentrierung nötig ist.

Die zu untersuchenden Hypothesen dieser Studie sind:

1. Es gibt einen Unterschied der VOCs in der Atemluft von Patienten mit oralem PECA und gesunden Probanden in Vorkommen und Konzentration.
2. Es besteht ein Unterschied zwischen den VOCs der Atemluft von Patienten mit oralem PECA vor und nach kurativer chirurgischer Therapie in Vorkommen, Konzentration und Mustern.

2. Material und Methoden

2.1 Studiendesign

Es handelt sich um eine prospektive klinische Studie, mit einer Patientengruppe (n=55) und einer Kontrollgruppe (n=50). Bei der Patientengruppe wurde eine zweite Atemgasmessung nach erfolgter Tumorresektion durchgeführt (n=22).

Patientengruppe

Für die Studie wurden 55 Probanden in der Patientengruppe mit oralem PECA untersucht. Die Untersuchungen fanden im Zeitraum vom 26.09.2019 bis 20.03.2020 im Campus Virchow Klinikum der Charité Universitätsmedizin Berlin statt. Die Ethikkommission der Charité stimmte der Studiendurchführung zu (EA1/203/19). Alle Probanden stellten sich mit Verdacht auf ein orales PECA oder Verdacht auf Rezidiv eines oralen PECAs zur panendoskopischen Untersuchung vor. Die Patientengruppe unterteilt sich in 34 Männer und 21 Frauen. Die Einschlusskriterien für die Studie waren ein histologisch gesichertes PECA im Bereich der Mundhöhle und des Oropharynx, die Fähigkeit (sprachlich, körperlich und geistig) das Wesen der Studie zu verstehen und an dieser teilnehmen zu können, sowie keine weiteren bekannten malignen Erkrankungen. Nach erfolgter Untersuchung wurden 20 Probanden aus der Studie ausgeschlossen, da sich der Verdacht auf ein orales PECA nicht bestätigte oder pathologische Veränderungen anderen Ursprungs detektiert wurden. Es konnten 35 Probanden präoperativ in die Patientengruppe einbezogen werden. Bei 22 Probanden wurde postoperativ eine zweite Atemmessung durchgeführt.

Kontrollgruppe

Für die Probanden der Kontrollgruppe wurden zufällig 50 gesunde Personen ausgewählt, die zum Zeitpunkt der Messung laut Eigenanamnese mindestens eine Zigarette pro Tag rauchten und bei denen keine malignen Erkrankungen bekannt waren. Die Messungen fanden im Zeitraum vom 13.12.2019 bis 10.01.2020 statt.

Aufklärung

Die Probanden beider Gruppen wurden über Voraussetzungen, Ablauf und Ziel der Studie aufgeklärt. Sie wurden gebeten, sechs Stunden vor Probenahme keine Nahrungsmittel, außer Wasser, zu sich zu nehmen, um eine Nüchternheit zu gewährleisten. Außerdem sollten keine Hygieneprodukte, wie z.B. Zahnpasta oder Deodorant verwendet werden. Eine rein mechanische Zahnreinigung kurz vor Probenahme sowie das Ausspülen des Mundes mit Wasser wurden empfohlen.

Probenahme

Die Probenahme erfolgte für beide Gruppen nach gleichem Protokoll. Die Probanden wurden gebeten mit leicht geöffneten Lippen mehrfach locker ein- und auszuatmen, bis sich ein gleichmäßig-langsamere Rhythmus einstellt. Daraufhin wurde mittels Luer Spritzen bei der Expiration 2 x 5 ml Atemluft aufgezogen und die Spritzen mit Stoppfern verschlossen. Um auch sehr flüchtige Verbindungen noch messen zu können, sind zunächst nur die beiden Atemgasproben genommen und analysiert worden, sodass ein Zeitfenster von 20 Minuten zwischen Entnahme und Auswertung nicht überschritten wurde. Erst nach der Analyse der Atemluft wurden 2 x 5 ml der Raumluft im Bereich um den Kopf des Probanden in Luer Spritzen aufgezogen, ebenso mit Stoppfern versiegelt und daraufhin analysiert.

Bei zwei Messungen war eine Analyse innerhalb von 20 Minuten nicht möglich, weshalb die Proben einzeln in ein Mylar® Bag (QuinTron, Milwaukee, WI, USA) mittels Luer-Adapter transferiert, bei Raumtemperatur gelagert und spätestens nach 24 Stunden ausgewertet wurden. In diesem Beutel bleiben die Verbindungen der Luftprobe stabil und sind auch nach Stunden noch detektierbar (40, 41). Anschließend kann die Luft im Beutel erneut über den Luer-Adapter in eine Luer Spritze aufgezogen und analysiert werden.

2.2 Gaschromatographie – Ionenmobilitätsspektrometrie (GC-IMS)

Aufbau BreathSpec®

Zur Analyse der VOCs in den Luftproben wurde der BreathSpec® mit Circular Gas Flow Unit (Version 4G1) (Gas Dortmund, Deutschland) verwendet. Das Gerät arbeitet mit einer zweifachen Separation mittels GC-IMS (Abbildung 1, modifiziert nach BreathSpec® – User Manual (42)).

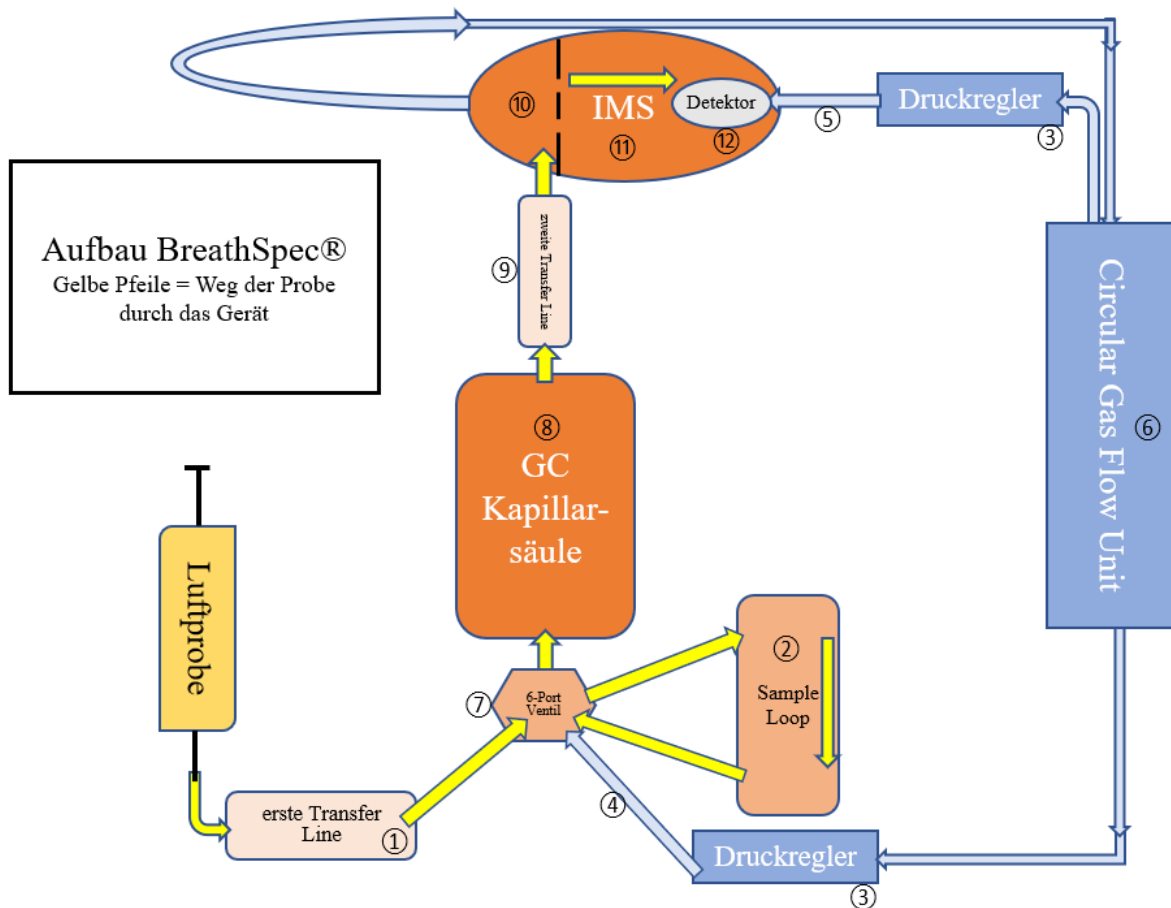


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Aufbaus vom BreathSpec®

Die Luftprobe muss vor der Analyse nicht extern erwärmt oder gefiltert werden und wird mittels der 5 ml Luer-Spritze durch einen Luer-Lock-Adapter direkt in das Gerät appliziert. In der ersten Transfer Line ① findet die Erwärmung (60°C) der Probe und ihre Weiterleitung durch das eingeleitete Trägergas zum Sample Loop ② statt. Hier wird die zu analysierende Luft zunächst für 20 Sekunden mit dem Trägergas umspült, dessen Druck durch einen elektronischen Regler ③ kontrolliert ist. Dieses Gas, als Trägergas ④ und Driftgas ⑤ verwendet, wird gereinigt aus der Circular Gas Flow Einheit ⑥ in den BreathSpec® eingespeist und später wieder in diese zurückgeleitet. Im Sample Loop (40°C) findet die weitere Erwärmung der Probe und anschließend ihr Transport durch das Trägergas über ein 6-Port Ventil ⑦ zur GC Kapillarsäule ⑧ statt. Diese ist auf 60°C erhitzt. Hier erfolgt die erste Separation der VOCs mittels GC, wodurch sie nun zu unterschiedlichen Zeitpunkten über eine zweite Transfer Line ⑨ (60°C) in die IMS-Ionisationskammer ⑩ gelangen. Dort werden die Substanzen durch einen schwachen β -Strahler aus Tritium weich ionisiert. Es findet eine zweite Separation statt, bei der sich die jetzt ionisierten Moleküle in atmosphärischem Druck entsprechend ihrer molekularen Masse und ihrer geometrischen Struktur gegen das eingeleitete

inerte Driftgas bewegen ⑪ und der entstehende Ionenstrom mit einem Elektrometer ⑫ gemessen wird (42).

Gaschromatographie

Die GC dient der Auftrennung von Substanzgemischen in einzelne chemische Verbindungen. Diese erfolgt über die Wechselwirkungen zwischen den flüchtigen Analyten im Trägergas und der stationären Phase in der Trennsäule. Die Wechselwirkungen variieren je nach Substanz und resultieren so in unterschiedlichen Retentionszeiten während der Passage der Trennsäule. Das Trägergas ist hierbei die sog. mobile Phase und dient dem Transport der Analyten durch die Säule. Es können apolare und polare Trennsäulen verwendet werden. Bei apolaren Trennsäulen werden die Analyten gemäß ihrem Siedepunkt getrennt. So werden z.B. flüchtige Substanzen (mit niedrigem Siedepunkt) schnell durch die Säule transportiert, da sie sich die meiste Zeit in der mobilen Phase befinden. Bei Analyten mit sehr ähnlichen Siedepunkten kann dies jedoch zu einer nicht ausreichenden Trennung führen, weshalb stationäre Phasen mit stärkeren polaren Eigenschaften eingesetzt werden. Hier gehen nun polare und leicht polarisierbare Analyten stärkere polare Wechselwirkungen mit der stationären Phase ein und werden damit häufiger retendiert. Es entsteht eine optimierte Auflösung, da eine Auftrennung der Analyten sowohl durch den Siedepunkt als auch die Polarität, erfolgt (43).

Im Falle des BreathSpec® handelt es sich um eine polare Trennsäule. Die Kapillarsäule ist 30 m lang und mit einem 0,5 µm dicken Film aus Polyethylenglycol (stationäre Phase) beschichtet. Im BreathSpec® ist diese erste Separation anhand der unterschiedlichen Siedepunkte und Polaritäten mittels GC erforderlich, um die VOCs dem IMS nacheinander zuzuführen. Dies vermindert den Wettbewerb um die Reaktions-Ionen und erhöht so die Sensitivität der Detektion sowie die Differenzierung der Substanzen durch das IMS (44).

Ionenmobilitätsspektrometrie

Die IMS wird zur Separation und Detektion der verschiedenen gasförmigen Verbindungen in einem Substanzgemisch verwendet. Die Analyse erfolgt anhand der spezifischen Drift-Zeiten, welche die zu bestimmenden ionisierten Verbindungen zum Passieren einer definierten Distanz (Driftröhre) im definierten elektrischen Feld benötigen (45). Die eingeleitete Probe wird durch eine weiche chemische Ionisation mittels Reaktions-Ionen in der Ionisationskammer ionisiert, also in geladene Teilchen überführt. Die Reaktions-Ionen wurden zuvor durch eine Kaskade von Reaktionen der schnellen Elektronen, die von einer strahlungsarmen radioaktiven Quelle emittiert werden, mit dem eingeleiteten inerten Drift-Gas gebildet. Dabei können sowohl positiv als auch negativ geladene Reaktions-Ionen entstehen. Die Gesamtmenge der

bestehenden Ionen wird als Reaktions-Ionen-Peak (RIP) bezeichnet. Durch die chemische Ionisierung von Analyten mittels Reaktions-Ionen kommt es zur Ausbildung von spezifischen Analyt-Ionen, die aufgrund der unterschiedlich geladenen Reaktions-Ionen positiv und negativ geladen sein können. Die Ionen gelangen nun in die Driftröhre, wo sie im elektrischen Feld entgegen dem Driftgas beschleunigt werden (Drift) und sich auf den Detektor, das Elektrometer, zubewegen. Da atmosphärischer Druck herrscht, kommt es je nach Größe und Struktur der Analyt-Ionen unterschiedlich häufig zu Kollisionen mit den Molekülen des Driftgases, wodurch die Analyt-Ionen kurz abgebremst werden. Dies bedeutet, dass auch Isomere voneinander getrennt werden können, da nicht nur ihre Molekülmasse, sondern auch ihre geometrische Struktur die Driftzeit bestimmt (46). So kommt es zur hohen Sensitivität des IMS. Um die positive oder negative Ladung eines Analyt-Ionen ebenfalls detektieren zu können, werden im BreathSpec® zwei separate Messungen durchgeführt, eine im positiven und eine im negativen Driftmodus. Unterschiedliche Substanzen können jeweils mit einem der Driftmodi im elektrischen Feld dargestellt werden.

Durchführung der Probenanalyse

Die mit Probegas gefüllte Spritze kann mittels Luer-Lock-Adapter direkt zur Einspeisung der Probe in den BreathSpec® genutzt werden. Ein Wechsel des Adapters erfolgte nach jedem Probanden, um Kontaminationen zu vermeiden. Das gesamte Probegas wurde mittels Hinabdrückens des Spritzenkolbens innerhalb von fünf Sekunden in das Gerät appliziert. Ein Analysedurchgang dauerte zehn Minuten. Bei jedem Probanden wurde sowohl die Atemluft als auch die Raumluft jeweils einmal im positiven und im negativen Driftmodus analysiert. So sind insgesamt vier Messungen je Proband nötig.

VOCal 0.1.0

Zur Analyse und Beurteilung der Probanddaten wurde die speziell von GAS Dortmund entwickelte Software VOCal 0.1.0 genutzt, wodurch eine Visualisierung und Quantifizierung der Substanzgemische möglich ist. Jede einzelne Messung wird als separates Chromatogramm visualisiert (47). In diesem müssen zur Anwendung der einzelnen Softwaremodule zunächst manuell Evaluationsbereiche gesetzt werden. Diese Bereiche, vom System als Areas bezeichnet, entsprechen Substanzsignalen. Sie sind die Visualisierung der entstehenden Ionen-Peaks beim Auftreffen der Analyten auf das Elektrometer. Die Areas charakterisieren somit die VOCs. Die Daten sind dreidimensional darstellbar. Hierbei gibt die x-Achse die IMS-Driftzeit in *ms*, die y-Achse die Zeit des GC-Messdurchlaufs in *sec* und die z-Achse die Intensität des Substanzsignals in *V* an (48). Letzteres entspricht der Konzentration der Substanz in der

Messung und wird durch den Farbcode abgebildet. Diese Codierung verläuft von dunkelblau nach tiefrot, wobei blau eine geringe Intensität und rot eine starke Intensität visualisiert.

Zur besseren Übersicht können die Daten mit Hilfe von verschiedenen Plug-In-Modulen gegenübergestellt und untersucht werden. Die Analyse der optischen Differenzen zwischen den verschiedenen Messungen wurde in Microsoft Excel (Version 2111) dokumentiert.

Um die Unterschiede zwischen verschiedenen Areas nicht nur optisch zu bewerten, wurden die Daten der Chromatogramme zur Suche nach Mustern im positiven Driftmodus zusätzlich numerisch ausgedrückt. Hierzu wurde die Semi-Quantifizierung des VOCal 0.1.0 genutzt. Die Analyse der Daten wurde ebenfalls in Microsoft Excel (Version 2111) dokumentiert.

Abgleich mit der Raumluft

Um den Ursprung einer Substanz zu ermitteln, wurde, wie von Phillips beschrieben, der sog. Alveolargradient bestimmt (13). Die Intensität einer Substanz in der Raumluft wird von der Intensität derselben Substanz in der Atemprobe subtrahiert. Ist diese Differenz ein positiver Wert, kann von einem endogenen Ursprung der Substanz ausgegangen werden. Man spricht von einem positiven Alveolargradienten. Ergibt sich ein negativer Wert, handelt es sich wahrscheinlich um eine durch die Umgebungsluft aufgenommene Substanz, die nicht durch endogene Prozesse entstanden ist. Übertragen auf die visuelle Auswertung bedeutet dies, dass eine Area in Atemprobe und Raumluftprobe anhand von ihrer Ausdehnung und Farbcodierung (z-Achse) miteinander verglichen wird. Erscheint die Fläche der Area bei der Atemprobe gegenüber der Fläche der Area in der Raumluftprobe vergrößert bzw. ist die Farbcodierung in der Atemprobe intensiver als in der Raumluftprobe, ist ihre Konzentration in der Atemluft gegenüber der Raumluft erhöht, somit liegt ein positiver Alveolargradient vor. Ist die Ausdehnung und Farbcodierung der Fläche einer Area in der Atemluft kleiner bzw. weniger intensiv, handelt es sich um einen negativen Alveolargradienten. Bleibt die Ausdehnung und Farbcodierung der Fläche der Area zwischen der Atem- und Raumluftprobe gleich, ist der Ursprung ungewiss und kein Gradient erkennbar. Es wurde lediglich bei den Messungen der Probanden ein Abgleich mit der Raumluft durchgeführt, bei denen die zu untersuchende Area auch nachgewiesen wurde.

Abgleich mit den Rauchenden

Um sicherzustellen, dass es sich bei den Areas im Vergleich der Daten von Patientengruppe und Kontrollgruppe nicht um mit dem Rauchen assoziierte Substanzen handelte, wurden die Rauchenden aus der Patientengruppe zusätzlich gesondert untersucht. Dabei wurde der

prozentuale Anteil des Vorkommens einer Area in der gesamten Patientengruppe mit dem Vorkommen bei den rauchenden Patienten der Patientengruppe verglichen. Variierte dieser Anteil um weniger als 10%, wurde die Tendenz des Verhältnis Nachweis/kein Nachweis als gleichbleibend angenommen. Somit kann davon ausgegangen werden, dass das Rauchen keinen Einfluss auf das Vorkommen der Area hat.

Statistische Auswertung

Zur statistischen Datenanalyse wurde das Programm SPSS 27.0 (IBM, Armonk, NY, USA) verwendet. Aufgrund der geringen Fallzahl ist von nicht normalverteilten Daten auszugehen, weshalb nicht parametrische Tests angewendet wurden.

Die unabhängigen Stichproben im Vergleich der Patientengruppe präoperativ und der Kontrollgruppe wurde mit dem Chi-Quadrat-Test überprüft. War die erwartete Zellhäufigkeit < 5 wurde der exakte Test nach Fischer genutzt.

Um die Veränderung zwischen prä- und postoperativer Messung der Patientengruppe darstellen zu können, wurden die Differenzen in Abnahme (-), Zunahme (+) und kein Unterschied (=) ausgedrückt und der Vorzeichen-Test für abhängige Stichproben angewendet. Ein zweiseitiger p-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

3.1 Studienteilnehmende

Die Patientengruppe setzt sich aus 35 Patienten mit oralem PECA zusammen (Tabelle 1) (Probandenspezifische Daten: Table 1 (49)).

Tabelle 1: Probanden der Patientengruppe (n=35)

	Männer	Frauen	Alter	Raucher	Nichtraucher	Ehemalige Raucher
Patientengruppe, präoperative Messung	24	11	Ø 67,2 Jahre	21	10	4

Nach erfolgter chirurgischer Therapie wurde bei 22 Patienten der Patientengruppe im Durchschnitt 12,4 Tagen später eine zweite Atemmessung durchgeführt (Tabelle 2).

Tabelle 2: Probanden aus der Patientengruppe mit postoperativer Messung (n=22)

	Männer	Frauen	Alter	Raucher	Nichtraucher	Ehemalige Raucher
Patientengruppe, postoperative Messung	15	7	Ø 68,0 Jahre	13	6	3

Die Befunde und durchgeführten Therapien von den Probanden der Patientengruppe wurden dokumentiert (Tabelle 3-7: T nach TNM-Klassifikation (9), Lokalisation nach ICD-10 (50); Probandenspezifische Daten: Table 1(49)).

Tabelle 3: Ausdehnung des Primärtumors bei den Probanden der Patientengruppe mit präoperativer Messung (n=35), T nach TNM-Klassifikation (9)

	T1	T2	T3	T4
Anzahl	10	4	8	13

Tabelle 4: Lokalisation des Primärtumors bei den Probanden der Patientengruppe mit präoperativer Messung (n=35), Lokalisation nach ICD-10 (50)

ICD-10	C02.0	C02.1	C03.0	C03.1	C04.0
Anzahl	2	7	2	7	4

C04.1	C04.8	C04.9	C05.0	C05.1	C05.8	C06.0
1	3	1	3	1	1	3

Bösartige Neubildungen an: C02.0: Zungenrücken, C02.1: Zungenrand, C03.0: Oberkieferzahnfleisch, C03.1: Unterkieferzahnfleisch, C04.0: vorderer Teil des Mundbodens, C04.1: Seitlicher Teil des Mundbodens, C04.8: Mundboden, mehrere Teilbereiche überlappend, C04.9: Mundboden, nicht näher bezeichnet, C05.0: harter Gaumen, C05.1: weicher Gaumen, C05.8: Gaumen, mehrere Teilbereiche überlappend, C06.0: Wangenschleimhaut

Tabelle 5: Ausdehnung des Primärtumors bei den Probanden der Patientengruppe mit prä- und postoperativer Messung (n=22), T nach TNM-Klassifikation (9)

	T1	T2	T3	T4
Anzahl	8	1	6	7

Tabelle 6: Lokalisation des Primärtumors bei den Probanden der Patientengruppe mit prä- und postoperativer Messung (n=22), Lokalisation nach ICD-10 (50)

ICD-10	C02.1	C03.0	C03.1	C04.0	C04.1
Anzahl	6	2	5	3	1

C04.8	C05.0	C05.1	C05.8	C06.0
1	1	1	1	1

Bösartige Neubildungen an: C02.1: Zungenrand, C03.0: Oberkieferzahnfleisch, C03.1: Unterkieferzahnfleisch, C04.0: vorderer Teil des Mundbodens, C04.1: Seitlicher Teil des Mundbodens, C04.8: Mundboden, mehrere Teilbereiche überlappend, C05.0: harter Gaumen, C05.1: weicher Gaumen, C05.8: Gaumen, mehrere Teilbereiche überlappend, C06.0: Wangenschleimhaut

Es wurden unterschiedliche chirurgische Therapien bei den Probanden der Patientengruppe mit zweiter Messung durchgeführt (Tabelle 7).

Tabelle 7: Durchgeführte Therapie bei den Patienten mit postoperativer Messung (n=22)

Therapie des Tumors	Tumorresektion: 15 Nachresektion: 2 Partielle Resektion (1x Maxilla, 1x Mundboden, 1x Zunge): 3 Hemimaxillarektomie: 2
Therapie der Halslymphknoten	SNL-Biopsie: 7 (1x mit modifizierter radikaler Neck Dissection auf anderer Halsseite) Neck Dissection: 13 selektive Neck Dissection: 2 modifizierte radikale Neck Dissection: 1
Rekonstruktion	Fibula Transplant: 8 Radialis Transplant: 4 Scapula Transplant: 3

Für die Reduzierung der Probandenzahl zur zweiten Messung um 13 Personen gibt es unterschiedliche Gründe (Figure 1(49)).

Die Kontrollgruppe setzt sich aus 25 Männern und 25 Frauen zusammen, mit einem Durchschnittsalter von 55 Jahren.

3.2 Datensortierung und Markierung der Areas

Die Chromatogramme der Messungen (Abbildung 2) wurden in ihre jeweilige Gruppe (Patientengruppe, Kontrollgruppe, Raumluft) und Driftmodus (positiver Driftmodus, negativer Driftmodus) einsortiert und entsprechend den zu untersuchenden Hypothesen in vier Projekten gegenübergestellt.

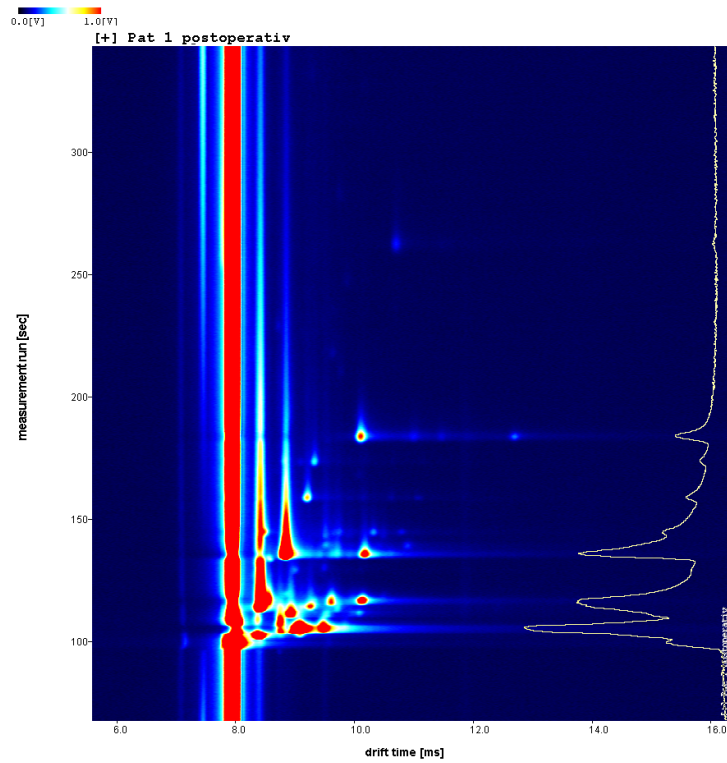
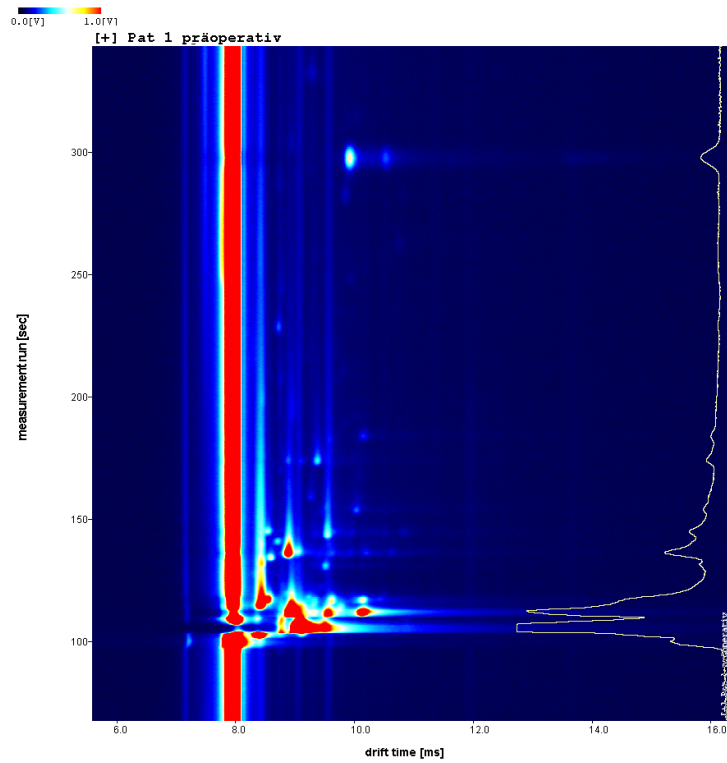


Abbildung 2: Chromatogramme von Pat. 1 (oben: präoperativ, unten: postoperativ), gemessen im positiven Driftmodus (Nummerierung entsprechend Table 1 (49)). Die x-Achse gibt die IMS-Driftzeit in ms , die y-Achse die Zeit des GC-Messdurchlaufs in sec und die z-Achse die Intensität des Substanzsignals in V an

Zur Überprüfung der ersten Hypothese wurden die Daten von Patientengruppe und Kontrollgruppe miteinander verglichen. Für die Untersuchung der zweiten Hypothese wurde der longitudinale Vergleich der Patientengruppe vor und nach chirurgischer Therapie erstellt. In den jeweiligen Projekten entsprechend der Hypothesen wurden die Areas im positiven und negativen Driftmodus manuell gesetzt (Tabelle 8).

Tabelle 8: Anzahl manuell markierter Areas

	Hypothese 1:		Hypothese 2:	
	Patientengruppe präoperativ / Kontrollgruppe		Patientengruppe präoperativ / Patientengruppe postoperativ	
	positiver Drift	negativer Drift	positiver Drift	negativer Drift
Summe der manuell markierten Areas	111	38	156	27

Im positiven Driftmodus wurden mehr Areas detektiert.

3.2.1 Einschlusskriterien detaillierte Auswertung

Die separate Untersuchung der Projekte erfolgte zunächst mit dem *Gallery Plot* Plug-in-Modul. Anhand dieser Übersichtsmethode wurden die Areas auf Unterschiede in Vorkommen, Konzentration und Mustern geprüft. Von Interesse waren Areas, die jeweils nur in einer der beiden verglichenen Gruppen besonders häufig vorkamen bzw. eine wiederkehrende postoperative Veränderung vermuten ließen. Im Vergleich Patientengruppe und Kontrollgruppe wurde im *Gallery Plot* Plug-in-Modul nach Areas gesucht, deren Vorkommen mit einer Differenz von mind. 30% zwischen den Gruppen angenommen werden konnte. Im Vergleich prä- und postoperativer Messungen der Patientengruppe wurde anhand des *Gallery Plot* Plug-in-Moduls nach Messpaaren (prä- und postoperative Messung eines Patienten) gesucht, bei denen sich eine Differenz von mindestens drei Messpaaren zwischen den beiden postoperativen Veränderungen (Reduktion/Anstieg) zeigte. Auch musste die Area in mindestens zehn Messpaaren nachweisbar sein, da eine Tendenz sonst als nicht aussagekräftig bewertet wurde (s. Anhang Tabelle 1-4). Außerdem erfolgte mit Hilfe des *Gallery Plot* Plug-in-Moduls ein Abgleich mit der Raumluft.

Die anhand der Kriterien ermittelten Areas wurden daraufhin Chromatogramm für Chromatogramm detailliert analysiert und ebenso ein Abgleich mit der Raumluftprobe zur Ursprungsbenennung durchgeführt. Aufgrund von Überlagerungen durch sehr dominante Substanzen konnten einzelne Areas nicht in jeder Messung ausgewertet werden. Vermutlich führte eine Verunreinigung des Driftgases zu einer verstärkten visuellen Intensität einzelner Substanzen, wodurch Überlagerungen zustande kamen. Dies betraf die letzten sieben Messungen. Es handelt sich um die postoperativen Messungen von Patient 3, 17, 20 und 22 (Nummerierung entsprechend Table 1 (49)), sowie drei Messungen der Kontrollgruppe im positiven Driftmodus.

3.3 Datenanalyse

3.3.1 Vergleich der Daten Patientengruppe präoperativ und Kontrollgruppe

Positiver Driftmodus

Die Daten des Projekts wurden anhand der markierten Areas im *Gallery Plot* Plug-in-Modul verglichen, wobei fünf Areas den Kriterien entsprechend identifiziert und genauer analysiert werden konnten (s. Anhang, Tabelle 1). Außerdem sind zwei Areas, die im Vergleich prä- und postoperative Messungen eine signifikante postoperative Tendenz zur Reduktion (Area 52) zeigten bzw. die höchste Anzahl postoperativen Signalanstiegs (Area 16) aufwiesen, zur Überprüfung zwischen den Fragestellungen ebenfalls detailliert untersucht worden. Da beide Gruppen eine unterschiedliche Anzahl an Probanden aufwiesen, wurde zur Übersichtlichkeit nicht nur die absolute Anzahl an Messungen mit dem jeweiligen Befund angegeben, sondern auch ihr relative Häufigkeit in der Gruppe in Prozenten vermerkt (Abbildung 3: exemplarische Darstellung der detailliert analysierten Areas am Chromatogramm von Patient 11 präoperativ und eine Kontrollgruppenmessung, positiver Driftmodus) (Tabelle 9).

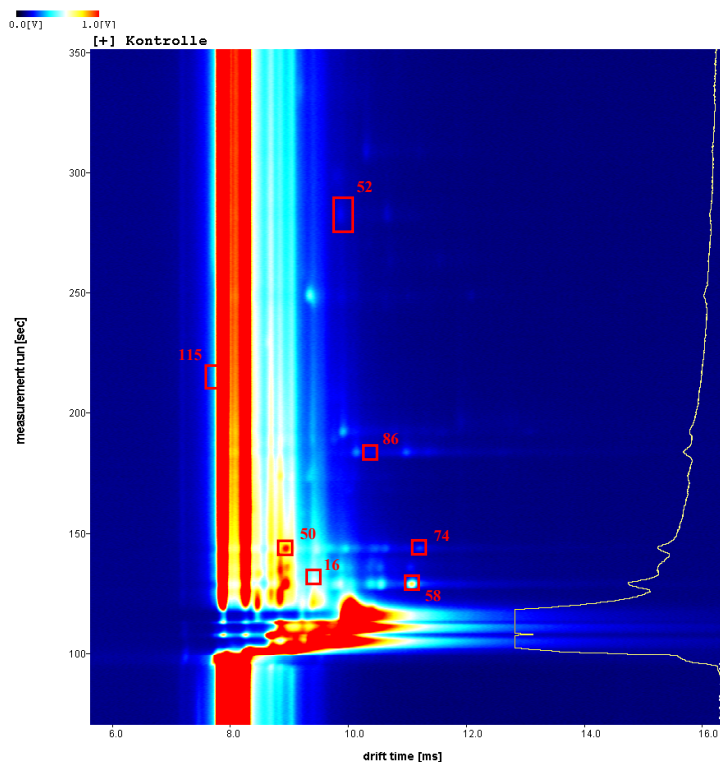
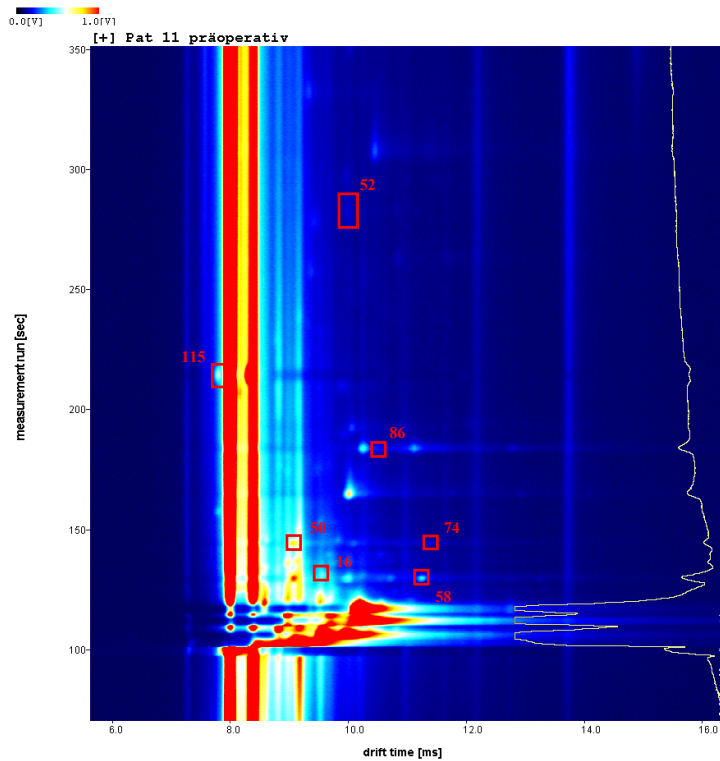


Abbildung 3: Chromatogramme von Patient 11 präoperativ (Nummerierung entsprechend Table 1 (49)) (oben) und einer Kontrollgruppenmessung (unten) im positiven Driftmodus mit den sieben Areas 16, 50, 52, 58, 74, 86, 115 der detaillierten Analyse, entsprechend den Kriterien ausgewählt. Die x-Achse gibt die IMS-Driftzeit in *ms*, die y-Achse die Zeit des GC-Messdurchlaufs in *sec* und die z-Achse die Intensität des Substanzsignals in *V* an

Tabelle 9: Auswertung von sieben manuell markierten Areas im Vergleich der präoperativen Daten der Patientengruppe und der Kontrollgruppe, positiver Driftmodus

Area	16	50	52	58	74	86	115
in Patientengruppe präoperativ (n=35) nachweisbar [in %]	30 [86]	23 [66]	27 [77]	14 [40]	20 [57]	17 [49]	16 [46]
nur rauchende Patienten einbezogen (n=21)	19 [90]	13 [62]	17 [81]	8 [38]	12 [57]	10 [48]	8 [38]
in Patientengruppe präoperativ (n= 35) nicht nachweisbar	5 [14]	12 [34]	8 [23]	21 [60]	15 [43]	18 [51]	19 [54]
nur rauchende Patienten einbezogen (n=21)	2 [10]	8 [38]	4 [19]	13 [62]	9 [43]	11 [52]	13 [62]
in Kontrollgruppe (n=50*) nachweisbar	48 [96]	50 [100]	38 [76]	47 [94]	47 [94]	3 [6]	4* [9]
in Kontrollgruppe (n=50*) nicht nachweisbar	2 [4]	0	12 [24]	3 [6]	3 [6]	47 [94]	43* [91]
p-Wert (Patientengruppe n=35)	0,119 ^a	<0,001 ^a	0,903	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

^a Exakter Test nach Fischer

**Drei Messungen aus der Kontrollgruppe wurden aufgrund von starken Überlagerungen im Bereich der Area 115 nicht in die Auswertung einbezogen. Die Gesamtzahl der Messungen für Area 115 reduziert sich auf 47.*

Während Area 58 bei 94 % der Atemproben der Kontrollgruppe nachgewiesen wurde, ist sie in der Patientengruppe lediglich bei 40 % vorhanden ($p < 0,001$). Auch Area 50 und 74 sind signifikant häufiger in der Kontrollgruppe (100 %; 94 %) als in der Patientengruppe (66 %; 57 %) nachgewiesen worden ($p < 0,001$; $p < 0,001$). Area 86 und 115 wurden bei 49 % bzw. 46 % der Probanden aus der Patientengruppe detektiert, in der Kontrollgruppe nur bei 6 % ($p < 0,001$) bzw. 9 % ($p < 0,001$). Im Gegensatz dazu ist Area 52 sowohl in der Patientengruppe als auch

in der Kontrollgruppe sehr regelmäßig nachgewiesen worden (77 %; 76 %) und zeigt somit keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ($p = 0,903$). Der prozentuale Anteil des Vorkommens der Areas zwischen der gesamten Patientengruppe und den Rauchenden der Patientengruppe variiert um maximal 8 % (Area 115). Die Tendenz des Verhältnisses von Nachweis/kein Nachweis zwischen der gesamten Patientengruppe und den rauchenden Probanden aus der Patientengruppe kann somit bei allen sieben Areas als gleich angenommen werden.

Die fünf Areas mit statistisch signifikanten Unterschieden zwischen den Gruppen, sowie Area 52, die im Vergleich der Patientengruppe prä- und postoperativ eine statistisch signifikante postoperative Tendenz zeigt, wurden auf ihren Ursprung überprüft (Tabelle 10).

Tabelle 10: Abgleich von Area 50, 52, 58, 74, 86 und 115 mit der Raumluft (nur bei Nachweis)

Area	50		52		58		74		86		115	
	PG	KG	PG	KG	PG	KG	PG	KG	PG	KG	PG	KG
Positiver Alveolargradient [in %]	17	41	24	36	7	43	15	24	10	3	10	4
	[74]	[82]	[89]	[95]	[50]	[91]	[75]	[51]	[59]	[100]	[62,5]	[100]
Negativer Alveolargradient	6	8	0	2	2	4	4	19	2	0	3	0
	[26]	[16]		[5]	[14]	[9]	[20]	[40]	[12]		[18,75]	
Kein Gradient erkennbar	0	1	3	0	5	0	1	4	5	0	3	0
		[2]	[11]		[36]		[5]	[9]	[29]		[18,75]	

Patientengruppe = PG, Kontrollgruppe = KG

Bei allen sechs Areas ist zumeist ein positiver Alveolargradient detektiert worden.

Negativer Driftmodus

Im negativen Driftmodus wurde analog vorgegangen und die markierten Areas mittels *Gallery Plot* Plug-in-Modul entsprechend in 3.2.1 genannten der Kriterien untersucht (s. Anhang, Tabelle 2). Die drei identifizierten Areas sind anschließend detailliert analysiert worden (Abbildung 4: exemplarisch an 10 Probanden aus jeder Gruppe) (Tabelle 11).

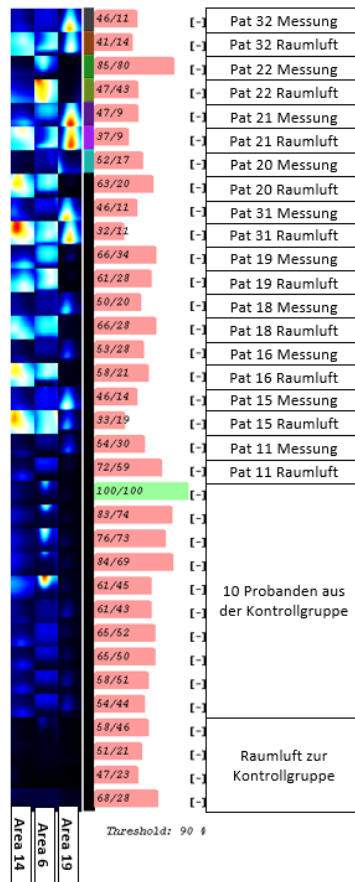


Abbildung 4: Gallery Plot Plug-in-Modul von den Areas 14, 6, 19 aus dem Vergleich der Patientengruppe präoperativ (Patient 32, 22, 21, 20, 31, 19, 18, 16, 15, 11(49)) und der Kontrollgruppe mit entsprechender Raumluft, negativer Driftmodus

Tabelle 11: Auswertung von drei manuell markierten Areas im Vergleich der präoperativen Daten der Patientengruppe und der Kontrollgruppe, negativer Driftmodus

Area	6	14	19
Bei Patientengruppe präoperativ nachweisbar [in %]	20 [57]	21 [60]	32 [91]
Nur rauchende Patienten einbezogen	11 [52]	11 [52]	19 [90]
Bei Patientengruppe präoperativ nicht nachweisbar	15 [43]	14 [40]	3 [9]
Nur rauchende Patienten einbezogen	10 [48]	10 [48]	2 [10]
Bei Kontrollgruppe nachweisbar	12 [24]	41 [82]	26 [52]
Bei Kontrollgruppe nicht nachweisbar	38 [76]	9 [18]	24 [48]
p-Wert (Patientengruppe n=35)	0,002	0,025	<0,001

Area 6 (57 %; $p = 0,002$) und Area 19 (91 %; $p < 0,001$) wurden häufiger in der Patientengruppe nachgewiesen, Area 14 (82 %; $p = 0,025$) zeigt eine deutliche Ausprägung in der Kontrollgruppe. Der prozentuale Anteil des Vorkommens der Areas zwischen der gesamten Patientengruppe und den Rauchenden der Patientengruppe variiert um maximal 8 % (Area 14). Somit kann die Tendenz des Verhältnisses von Nachweis/kein Nachweis zwischen der gesamten Patientengruppe und den rauchenden Probanden aus der Patientengruppe bei allen drei Areas als gleich angenommen werden. Der Abgleich mit der Raumluft wurde bei den drei Areas durchgeführt, da alle Areas einen signifikanten Unterschied zwischen dem Vorkommen in den Gruppen zeigen (Tabelle 12).

Tabelle 12: Abgleich von Area 6, 14 und 19 mit der Raumluft (nur bei Nachweis)

Area	6		14		19	
	PG	KG	PG	KG	PG	KG
Positiver Alveolargradient [in %]	0	9 [75]	1 [5]	16 [39]	26 [81]	25 [96]
Negativer Alveolargradient	18 [90]	2 [17]	15 [71]	4 [10]	0	1 [4]
Kein Gradient erkennbar	2 [10]	1 [8]	5 [24]	21 [51]	6 [19]	0

Patientengruppe = PG, Kontrollgruppe = KG

Area 14 ist zumeist mit negativem Alveolargradienten detektiert worden. Area 6 zeigt in der Patientengruppe deutlich häufiger einen negativen Alveolargradienten, in der Kontrollgruppe verhält es sich umgekehrt. Lediglich Area 19 wurde eindeutig mit positivem Alveolargradienten gemessen.

3.3.2 Vergleich der Daten Patientengruppe prä- und postoperativ

Positiver Driftmodus

Die erste und zweite Messung der Atemluft eines Probanden der Patientengruppe ($n=22$) wurden hintereinander angeordnet und direkt miteinander verglichen. Die Untersuchung sämtlicher markierter Areas erfolgte mittels *Gallery Plot* Plug-in-Modul, wobei acht Areas die formulierten Kriterien erfüllten und anschließend weiterführend detailliert analysiert wurden (s. Anhang, Tabelle 3). Zusätzlich ist eine Area (Area 86), die im Vergleich Patientengruppe und Kontrollgruppe einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen zeigte, zur Überprüfung in beiden Fragestellungen erneut ausgewertet worden (Abbildung 5: exemplarische Darstellung der detailliert analysierten Areas an den Chromatogrammen von Patient 11 prä- und postoperativ, positiver Driftmodus) (Tabelle 13).

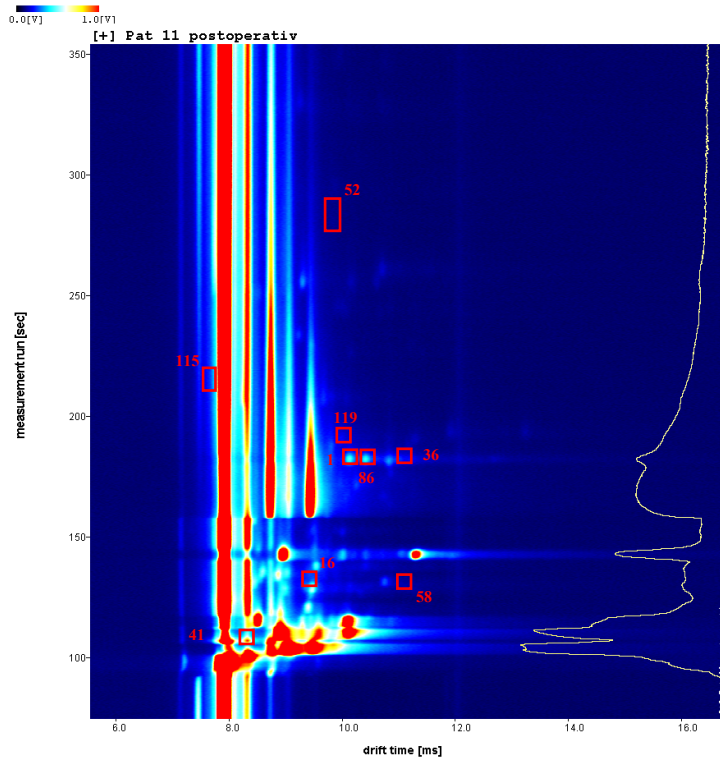
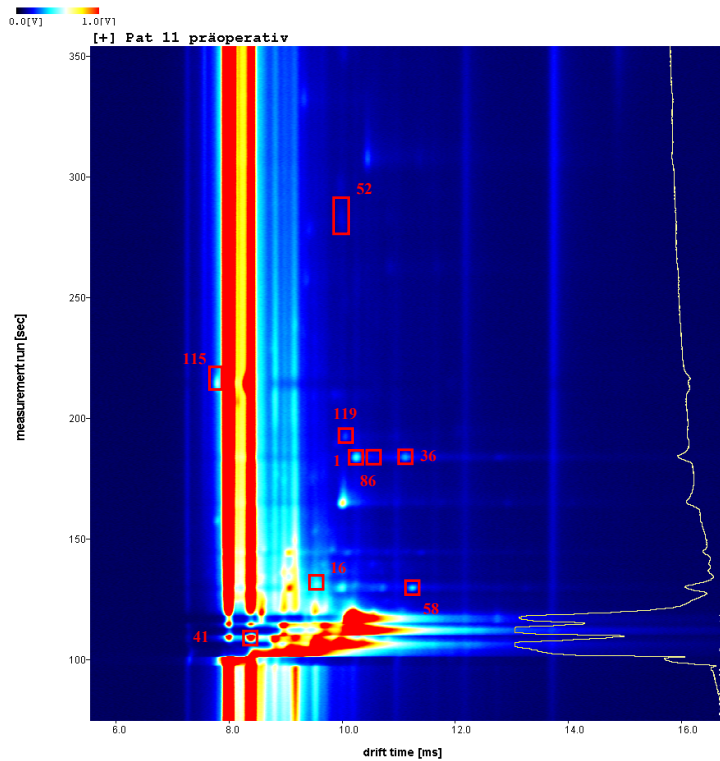


Abbildung 5: Chromatogramme von Patient 11 (Nummerierung entsprechend Table 1 (49)) (oben: präoperativ, unten: postoperativ) im positiven Driftmodus mit den neun Areas 1, 16, 36, 41, 52, 58, 86, 115, 119 der detaillierten Analyse, entsprechend den Kriterien ausgewählt. Die x-Achse gibt die IMS-Driftzeit in *ms*, die y-Achse die Zeit des GC-Messdurchlaufs in *sec* und die z-Achse die Intensität des Substanzsignals in *V* an

Tabelle 13: Auswertung von neun manuell markierten Areas nach Tumorresektion im Vergleich der Patientengruppe prä- und postoperativ, positiver Driftmodus

Area	1	16	36	41	52	58	86	115	119
Reduktion	7	1	3	12	5	3	4	0	3
Reduktion auf 0	0	8	6	1	10	7	2	10	3
Anstieg	10	11	5	1	2	5	7	4	3
Keine Veränderung	1	1	2	5	2	0	1	0	1
Substanz nie nachgewiesen	0	0	6	0	3	5	8	7	12
Anzahl Messungspaare*	18	21	22	19	22	20	22	21	22
p-Wert	0,629	0,824	0,424	0,002	0,002	0,302	1,000	0,180	0,508

*Aufgrund von Überlagerungen in Bereichen des Chromatogramms teilweise reduziert, siehe 3.2.1

Die Auswertung ergab bei Area 41 und 52 eine signifikante postoperative Tendenz zur Reduktion bis hin zum Verschwinden des Substanzsignals ($p = 0,002$ bzw. $p = 0,002$). Alle weiteren Areas zeigen postoperativ keine statistisch signifikanten Veränderungen. Zwei Areas, die im Vergleich der präoperativen Messungen der Patientengruppe mit der Kontrollgruppe häufiger in der Patientengruppe nachweisbar waren, wurden weiter überprüft (siehe 3.3.1). Es zeigte sich, dass Area 115, sofern sie präoperativ nachgewiesen wurde, zumeist postoperativ nicht mehr detektiert worden ist ($p = 0,180$). Bei Area 86, die besonders signifikant verstärkt in der Patientengruppe gemessen worden war, ist keine postoperative Tendenz erkennbar ($p = 1,000$). Area 58, die besonders signifikant verstärkt in der Kontrollgruppe gemessen wurde, zeigt eine nicht signifikante postoperative Tendenz zur Reduktion des Substanzsignals ($p = 0,302$). Ein Abgleich der Areas mit niedrigstem p-Wert erfolgte bezüglich ihres Vorkommens in der Raumluft durch die Gegenüberstellung der ersten Messung der Patientengruppe mit der entsprechenden tagesgleichen Raumluft (Tabelle 14).

Tabelle 14: Abgleich von Area 41, 52 und 115 mit der Raumluft (nur bei Nachweis)

Area	41	52	115
Positiver Alveolargradient	7	12	8
Negativer Alveolargradient	8	0	2
Kein Gradient erkennbar	4	7	4
Summe der ausgewerteten Messungen (= Anzahl Messpaare – Anzahl „Substanz nie nachgewiesen“)	19	19	14

Area 52 und 115 sind zumeist mit positivem Alveolargradienten gemessen worden. Bei Area 41 ist eine leichte Tendenz zum negativen Alveolargradienten erkennbar.

Area 52 ist auch bei den Atemproben der Kontrollgruppe häufig nachweisbar. Area 115 hingegen wurde lediglich bei 9 % der Probanden von der Kontrollgruppe nachgewiesen.

Für einen weiteren Vergleich wurden die prä- und postoperativen Daten mit dem *Reporter* Plugin-Modul zur Ermittlung eines wiederkehrenden Musters innerhalb der zwei Messungen untersucht (Abbildung 6: Zur Visualisierung wurden 5 Probandendaten exemplarisch ausgewählt).

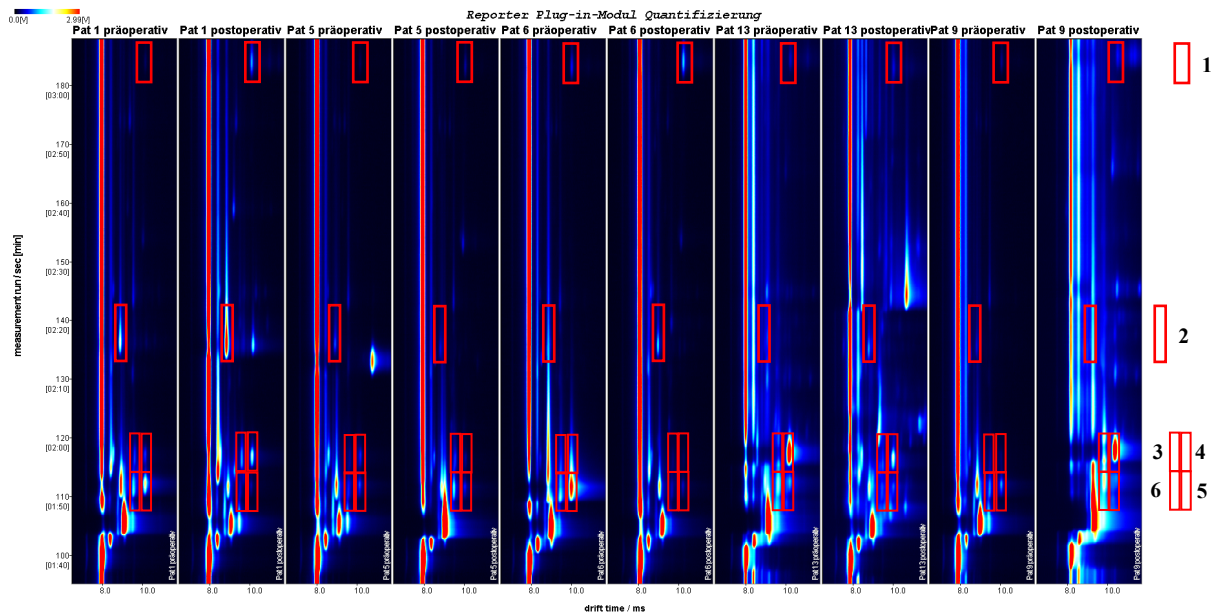


Abbildung 6: Reporter Plug-in-Modul bei 5 Probanden (Patient 1,5,6,13,9(49)) mit Markierung der analysierten sechs Areas (Nummerierung der Areas entsprechend Legende rechts) zur Suche nach Mustern in ihrer Veränderung zwischen prä- und postoperativer Messung, positiver Driftmodus. Die x-Achse gibt die Driftzeit/ ms , die y-Achse die Zeit des GC-Messdurchlaufs/ $sec[min]$ und die z-Achse die Intensität des Substanzsignals in V an

Das Projekt wurde erneut bearbeitet und anhand des Reporter Plug-in-Moduls nach wiederkehrenden Mustern bei den postoperativen Veränderungen der ersten sechs Areas gesucht. Da es sich bei der Quantifizierung um eine numerische Auswertung des IMS-Signals handelt, mussten vier, von den starken Überlagerungen der postoperativen Messung betroffenen Messpaare, ausgeschlossen werden, um die Ergebnisse nicht zu verzerren. Bei der vorausgegangenen visuellen Auswertung war ein individueller Abgleich möglich. Es handelte es sich um die Messpaare von Patient 3, 15, 20 und 22 (Nummerierung entsprechend Table 1 (49)). Die Areas 1-6 wurden ausgewählt, da sie in mind. 15 Messpaaren vorhanden waren und gut abgegrenzte Substanzsignale ohne Überlappungen aufwiesen. Teilweise kann es durch intensive Substanzsignale zu Überlappungen zwischen den Signalen kommen, welche die Ergebnisse der Quantifizierung beeinflussen könnten. Als Referenz wurde ein interner Standard des Geräts verwendet. Zur Analyse wurde das IMS-Signal der präoperativen Messung vom Wert der postoperativen Messung subtrahiert. Ist die daraus entstehende Differenz ein positiver Zahlenwert, hat das IMS-Signal postoperativ zugenommen. Handelt es sich um einen negativen Zahlenwert, hat eine Abnahme des IMS-Signals postoperativ stattgefunden. Lag die ermittelte Differenz unter 0,1, wurden diese Werte ausgeklammert, da ein so geringer Unterschied als zu wenig ausschlaggebend bewertet wurde. Auch hier erfolgte ein Abgleich mit der Raumluft.

Hierzu wurden die Quantifizierung aus der präoperativen Messung der Patientengruppe mit den Werten der tagesaktuellen Raumluft verglichen (n=35). (Tabelle 15).

Tabelle 15: Auswertung der Quantifizierung von sechs manuell markierten Areas im Vergleich der Patientengruppe prä- und postoperativ und Raumluftabgleich, positiver Driftmodus

Area	1	2	3	4	5	6
Postoperative Abnahme der IMS- Signalintensität	6 (+1)	5 (+2)	7 (+1)	9	13	11
Postoperative Zunahme der IMS- Signalintensität	6 (+5)	10 (+1)	8 (+2)	9	4 (+1)	5 (+2)
Endogener Ursprung	18	22	20	10	13	25
Exogener Ursprung	17	13	15	25	22	10

Zahlen in Klammern entsprechen den Messungen mit Differenz < 0,1

Die stärksten Tendenzen bei dieser Analyse zeigen die Area 2 (IMS-Signal-Zunahme postoperativ), sowie Area 5 und 6 (IMS-Signal-Abnahme postoperativ). Die Intensität des IMS-Signals ist bei den Atemproben von Area 2 und 6 zumeist gegenüber der entsprechenden Raumluft erhöht. Area 5 weist eine erhöhte IMS-Intensität in der Raumluft auf.

Bei neun von 18 Patienten der Patientengruppe tritt postoperativ die gleiche Intensitätsveränderung auf: Bei Area 2 nimmt postoperativ die IMS-Signalintensität zu und bei Area 6 verringert sich die IMS-Intensität. Werden weitere fünf Patienten wegen zu geringen Veränderungen (Differenz unter 0,1) unter Vorbehalt ausgeklammert, zeigt sich diese Kombination der Signalveränderung bei neun von 13 Patienten der Patientengruppe postoperativ.

Negativer Driftmodus

Das Vorgehen im negativen Driftmodus lief analog ab. Mittels *Gallery Plot* Plut-in-Modul wurde nach wiederkehrenden postoperativen Veränderungen gesucht, wobei erneut die Areas aus 3.3.1 den Kriterien entsprachen (s. Anhang, Tabelle 4). Diese wurden somit detailliert betrachtet (Abbildung 7: exemplarische Darstellung der detailliert analysierten Areas an den Chromatogrammen von Patient 11 prä- und postoperativ, negativer Driftmodus) (Tabelle 16).

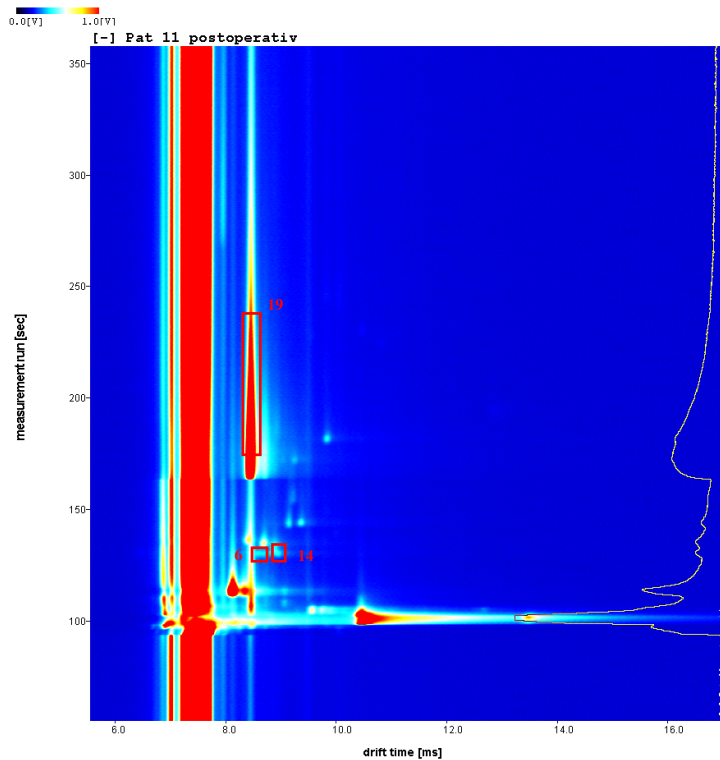
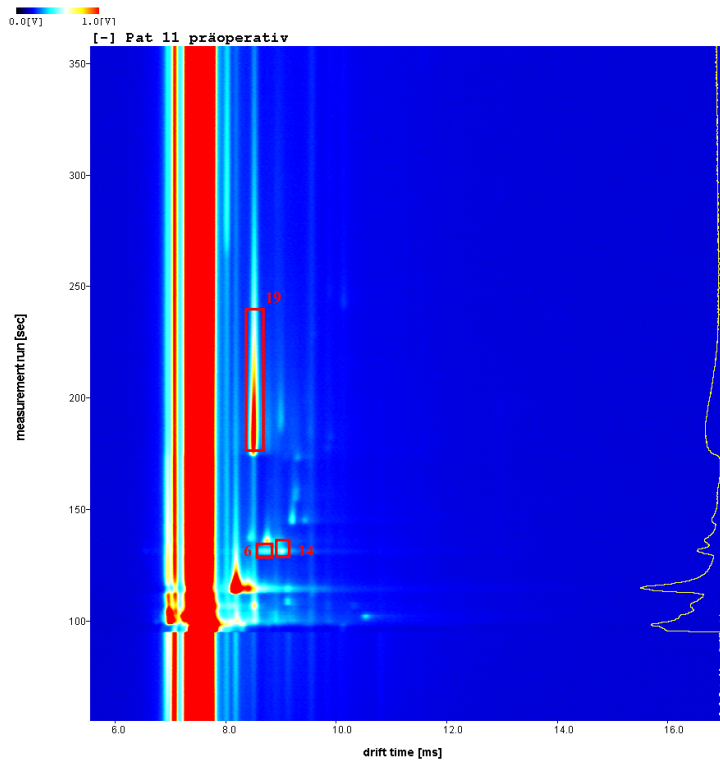


Abbildung 7: Chromatogramme von Patient 11 (Nummerierung entsprechend Table 1 (49)) (oben: präoperativ, unten: postoperativ) im negativen Driftmodus mit den drei Areas 6, 14, 19 der detaillierten Analyse, entsprechend den Kriterien ausgewählt. Die x-Achse gibt die IMS-Driftzeit in ms , die y-Achse die Zeit des GC-Messdurchlaufs in sec und die z-Achse die Intensität des Substanzsignals in V an

Tabelle 16: Auswertung von drei manuell markierten Areas nach Tumorresektion im Vergleich der Patientengruppe prä- und postoperativ, negativer Driftmodus

Area	6	14	19
Reduktion	2	3	5
Reduktion auf 0	1	0	1
Anstieg	14	13	12
Keine Veränderung	0	0	0
Substanz nie nachgewiesen	5	6	4
Summe der Messungspaare	22	22	22
p-Wert	0,013	0,021	0,238

Area 6 und 14 zeigen eine signifikante Zunahme der Signalintensität postoperativ ($p = 0,013$ bzw. $p = 0,021$). Bei Area 19 nimmt die Signalintensität postoperativ ebenfalls häufig zu, jedoch nicht signifikant ($p = 0,238$). Da schon im Abschnitt 3.3.1 der Raumluftabgleich stattgefunden hat und die Areas 6 und 14 zumeist mit verstärkter Intensität in der Raumluft gemessen worden sind, wurde diesmal zur Kontrolle die postoperative Messung der Patientengruppe mit der jeweiligen Raumluft der zweiten Messung abgeglichen (Tabelle 17).

Tabelle 17: Abgleich von Area 6, 14 und 19 mit der Raumluft (nur bei Nachweis)

Area	6	14	19
Positiver Alveolargradient	1	1	11
Negativer Alveolargradient	13	13	4
Intensität gleich	3	2	3

Area 6 und 14 zeigen erneut eine zumeist einen negativen Alveolargradienten. Area 19 ist am häufigsten mit positivem Alveolargradienten detektiert worden.

3.4 Machine Learning

Des Weiteren wurden die Daten im Institut für Physiologie (AG Bioinformatik) und Science IT mittels Machine Learning analysiert. Es wurde ebenfalls nach spezifischen Mustern gesucht, die eine genaue Zuordnung in die unterschiedlichen Gruppen ermöglichen.

Beim Vergleich der Patientengruppe und der Kontrollgruppe konnte im positiven und negativen Driftmodus mittels 10-facher Kreuzvalidierung mit einer durchschnittlichen Genauigkeit von 0.90 bzw. 0.86 zwischen den Gruppen unterschieden werden. Beim Vergleich der ersten und zweiten Messung von der Patientengruppe lag die Genauigkeit der Differenzierung im positiven Driftmodus bei 0.65, im negativen Driftmodus bei 0.89. Mittels Leave-One-Out-Kreuzvalidierung wurden die gefundenen Modelle überprüft, wobei die logistische Regression die leistungsstärkste Methode darstellte (Tabelle 18) (Figure 4 (49)).

Tabelle 18: Ergebnisse Machine Learning

	Richtig zugeordnete Proben/Gesamtzahl der Proben [Genauigkeit in %]
Patientengruppe – Kontrollgruppe, positiver Driftmodus	60/72 [83]
Patientengruppe – Kontrollgruppe, negativer Driftmodus	61/72 [85]
Patientengruppe – erste und zweite Messung, positiver Driftmodus	35/61 [57]
Patientengruppe – erste und zweite Messung, negativer Driftmodus	43/58 [74]

4. Diskussion

4.1 Zusammenfassung und Interpretation der Ergebnisse

Eine eindeutige und sichere Identifikation der durch die Areas beschriebenen Substanz oder Substanzgemische war aufgrund fehlender präziser technischer Voraussetzungen nicht durchführbar, weshalb im folgenden Text weiterhin der Begriff „Area“ verwendet wird. Im positiven Driftmodus konnten deutlich mehr Areas detektiert werden als im negativen Driftmodus. Dies liegt daran, dass eine größere Anzahl von Substanzklassen positive Analyt-Ionen ausbilden (48). Bei dem Vergleich von Patientengruppe und Kontrollgruppe im positiven Driftmodus konnten zwei Areas (Area 86, 115) ermittelt werden, die signifikant häufiger bei den Patienten mit oralem PECA detektiert wurden. Ein Abgleich mit der Raumluft ergab für beide einen positiven Alveolargradienten, wodurch von einem endogenen Ursprung auszugehen ist. Eine Assoziation zwischen dem Nachweis der Areas in den Messungen und dem oralen PECA könnte bestehen. Außerdem konnten drei Areas (Area 50, 58, 74) ermittelt werden, die signifikant häufiger bei den Probanden der Kontrollgruppe vorhanden sind. Im Vergleich der Patientengruppen prä- und postoperativ wurden zwei Areas (Area 52, 115) gefunden, die zumeist postoperativ in ihrer Intensität reduziert gemessen worden sind und deren endogener Ursprung aufgrund des positiven Alveolargradienten wahrscheinlich ist. Area 115 ist besonders hervorzuheben, da sie sowohl durch einen häufig fehlenden postoperativen Nachweis als auch ein signifikant geringeres Vorkommen in der Kontrollgruppe gekennzeichnet ist. Dieser Umstand lässt eine Assoziation mit dem oralen PECA vermuten. Allerdings ist die postoperative Reduktion von Area 115 nicht signifikant. Area 52 ist postoperativ signifikant in reduzierter Intensität gemessen worden, jedoch ist sie auch bei den meisten Probanden der Kontrollgruppe nachweisbar. Inwiefern die Intensitätsverringerng von Area 52 bei den postoperativen Messungen in Assoziation zur Entfernung des Tumors steht, ist durch die vorhandenen Daten nicht abschließend beurteilbar. Sowohl Area 86 als auch 58 sind in ihrer postoperativen Tendenz nicht eindeutig. Deshalb ist die signifikant verstärkte Detektion von Area 86 in der Patientengruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht sicher mit dem oralen PECA assoziiert. Auch die deutlich signifikant geringere Ausprägung von Area 58 präoperativ in der Patientengruppe kann aufgrund der unklaren Tendenz dieser Area bei den postoperativen Messungen nicht mit dem oralen PECA verbunden werden. Im negativen Driftmodus konnte beim Vergleich der Patientengruppe und Kontrollgruppe eine Area (Area 19) mit positivem Alveolargradienten identifiziert werden, die signifikant häufiger bei den Patienten mit oralem PECA detektiert wurde. Beim Vergleich der prä- und postoperativen Messungen im negativen Driftmodus zeigte sich allerdings postoperativ eine nicht signifikant

erhöhte Intensität dieser Area. Wodurch diese postoperative Zunahme begründet ist, lässt sich zum jetzigen Zeitpunkt nicht beurteilen.

Die Quantifizierung ergab eine wiederkehrende Kombination von zwei Areas: Area 2 (postoperative Zunahme) und Area 6 (postoperative Abnahme), welche bei der Hälfte der Messpaare gefunden wurde. Dieses Muster könnte in Assoziation mit dem oralen PECA stehen. Inwiefern eine Verbindung der beiden Signalveränderungen zueinander besteht, ist noch nicht beurteilbar. Diese Kombination ist als Muster für weitere Analysen verwendbar.

Die Ergebnisse des Machine Learnings zeigten besonders im Vergleich zwischen der Patientengruppe und der Kontrollgruppe hohe Genauigkeiten bei der Differenzierung. Zusätzlich konnte beim Vergleich der ersten und zweiten Messung der Patientengruppe mit guter Treffsicherheit zwischen den Messungen unterschieden werden, besonders im negativen Driftmodus.

4.2 Bewertung der Ergebnisse

Die Qualität der Ergebnisse von Atemgasanalysen ist von verschiedenen Einflüssen abhängig. Um die beeinflussenden Faktoren zu minimieren, wird folgendes Protokoll für die Probenahme entsprechend der aktuellen Forschung vorgeschlagen: Eine Fastenperiode von mindestens sechs Stunden vor Probenahme muss sichergestellt sein (51). Vor Entnahme der Atemluft sollte ein einmaliges Ausspülen des Mundes ausschließlich mit Wasser zur Reduktion von kontaminierenden VOCs der Mundhöhle erfolgen (52). Die Probenahme sollte am besten immer am gleichen Ort stattfinden und dieser Raum so wenig wie möglich durch starke Reinigungsmittel oder andere dominante Substanzen belastet und durch keine raumluftechnische Anlage belüftet sein (53).

Konsumierte Lebensmittel und verwendete Hygieneartikel sind wichtige auf die Atemluft einwirkende Faktoren. Zur Bereinigung der Atemluft von Bestandteilen aus Nahrungsmitteln ist die Nüchternheit der Probanden vor Probenahme notwendig, um eine bessere Bestimmung des Substanzursprungs zu ermöglichen. Studien konnten zeigen, dass verschiedene Lebensmittel auch lange nach ihrem Verzehr in der Atemluft detektiert werden und so vermeintlich als endogenen Ursprungs bewertet werden könnten (22). Die Probanden der Patientengruppe befanden sich präoperativ zumeist schon seit der vorherigen Nacht in stationärer Behandlung und mussten für die anstehende Operation nüchtern bleiben. Die postoperativen Proben wurden am Tag der Entlassung zur Sicherstellung der Nüchternheit vor dem Frühstück genommen. Bei der Kontrollgruppe war diese Sicherstellung schwierig, hier

musste sich auf die Aussage der Teilnehmenden verlassen werden. Insgesamt erscheinen die Messungen der Kontrollgruppe häufig in ihrer Intensität verstärkt, was unter Umständen mit einer unzureichenden Nüchternheit zu erklären sein könnte. Auch Bestandteile von Pfefferminzöl, welches häufig in oralen Hygieneprodukten verwendet wird, kann noch Stunden nach Einnahme in der Atemluft gemessen werden (54). Deshalb wurden die Probanden gebeten, keine Zahnpasta vor Probenahme zu benutzen, eine mechanische Zahnreinigung durchzuführen und den Mund lediglich mit Wasser auszuspülen. Hierbei ist die Compliance der Teilnehmenden sehr wichtig.

Einfluss hat auch die Zusammensetzung der Umgebungsluft. Gerade im klinischen Setting ist sie häufig z.B. durch Desinfektionsmittel stark belastet, was zu einer Überlagerung niedriger konzentrierter Substanzen führen kann (53). Um sicherzustellen, dass es sich bei den detektierten Areas mit signifikanten Unterschieden zwischen den Gruppen um Substanzen endogenen Ursprungs handelt, wurden zusätzlich zu jeder Atemgasmessung auch Raumluftproben genommen und der Alveolargradient nach Phillips ermittelt.

Tabakkonsum ist ebenfalls ein auf den menschlichen Atem einwirkender Faktor (55). Allerdings ist der Einfluss vermutlich zeitabhängig. In einer Studie konnte keine signifikante Differenz in der Atemluft von Rauchern nach einer Nacht ohne Tabakkonsum zur Atemluft von Nichtrauchern nachgewiesen werden (56). Jedoch zeigte sich, dass eindeutig zwischen der Atemluft von Rauchern eine Stunde nach dem Konsum einer Zigarette und der Atemluft von Rauchern nach einer Nacht ohne Tabakkonsum unterschieden werden konnte. Um den Einfluss des Rauchens auf die Daten zu verringern, wurden in der Kontrollgruppe lediglich rauchende Personen untersucht. In früheren Studien zur Verbindung von Tabakkonsum und der Entstehung eines Mundhöhlenkarzinoms waren zwischen 85 - 90 % der Patienten mit oralem PECA Raucher oder ehemalige Raucher (57, 58). Anders als zunächst erwartet, gaben nur 60 % der Probanden der Patientengruppe in ihrer Anamnese an, Raucher zu sein und vier Patienten waren ehemalige Raucher. Daher wurden die detailliert analysierten Areas aus dem Vergleich von Patientengruppe und Kontrollgruppe separat unter diesem Aspekt überprüft. Hierfür wurden die Daten der rauchenden Probanden der Patientengruppe gesondert abgeglichen. Es zeigte sich, dass die Tendenz zum Nachweis einer Area (häufiger nachgewiesen als nicht nachgewiesen bzw. häufiger nicht nachgewiesen als nachgewiesen) unter diesem Aspekt gleich bleibt. Daher scheint es keinen Zusammenhang zwischen dem Vorkommen der in 3.3.1 detektierten Substanzen und dem Tabakkonsum zu geben. Bei einer weiterführenden Studie ist eine Anpassung der Zusammensetzung der Kontrollgruppe entsprechend dem Verhältnis der

Raucher/Nichtraucher der Patientengruppe zu empfehlen. Außerdem wäre eine anamnestiche Erfassung vom Zeitpunkt des letzten Zigarettenkonsums hilfreich.

Auch die Einnahme von Medikamenten beeinflusst die Atemluft (53). Allerdings ist die Bestimmung der Einflussstärke erschwert, da bei gefundenen Veränderungen in der Atemgasanalyse zwischen der bestehenden Erkrankung oder der erfolgten Therapie mittels Medikation als Ursache unterschieden werden muss. Daten unter Berücksichtigung dieser Umstände sind zum jetzigen Zeitpunkt nicht veröffentlicht (21). Um den Einfluss von Radiation oder Chemotherapeutika auf die Atemluft der Probanden und potenzielle Bias zu verhindern, fand die zweite Messung der Patientengruppe vor dem Beginn einer möglichen adjuvanten Radio(chemo)therapie statt.

In zwei Fällen war eine adäquate postoperative Probenahmen mit leichtem Lippenschluss für die Studienteilnehmenden aufgrund von Operationswunden nicht möglich. Dies könnte die Anzahl und Konzentration der Substanzen bei diesen Messungen beeinflusst haben, da unter Umständen zusätzlich Umgebungsluft in der Atemluftprobe erfasst wurde. Auch war durch besagte Wunden teilweise die Mundhygiene eingeschränkt. Eine *in-vitro* Studie konnte zeigen, dass oralen Bakterien, die mit Gingivitis und Parodontitis assoziiert sind, eine Vielzahl von VOCs produzieren und somit vermutlich auch die Atemluft beeinflussen (59).

Die Messungen der Probanden, bei denen sich der Verdacht auf ein orales PECA oder ein Rezidiv nicht bestätigte, wurden nicht in die Kontrollgruppe übernommen, um sicherzustellen, dass bereits vorhandene Vorläuferläsionen die Daten nicht beeinflussen.

4.3 Bewertung der Methode und Limitationen der Studie

Die Anwendung und Durchführung der Atemgasanalyse ist stark von der Wahl der Analysemethode beeinflusst. Anders als bei MS, wo ein Hochvakuum über Hochvakuumumpfen erzeugt werden muss und die Geräte größer sind (60), arbeitet der BreathSpec® mit IMS bei Umgebungsdruck ohne zusätzliche Pumpe. Dadurch ist das Gerät kleiner und benötigt eine geringere Stellfläche (45 cm x 50 cm x 29,5 cm (BxLxH))(46, 48). So sind die Unterbringung des Geräts und auch ein möglicher Transport grundsätzlich erleichtert. Da die Raumluft, bereinigt durch Filter, als Träger- und Driftgas verwendet wird, ist allerdings die Wahl des Gerätestandorts entscheidend. Dieser Ort sollte keine hohen Desinfektions- und Reinigungsmittelkonzentrationen oder einen anderen intensiven Duft in der Luft aufweisen. Wie bereits beschrieben, führte vermutlich eine Substanz in der Luft am Gerätestandort bei den

letzten sieben Messungen der Studie zur Überlagerung einzelner Signalintensitäten, weshalb diese Messungen nur teilweise ausgewertet werden konnten.

Der Alveolargradient nach Phillips wurde verwendet, um zu bestimmen, ob es sich bei den detektierten Areas um Substanzen endogenen oder exogenen Ursprungs handelt. Die Vorteile der Methode bestehen in der einheitlichen Anwendbarkeit und dem besseren Verständnis der Dynamik von VOCs. Nachteilig wird der zusätzliche Zeitaufwand für die notwendigen Raumlufthproben beschrieben (13). Außerdem wird methodisch von einem gleichen dynamischen Verhalten der VOCs in der Umgebungsluft und im Körper ausgegangen. Allerdings konnte eine Studie zeigen, dass bestimmte exogen eingeatmete Substanzen unterschiedlich stark im Körper zurückgehalten werden. Es wird die Einbeziehung eines spezifischen Retentionskoeffizienten je nach Substanz empfohlen (61). Für Areas mit unklaren Ergebnissen, wie Area 41 in Tabelle 12 aus 3.3.1, wäre daher eine genaue Substanzbestimmung zur Anwendung von spezifischen Retentionskoeffizienten hilfreich. Außerdem ist es wichtig, darauf zu achten, dass bei der Probenahme der Raumlufth die Luft zwar aus der Nähe des Kopfes, aber nicht direkt in Richtung der Expiration genommen wird, um mögliche Bias zu verhindern.

Inwiefern weitere Faktoren wie u.a. Größe und Lokalisation des Primärtumors oder vorhandene Metastasen, aber auch Geschlecht der Teilnehmenden die Atemgase beeinflussen, konnte aufgrund der zu geringen Probandenzahl nicht aussagekräftig untersucht werden. In der Zukunft sind weiterführende Studien mit einer größeren Anzahl an Probanden notwendig, um die gefundenen Ergebnisse sowohl der manuellen Area-Auswertung als auch des Machine Learnings zu validieren.

Aufgrund des explorativen Charakters der Datenauswertung in der manuellen Area-Auswertung durch multiples Testen, ist ein zufälliger Befund bei diesem Patientenkollektiv möglich. Eine unabhängige Studie mit einem neuen Patientenkollektiv zur Überprüfung der gefundenen Ergebnisse ist notwendig. Durch eine größere Teilnehmendenzahl und eine gleichmäßige Verteilung der Probanden zwischen den Gruppen könnte die statistische Auswertung aussagekräftiger werden.

4.4. Weiterführende Fragestellungen

Um die Vielzahl der VOCs des menschlichen Atems besser benennen zu können, ist weitere Grundlagenforschung notwendig. Hierbei wäre es auch wichtig, die Atemluft von gesunden Individuen zu untersuchen. Denn ein genaueres Verständnis der Stoffwechselprozesse, die zur

Entstehung verschiedener VOCs führen, ist nötig, um die Veränderungen durch Krankheiten besser differenzieren zu können (62).

Ein international standardisiertes Protokoll zu Probenahme und Analyseverfahren sowie eine international standardisierte Einheit für das IMS-Signal würden eine Vergleichbarkeit der Daten verschiedener Forschungsgruppen ermöglichen, wodurch eine größere Anzahl von Proben miteinander abgeglichen und ausgewertet werden könnte (63).

Zur vereinfachten Suche und Reduktion der Datenmenge ist auch eine vorherige *in-vitro*-Testung denkbar. Die *in-vitro* ermittelten Daten würden als Vorauswahl eine Möglichkeit zur zielgerichteten Untersuchung der Substanzgemische im humanen Atem darstellen. Dies wurde bereits u.a. mit Zellen vom humanen Lungenkarzinom versucht und lieferte einige möglicherweise für das Karzinom spezifische VOCs in erhöhten Konzentrationen (64, 65). Auch zum oralen PECA ist bereits eine Studie mit *in-vitro*-Analysen veröffentlicht worden, bei der eine Substanz mit signifikanter Erhöhung bei den Gewebeproben von HNSCC gefunden werden konnte (66). Inwiefern die *in-vitro* ermittelten VOCs auf *in-vivo*-Bedingungen übertragbar sind, bleibt allerdings abzuwarten (67).

Für eine optimierte Darstellung wäre außerdem ein Abgleich der Probandendaten mit der Raumluft durch die zur Auswertung verwendende Software mittels einer Funktion des Ausblendens der Substanzen exogenen Ursprungs (mit negativem Alveolargradienten) denkbar. Dies würde ebenfalls die Datenmenge reduzieren und die Auswertung erleichtern.

4.5 Klinische Anwendung der Ergebnisse

Die Atemgasanalyse ist eine vielversprechende Methode, da die Probenahme schnell und ohne Belastung oder Schmerzen für die Teilnehmenden durchführbar ist. So verweigerte keine der gefragten Personen die Teilnahme an dieser Studie. Auch sind sämtliche benötigten Materialien, außer des Analysegeräts, kostengünstig und bereits im klinischen Setting vorhanden. Sollten in der Zukunft VOCs mit gesicherter Assoziation zum oralen PECA bekannt sein, ist bei einer gezielten Suche von kürzeren Bearbeitungszeiten auszugehen. Dies könnte die Handhabung deutlich vereinfachen und zu direkten Ergebnissen nach der Analyse durch das Gerät führen. Außerdem wäre die Technik durch gesicherte VOC-Muster robuster gegenüber exogenen Einflüssen.

5. Schlussfolgerungen

Die ermittelten Areas sowie die Area-Kombination als postoperatives VOC-Muster können in Assoziation mit einem oralen PECA stehen. Jedoch ist zum jetzigen Zeitpunkt noch keine Übertragung in eine klinische Anwendung möglich. Hierfür müssten weitere Studien mit einer größeren Teilnehmeranzahl zur Validierung der gefundenen Ergebnisse erfolgen. Auch wäre eine Identifizierung der durch die Areas beschriebenen Substanzen hilfreich, um ihren Ursprung gesicherter benennen zu können. Die vorherige *in-vitro*-Testung könnte eine gezieltere Suche ermöglichen, ebenso der programminterne Abgleich der Raum- und Probandendaten die Übersichtlichkeit der Datenmenge mittels Reduktion um exogene Substanzen verbessern. Die nicht-invasive und schnelle Probenahme sowie die erleichterte Auswertung bei gezielter Suche nach bekannten VOC-Mustern könnte die Methodik der Atemgasanalyse in der Zukunft zu einer anwenderfreundlichen Möglichkeit für Diagnose und Verlaufskontrolle des oralen PECA werden lassen.

Literaturverzeichnis

1. *Krebs in Deutschland für 2015/2016*. Berlin; Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg) 2019. S. 17,24-7. Abrufbar unter: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/ki_d_2019/krebs_in_deutschland_2019.pdf?__blob=publicationFile.
2. Pitiphat W, Diehl SR, Laskaris G, Cartsos V, Douglass CW, Zavras AI. *Factors associated with delay in the diagnosis of oral cancer*. J Dent Res. 2002;81(3):192-7.
3. Abrahao R, Perdomo S, Pinto LFR, Nascimento de Carvalho F, Dias FL, de Podesta JRV, Ventorin von Zeidler S, Marinho de Abreu P, Vilensky M, Giglio RE, Oliveira JC, Mineiro MS, Kowalski LP, Ikeda MK, Cuello M, Munyo A, Rodriguez-Urrego PA, Hakim JA, Suarez-Zamora DA, Cayol F, Figari MF, Oliver J, Gaborieau V, Keogh RH, Brennan P, Curado MP, Inter CG. *Predictors of Survival After Head and Neck Squamous Cell Carcinoma in South America: The InterCHANGE Study*. JCO Glob Oncol. 2020;6:486-99.
4. Bhat GR, Hyole RG, Li J. *Head and neck cancer: Current challenges and future perspectives*. Adv Cancer Res. 2021;152:67-102.
5. Hashibe M, Brennan P, Chuang SC, Boccia S, Castellsague X, Chen C, Curado MP, Dal Maso L, Daudt AW, Fabianova E, Fernandez L, Wunsch-Filho V, Franceschi S, Hayes RB, Herrero R, Kelsey K, Koifman S, La Vecchia C, Lazarus P, Levi F, Lence JJ, Mates D, Matos E, Menezes A, McClean MD, Muscat J, Eluf-Neto J, Olshan AF, Purdue M, Rudnai P, Schwartz SM, Smith E, Sturgis EM, Szeszenia-Dabrowska N, Talamini R, Wei Q, Winn DM, Shangina O, Pilarska A, Zhang ZF, Ferro G, Berthiller J, Boffetta P. *Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2009;18(2):541-50.
6. Scully C, Bagan J. *Oral squamous cell carcinoma overview*. Oral Oncol. 2009;45(4-5):301-8.
7. Chow LQM. *Head and Neck Cancer*. N Engl J Med. 2020;382(1):60-72.
8. Dharmawardana N, Woods C, Watson DI, Yazbeck R, Ooi EH. *A review of breath analysis techniques in head and neck cancer*. Oral Oncol. 2020;104:104654.
9. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF). S3-Leitlinie Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms Langversion 3.0, 2021(AWMF Registernummer: 007/100OL). (letztes Zugriffsdatum 06.10.2021). Abrufbar unter: https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Mundhoehlenkarzinom/Version_3/LL_Mundhoehlenkarzinom_Langversion_3.0.pdf.
10. Amann A, Costello Bde L, Miekisch W, Schubert J, Buszewski B, Pleil J, Ratcliffe N, Risby T. *The human volatilome: volatile organic compounds (VOCs) in exhaled breath, skin emanations, urine, feces and saliva*. J Breath Res. 2014;8(3):034001.
11. Lourenco C, Turner C. *Breath analysis in disease diagnosis: methodological considerations and applications*. Metabolites. 2014;4(2):465-98.
12. Pauling L, Robinson AB, Teranishi R, Cary P. *Quantitative analysis of urine vapor and breath by gas-liquid partition chromatography*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1971;68(10):2374-6.
13. Phillips M, Herrera J, Krishnan S, Zain M, Greenberg J, Cataneo RN. *Variation in volatile organic compounds in the breath of normal humans*. J Chromatogr B Biomed Sci Appl. 1999;729(1-2):75-88.
14. Finamore P, Scarlata S, Incalzi RA. *Breath analysis in respiratory diseases: state-of-the-art and future perspectives*. Expert Rev Mol Diagn. 2019;19(1):47-61.

15. Oakley-Girvan I, Davis SW. *Breath based volatile organic compounds in the detection of breast, lung, and colorectal cancers: A systematic review*. Cancer Biomark. 2017;21(1):29-39.
16. Barash O, Zhang W, Halpern JM, Hua QL, Pan YY, Kayal H, Khoury K, Liu H, Davies MP, Haick H. *Differentiation between genetic mutations of breast cancer by breath volatolomics*. Oncotarget. 2015;6(42):44864-76.
17. Xiang L, Wu S, Hua Q, Bao C, Liu H. *Volatile Organic Compounds in Human Exhaled Breath to Diagnose Gastrointestinal Cancer: A Meta-Analysis*. Front Oncol. 2021;11:606915.
18. Nakhleh MK, Amal H, Jeries R, Broza YY, Aboud M, Gharra A, Ivgi H, Khatib S, Badarneh S, Har-Shai L, Glass-Marmor L, Lejbkowitz I, Miller A, Badarny S, Winer R, Finberg J, Cohen-Kaminsky S, Perros F, Montani D, Girerd B, Garcia G, Simonneau G, Nakhoul F, Baram S, Salim R, Hakim M, Gruber M, Ronen O, Marshak T, Doweck I, Nativ O, Bahouth Z, Shi DY, Zhang W, Hua QL, Pan YY, Tao L, Liu H, Karban A, Koifman E, Rainis T, Skapars R, Sivins A, Ancans G, Liepniece-Karele I, Kikuste I, Lasina I, Tolmanis I, Johnson D, Millstone SZ, Fulton J, Wells JW, Wilf LH, Humbert M, Leja M, Peled N, Haick H. *Diagnosis and Classification of 17 Diseases from 1404 Subjects via Pattern Analysis of Exhaled Molecules*. ACS Nano. 2017;11(1):112-25.
19. Pleil JD, Stiegel MA, Risby TH. *Clinical breath analysis: discriminating between human endogenous compounds and exogenous (environmental) chemical confounders*. J Breath Res. 2013;7(1):017107.
20. Turner C. *Techniques and issues in breath and clinical sample headspace analysis for disease diagnosis*. Bioanalysis. 2016;8(7):677-90.
21. Blanchet L, Smolinska A, Baranska A, Tigchelaar E, Swertz M, Zhernakova A, Dallinga JW, Wijmenga C, van Schooten FJ. *Factors that influence the volatile organic compound content in human breath*. J Breath Res. 2017;11(1):016013.
22. Krilaviciute A, Leja M, Kopp-Schneider A, Barash O, Khatib S, Amal H, Broza YY, Polaka I, Parshutin S, Rudule A, Haick H, Brenner H. *Associations of diet and lifestyle factors with common volatile organic compounds in exhaled breath of average-risk individuals*. J Breath Res. 2019;13(2):026006.
23. Einoch Amor R, Nakhleh MK, Barash O, Haick H. *Breath analysis of cancer in the present and the future*. Eur Respir Rev. 2019;28(152).
24. Sethi S, Nanda R, Chakraborty T. *Clinical application of volatile organic compound analysis for detecting infectious diseases*. Clin Microbiol Rev. 2013;26(3):462-75.
25. Haick H, Broza YY, Mochalski P, Ruzsanyi V, Amann A. *Assessment, origin, and implementation of breath volatile cancer markers*. Chem Soc Rev. 2014;43(5):1423-49.
26. Sankararaman S, Moosavi L. Urea Breath Test. StatPearls. Treasure Island (FL)2021. S. 1-4.
27. National Cancer Institute (NIH). *Head and Neck Cancers 2021 updated 25.05.2021*. (letztes Zugriffsdatum 29.10.2021). Abrufbar unter: <https://www.cancer.gov/types/head-and-neck/head-neck-fact-sheet>.
28. 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;157(6):981-7.
29. Schmutzhard J, Rieder J, Deibl M, Schwentner IM, Schmid S, Lirk P, Abraham I, Gunkel AR. *Pilot study: volatile organic compounds as a diagnostic marker for head and neck tumors*. Head Neck. 2008;30(6):743-9.

30. Hakim M, Billan S, Tisch U, Peng G, Dvorkind I, Marom O, Abdah-Bortnyak R, Kuten A, Haick H. *Diagnosis of head-and-neck cancer from exhaled breath*. Br J Cancer. 2011;104(10):1649-55.
31. Gruber M, Tisch U, Jeries R, Amal H, Hakim M, Ronen O, Marshak T, Zimmerman D, Israel O, Amiga E, Doweck I, Haick H. *Analysis of exhaled breath for diagnosing head and neck squamous cell carcinoma: a feasibility study*. Br J Cancer. 2014;111(4):790-8.
32. Bouza M, Gonzalez-Soto J, Pereiro R, de Vicente JC, Sanz-Medel A. *Exhaled breath and oral cavity VOCs as potential biomarkers in oral cancer patients*. J Breath Res. 2017;11(1):016015.
33. Chandran D, Ooi EH, Watson DI, Kholmurodova F, Jaenisch S, Yazbeck R. *The Use of Selected Ion Flow Tube-Mass Spectrometry Technology to Identify Breath Volatile Organic Compounds for the Detection of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: A Pilot Study*. Medicina (Kaunas). 2019;55(6).
34. Dharmawardana N, Goddard T, Woods C, Watson DI, Ooi EH, Yazbeck R. *Development of a non-invasive exhaled breath test for the diagnosis of head and neck cancer*. Br J Cancer. 2020;123(12):1775-81.
35. Leunis N, Boumans ML, Kremer B, Din S, Stobberingh E, Kessels AG, Kross KW. *Application of an electronic nose in the diagnosis of head and neck cancer*. Laryngoscope. 2014;124(6):1377-81.
36. van Hooren MR, Leunis N, Brandsma DS, Dingemans AC, Kremer B, Kross KW. *Differentiating head and neck carcinoma from lung carcinoma with an electronic nose: a proof of concept study*. Eur Arch Otorhinolaryngol. 2016;273(11):3897-903.
37. van de Goor R, Hardy JCA, van Hooren MRA, Kremer B, Kross KW. *Detecting recurrent head and neck cancer using electronic nose technology: A feasibility study*. Head Neck. 2019;41(9):2983-90.
38. van de Goor R, van Hooren MRA, Henatsch D, Kremer B, Kross KW. *Detecting head and neck squamous carcinoma using a portable handheld electronic nose*. Head Neck. 2020;42(9):2555-9.
39. Makitie AA, Almangush A, Youssef O, Metsala M, Silen S, Nixon IJ, Haigentz M, Jr., Rodrigo JP, Saba NF, Vander Poorten V, Ferlito A. *Exhaled breath analysis in the diagnosis of head and neck cancer*. Head Neck. 2020;42(4):787-93.
40. Ghimenti S, Lomonaco T, Bellagambi FG, Tabucchi S, Onor M, Trivella MG, Ceccarini A, Fuoco R, Di Francesco F. *Comparison of sampling bags for the analysis of volatile organic compounds in breath*. J Breath Res. 2015;9(4):047110.
41. Le H, Sivret EC, Parsi G, Stuetz RM. *Stability of volatile sulfur compounds (VSCs) in sampling bags - impact of temperature*. Water Sci Technol. 2013;68(8):1880-7.
42. G.A.S. Gesellschaft für analytische Sensorsysteme mbH. *BreathSpec® – User Manual*;2021. S. 29-36. Abrufbar unter: <https://www.gas-dortmund.de/data-file-gas/downloads/Manuals/2021-02-07-BreathSpec%20User%20Manual%204.02EN.pdf>.
43. Sparkman OD, Penton Z, Kitson FG. *Gas chromatography and mass spectrometry : a practical guide* 2nd ed. ed. Burlington, MA: Academic Press; 2011. S. 15, 50.
44. G.A.S. Gesellschaft für analytische Sensorsysteme mbH. *Gas Chromatography (GC) coupled to Ion Mobility Spectrometry (IMS)* 2021. (letztes Zugriffsdatum 15.10.2021). Abrufbar unter: https://www.gas-dortmund.de/Technologie/GC-IMS-Coupling/1_389.html.
45. G.A.S. Gesellschaft für analytische Sensorsysteme mbH. *Arbeitsprinzip der GC-IMS Technologie* 2021. (letztes Zugriffsdatum 15.10.2021). Abrufbar unter: https://www.gas-dortmund.de/Technologie/IMS-Arbeitsprinzip/0_388.html.

46. Baumbach JI. *Ion mobility spectrometry coupled with multi-capillary columns for metabolic profiling of human breath*. J Breath Res. 2009;3(3):034001.
47. G.A.S. Gesellschaft für analytische Sensorsysteme mbH. *VOCal – Software für GCxIMS Daten* 2021. (letztes Zugriffsdatum 15.10.2021). Abrufbar unter: https://www.gas-dortmund.de/Produkte/Software/VOCal---Software-f%C3%BCr-GC-IMS/0_524.html.
48. G.A.S. Gesellschaft für analytische Sensorsysteme mbH. *BreathSpec® Gaschromatograph-Ionenmobilitätsspektrometer zur Spurenmessung flüchtiger Verbindungen* 2021. (letztes Zugriffsdatum 12.10.2021). Abrufbar unter: https://www.gas-dortmund.de/data-live-gas/docs/pdf/Produkte/BreathSpec/Flyer_BreathSpec_EU_D_1903.pdf.
49. Mentel S, Gallo K, Wagendorf O, Preissner R, Nahles S, Heiland M, Preissner S. *Prediction of oral squamous cell carcinoma based on machine learning of breath samples: a prospective controlled study*. BMC Oral Health. 2021;21(1):500.
50. WHO D. *ICD-Codes, ICD10-Codes, C00-14* 1994 - 2020 updated 20.09.2019. (letztes Zugriffsdatum 22.10.2021). Abrufbar unter: <https://www.dimdi.de/static/de/klassifikationen/icd/icd-10-gm/kode-suche/htmlgm2020/block-c00-c14.htm>.
51. Ajibola OA, Smith D, Spanel P, Ferns GA. *Effects of dietary nutrients on volatile breath metabolites*. J Nutr Sci. 2013;2:e34.
52. Vadhvana B, Belluomo I, Boshier PR, Pavlou C, Spanel P, Hanna GB. *Impact of oral cleansing strategies on exhaled volatile organic compound levels*. Rapid Commun Mass Spectrom. 2020;34(9):e8706.
53. Beauchamp J. *Inhaled today, not gone tomorrow: pharmacokinetics and environmental exposure of volatiles in exhaled breath*. J Breath Res. 2011;5(3):037103.
54. Wilkinson M, White IR, Hamshere K, Holz O, Schuchardt S, Bellagambi FG, Lomonaco T, Biagini D, Di Francesco F, Fowler SJ. *The peppermint breath test: a benchmarking protocol for breath sampling and analysis using GC-MS*. J Breath Res. 2020.
55. Chen X, Wang F, Lin L, Dong H, Huang F, Ghulam Muhammad K, Chen L, Gorlova OY. *Association of Smoking with Metabolic Volatile Organic Compounds in Exhaled Breath*. Int J Mol Sci. 2017;18(11).
56. Capone S, Tufariello M, Forleo A, Longo V, Giampetruzzi L, Radogna AV, Casino F, Siciliano P. *Chromatographic analysis of VOC patterns in exhaled breath from smokers and nonsmokers*. Biomed Chromatogr. 2018;32(4).
57. Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S, Bernstein L, Schoenberg JB, Stemhagen A, Fraumeni JF, Jr. *Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer*. Cancer Res. 1988;48(11):3282-7.
58. Johnson N. *Tobacco use and oral cancer: a global perspective*. J Dent Educ. 2001;65(4):328-39.
59. Roslund K, Lehto M, Pussinen P, Groop PH, Halonen L, Metsala M. *On-line profiling of volatile compounds produced in vitro by pathogenic oral bacteria*. J Breath Res. 2019;14(1):016010.
60. Gross JH. *Massenspektrometrie - Ein Lehrbuch*. 1 ed: Springer Spektrum; 2013. S. 230-231.
61. Spanel P, Dryahina K, Smith D. *A quantitative study of the influence of inhaled compounds on their concentrations in exhaled breath*. J Breath Res. 2013;7(1):017106.

62. de Lacy Costello B, Amann A, Al-Kateb H, Flynn C, Filipiak W, Khalid T, Osborne D, Ratcliffe NM. *A review of the volatiles from the healthy human body*. J Breath Res. 2014;8(1):014001.
63. Herbig J, Beauchamp J. *Towards standardization in the analysis of breath gas volatiles*. J Breath Res. 2014;8(3):037101.
64. Sponring A, Filipiak W, Mikoviny T, Ager C, Schubert J, Miekisch W, Amann A, Troppmair J. *Release of volatile organic compounds from the lung cancer cell line NCI-H2087 in vitro*. Anticancer Res. 2009;29(1):419-26.
65. Filipiak W, Sponring A, Filipiak A, Ager C, Schubert J, Miekisch W, Amann A, Troppmair J. *TD-GC-MS analysis of volatile metabolites of human lung cancer and normal cells in vitro*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2010;19(1):182-95.
66. Kulas P, Seidel M, Bozzato A, Schick B, Sessler DI, Kreuer S, Huppe T. *Volatile organic compounds in head and neck squamous cell carcinoma-An in vitro pilot study*. Biomed Chromatogr. 2020;34(5):e4811.
67. Schmidt K, Podmore I. *Current Challenges in Volatile Organic Compounds Analysis as Potential Biomarkers of Cancer*. J Biomark. 2015;2015:981458.

Anhang

Zu 3.3.1, S. 26

Tabelle 19: Auswertung *Gallery Plot* Plug-in-Modul der Daten, positiver Driftmodus

Kriterien	Area
Area zeigt eine Differenz $\geq 30\%$ zwischen den beiden Gruppen	(27)*, (29)*, (45)*, (47)*, 50, 58, 74, 86, (92)*, 115
Area zeigt eine Differenz $< 30\%$ zwischen dem Vorkommen in den beiden Gruppen	1-26, 28, 30-44, 46, 48, 49, 51-57, 59-73, 75-85, 87-91, 93-109, 119

*Abgleich mit Raumluft ergab bereits im *Gallery Plot* Plug-in-Modul vor detaillierter Auswertung den Ursprung aus der Raumluft

Substanzsignale, die in beiden Projekten eines Driftmodus als Area ausgewertet wurden, sind mit der gleichen Nummerierung versehen. Dies betrifft im positiven Driftmodus die Areas 1–19, 21 – 22, 24 – 29, 31 – 32, 34 – 36, 38 – 44, 46 – 48, 50 – 53, 55 – 61, 63, 67, 69 – 72, 74 – 77, 79, 80, 83 – 86, 88 – 94, 96, 97, 102 – 105, 107, 109, 115, 119.

Zu 3.3.1, S. 28

Tabelle 20: Auswertung *Gallery Plot* Plug-in-Modul der Daten Patientengruppe präoperativ und Kontrollgruppe, negativer Driftmodus

	Area
Area zeigt eine Differenz $\geq 30\%$ zwischen den beiden Gruppen	6, (12)*, 14, 19
Area zeigt eine Differenz $< 30\%$ zwischen dem Vorkommen in den beiden Gruppen	1-5, 7-11, 13, 15-18, 20-38

*Abgleich mit Raumluft ergab bereits im *Gallery Plot* Plug-in-Modul vor detaillierter Auswertung den Ursprung aus der Raumluft

Substanzsignale, die in beiden Projekten eines Driftmodus als Area ausgewertet wurden, sind mit der gleichen Nummerierung versehen. Dies betrifft im negativen Driftmodus die Areas 1–3, 5–7, 12–19, 21–23, 25.

Zu 3.3.2, S. 30

Tabelle 21: Auswertung *Gallery Plot* Plug-in-Modul der Daten Patientengruppe prä- und postoperativ, positiver Driftmodus

Kriterien	Area
Area zeigt eine Differenz von mind. 3 Messpaaren zwischen den postoperativen Veränderungen (Reduktion/Anstieg)	1, (4)*, 16, (34)*, 36, 41, 52, 58, (65)*, 115, 119
Area zeigt eine Differenz < 3 Messpaaren zwischen den postoperativen Veränderungen (Reduktion/Anstieg)	2, 3, 5-15, 18, 21-23, 25, 28, 30, 35, 37, 39, 40, 42, 46, 47, 50, 55, 61, 63, 68-75, 77, 81, 85, 86, 88, 90, 92, 99, 101, 102, 106, 109, 113, 116, 123, 129, 139, 142, 151, 152
Area ist in weniger als 10 Messpaaren vorhanden	17, 19, 20, 24, 26, 27, 29, 31-33, 38, 43-45, 48, 49, 51, 53, 54, 56, 57, 59, 60, 62, 64, 66, 67, 76, 78-80, 82-84, 87, 89, 91, 93-98, 100, 103-105, 107, 108, 110-112, 114, 117, 118, 120-122, 124-128, 130-138, 140, 141, 143-150, 153-156

*Abgleich mit Raumluft ergab bereits im *Gallery Plot* Plug-in-Modul vor detaillierter Auswertung den Ursprung aus der Raumluft

Substanzsignale, die in beiden Projekten eines Driftmodus als Area ausgewertet wurden, sind mit der gleichen Nummerierung versehen. Dies betrifft im positiven Driftmodus die Areas 1 – 19, 21– 22, 24 – 29, 31 – 32, 34 – 36, 38 – 44, 46 – 48, 50 – 53, 55 – 61, 63, 67, 69 – 72, 74 – 77, 79, 80, 83 – 86, 88 – 94, 96, 97, 102 – 105, 107, 109, 115, 119.

Zu 3.3.2, S. 34

Tabelle 22: Auswertung *Gallery Plot* Plug-in-Modul der Daten Patientengruppe prä- und postoperativ, negativer Driftmodus

Kriterien	Area
Area zeigt eine Differenz von mind. 3 Messpaaren zwischen den postoperativen Veränderungen (Reduktion/Anstieg)	6, 14, 19
Area zeigt eine Differenz < 3 Messpaaren zwischen den postoperativen Veränderungen (Reduktion/Anstieg)	1-5, 7-13, 15-18, 20, 21, 23
Area ist in weniger als 10 Messpaaren vorhanden	22, 24-27

Substanzsignale, die in beiden Projekten eines Driftmodus als Area ausgewertet wurden, sind mit der gleichen Nummerierung versehen. Dies betrifft im negativen Driftmodus die Areas 1– 3, 5–7, 12–19, 21–23, 25.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Sophia Mentel, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Analyse von volatilen organischen Verbindungen im menschlichen Atem zur Diagnostik von oralen Plattenepithelkarzinomen – Möglichkeiten und Grenzen“ (Engl.: „Analysis of volatile organic compounds in human breath for the diagnosis of oral squamous cell carcinoma – possibilities and limitations“) 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/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, manuelle Area Auswertung, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet. Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht. Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte. Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe. Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an der erfolgten Publikation

Sophia Mentel hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Mentel S, Gallo K, Wagendorf O, Preissner R, Nahles S, Heiland M, Preissner S. Prediction of oral squamous cell carcinoma based on machine learning of breath samples: a prospective controlled study. BMC Oral Health. 2021 Oct 6;21(1):500. doi: 10.1186/s12903-021-01862-z. PMID: 34615514; PMCID: PMC8496028.

Beitrag im Einzelnen:

Ich habe an der Konzeption des Studiendesigns und der Erstellung des Ethikantrags mitgewirkt und mich umfassend in die Literatur eingelesen. Die Probanden für die Patientengruppe habe ich mit ausgewählt und aufgeklärt. Desweiteren habe ich den größten Teil der Proben der Patientengruppe genommen und die Analyse mittels des GC-IMS-Geräts durchgeführt.

Bei der Untersuchung der Daten habe ich selbstständig die Sortierung und manuelle Area-Markierungen erarbeitet und ausgewertet. Für das Machine Learning habe ich die zu analysierenden Daten sortiert und bereitgestellt. Auf Basis der Daten schrieb ich ein Manuskript und erstellte Figure 1, 2 und 3, sowie alle enthaltenen Tabellen. Nach der Revision habe ich das Manuskript angepasst und verbessert.

Unterschrift, Datum und Stempel der erstbetreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift der Doktorandin

Auszug aus der Journal Summary List

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2019** Selected Editions: SCIE,SSCI
 Selected Categories: **“DENTISTRY, ORAL SURGERY and MEDICINE”**
 Selected Category Scheme: WoS
Gesamtanzahl: 91 Journale

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	PERIODONTOLOGY 2000	5,159	7.718	0.006370
2	JOURNAL OF CLINICAL PERIODONTOLOGY	14,785	5.241	0.013030
3	JOURNAL OF DENTAL RESEARCH	20,557	4.914	0.019860
4	DENTAL MATERIALS	15,316	4.495	0.013450
5	ORAL ONCOLOGY	10,286	3.979	0.015760
6	INTERNATIONAL ENDODONTIC JOURNAL	7,453	3.801	0.006650
7	JOURNAL OF PERIODONTOLOGY	16,306	3.742	0.010140
8	CLINICAL ORAL IMPLANTS RESEARCH	14,178	3.723	0.013940
9	Clinical Implant Dentistry and Related Research	4,496	3.396	0.008270
10	JOURNAL OF DENTISTRY	9,650	3.242	0.011300
11	JOURNAL OF ENDODONTICS	16,951	3.118	0.012280
12	International Journal of Oral Science	1,204	3.047	0.002020
13	JOURNAL OF PERIODONTAL RESEARCH	4,315	2.926	0.004240
14	Molecular Oral Microbiology	993	2.905	0.001720
15	Clinical Oral Investigations	6,849	2.812	0.011470
16	JOURNAL OF THE AMERICAN DENTAL ASSOCIATION	6,967	2.803	0.004990
17	Journal of Prosthodontic Research	1,283	2.662	0.002150
18	European Journal of Oral Implantology	1,227	2.619	0.002230
19	ORAL DISEASES	4,463	2.613	0.005080

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
20	JOURNAL OF ORAL PATHOLOGY & MEDICINE	4,741	2.495	0.003850
21	JOURNAL OF PROSTHETIC DENTISTRY	12,491	2.444	0.008950
22	Journal of Evidence-Based Dental Practice	585	2.426	0.001050
23	JOURNAL OF ADHESIVE DENTISTRY	1,793	2.379	0.002150
24	INTERNATIONAL JOURNAL OF ORAL & MAXILLOFACIAL IMPLANTS	9,035	2.320	0.008380
25	JOURNAL OF ORAL REHABILITATION	5,827	2.304	0.004300
26	EUROPEAN JOURNAL OF ORAL SCIENCES	3,581	2.220	0.002600
27	OPERATIVE DENTISTRY	3,850	2.213	0.003790
28	EUROPEAN JOURNAL OF ORTHODONTICS	4,569	2.202	0.003380
29	Journal of Prosthodontics-Implant Esthetic and Reconstructive Dentistry	2,848	2.187	0.003080
30	CARIES RESEARCH	4,324	2.186	0.002510
31	COMMUNITY DENTISTRY AND ORAL EPIDEMIOLOGY	4,642	2.135	0.002920
32	International Journal of Implant Dentistry	348	2.111	0.001040
33	INTERNATIONAL JOURNAL OF ORAL AND MAXILLOFACIAL SURGERY	8,467	2.068	0.009460
34	INTERNATIONAL DENTAL JOURNAL	2,216	2.038	0.001500
35	International Journal of Paediatric Dentistry	2,164	1.993	0.001720
36	AMERICAN JOURNAL OF ORTHODONTICS AND DENTOFACIAL ORTHOPEDICS	13,348	1.960	0.005780
37	ARCHIVES OF ORAL BIOLOGY	7,760	1.931	0.007120
38	BMC Oral Health	2,829	1.911	0.005740
39	Head & Face Medicine	831	1.882	0.001210

Selected JCR Year: 2019; Selected Categories: "DENTISTRY, ORAL SURGERY and MEDICINE"

RESEARCH

Open Access

Prediction of oral squamous cell carcinoma based on machine learning of breath samples: a prospective controlled study



Sophia Mentel¹, Kathleen Gallo², Oliver Wagendorf¹, Robert Preissner², Susanne Nahles¹, Max Heiland¹ and Saskia Preissner^{1*}

Abstract

Background: The aim of this study was to evaluate the possibility of breath testing as a method of cancer detection in patients with oral squamous cell carcinoma (OSCC).

Methods: Breath analysis was performed in 35 OSCC patients prior to surgery. In 22 patients, a subsequent breath test was carried out after surgery. Fifty healthy subjects were evaluated in the control group. Breath sampling was standardized regarding location and patient preparation. All analyses were performed using gas chromatography coupled with ion mobility spectrometry and machine learning.

Results: Differences in imaging as well as in pre- and postoperative findings of OSCC patients and healthy participants were observed. Specific volatile organic compound signatures were found in OSCC patients. Samples from patients and healthy individuals could be correctly assigned using machine learning with an average accuracy of 86–90%.

Conclusions: Breath analysis to determine OSCC in patients is promising, and the identification of patterns and the implementation of machine learning require further assessment and optimization. Larger prospective studies are required to use the full potential of machine learning to identify disease signatures in breath volatiles.

Keywords: Breath analysis, Head and neck cancer, Oral squamous cell carcinoma, Oral cancer, Machine learning, Gas chromatography–ion mass spectrometry, Volatile organic compounds

Background

Approximately 354,864 new cases of oral cancer are diagnosed annually, and the number, which was associated with 177,384 deaths in 2018, is steadily increasing [1]. About 90% of oral cancers diagnosed are oral squamous cell carcinomas (OSCCs), which result in malignancies in men at least twice as often as women [2]. In Germany,

the 5-year survival rate of patients diagnosed with OSCC varies between 63% (female) and 47% (male) [3]. Mortality is associated with the high recurrence rate and metastases of OSCC, and the delayed diagnosis of the disease [4, 5]. Only one-third of OSCC are discovered at an early stage (0–I) [6, 7]. Therefore, the development of tests that enhance our capacity to screen high-risk (e.g. heavy tobacco and alcohol abuse) [8] and post-therapy patients is of great interest.

Breath analysis is not burdensome to patients, and is a rapid, non-invasive and inexpensive cancer screening tool. Its use has already been determined to be a promising approach to detect and differentiate various diseases,

*Correspondence: saskia.preissner@charite.de

¹ Department Oral and Maxillofacial Surgery, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Corporate Member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin, and Berlin Institute of Health, Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin, Germany
Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2021. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

gastrointestinal conditions, and cancer types, such as lung, breast, colorectal cancer [9–12]. In every exhaled human breath, specific volatile organic compounds (VOC) that are byproducts of normal cell metabolism can be identified. These compounds are also present in biofluids such as blood, saliva, urine and feces [13, 14]. The concentrations and types of VOCs present in the exhaled breath of cancer patients compared to healthy individuals may differ based on differences in levels of oxidative stress, which are enhanced in tumor tissues [15, 16]. Gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC–MS) is considered the gold standard for VOC screening. However, the E-nose technique, which is based on breath analysis, has produced promising results in OSCC patients as well [17–19]. Schmutzhard et al. [20] showed that a significant difference between VOC data from cancer patients relative to the two control groups could be detected using proton transfer-reaction-mass spectrometry (PTR-MS). A study published by Hakim et al. [21] revealed that data produced via GC–MS could be used to detect statistically significant differences between the breath compositions of three evaluated groups (OSCC/lung cancer/control). Further, the authors were able to distinguish groups using a Nanoscale Artificial Nose. Gruber et al. [22] published a feasibility study comparing OSCC patients, benign tumor patients and healthy controls that identified three potential biomarkers of OSCC using GC–MS. Bouza et al. [23] concluded that aldehyde compounds had the capacity to function as OSCC biomarkers when detected using solid-phase micro extraction followed by GC–MS. Further, Hartwig et al. [24] published a pilot study that revealed the absence of three specific VOCs after curative surgery for OSCC when compared to a patient's initial GC–MS spectrum, which indicated a correlation between OSCC and the specific VOCs identified.

Machine learning is a computational branch that emulates human intelligence by learning from big data, and is applied in various fields, such as finances, entertainment or biological and medical applications to detect patterns which are hard or impossible to see for the human eye [25]. During the last years, a wide range of machine learning approaches were developed for the early diagnosis of different kinds of cancer from images. These include breast cancer detection by analyzing digitized images of fine needle aspirates of breast masses [26], lung cancer prediction from computed tomography images [27, 28] and brain cancer detection using magnetic resonance imaging [29]. Recent developments even include mobile applications for the detection of skin diseases via user-provided images, which are widely applicable and easy to use [30].

The aim of this study was to evaluate breath samples before and after surgery in a larger cohort using machine learning to compare OSCC patients with healthy smokers to optimize the identification of signatures of OSCC using a recently introduced gas chromatography–ion mobility spectrometry (GC–IMS)-based method. Further, we aim to enhance the applicability of the test by improving the detection of OSCC specific IMS signals that may be used to determine a VOC signature in future studies.

Patients and methods

Study population

In this prospective controlled study we collected breath samples from 55 patients with potential OSCC, as well as 50 breath samples from healthy controls. The Ethics committee of the University formally approved the study (EA1/203/19). Written informed consent for study participation was obtained from study participants. All methods were carried out in accordance with relevant guidelines and regulations.

Patients between the age of 18 and 85 with OSCC in the oral cavity and oropharynx with surgical therapy pending were included in the study. Exclusion criteria included a diagnosis of other severe internal accompanying diseases, HIV infection and a Karnofsky performance status scale of less than 50%. All participants in the control group were required to be daily smokers, at least 18 years old and lack known malignant pre-existing conditions.

Sampling

Standardization of sampling in terms of location and patient instruction was known to be crucial from the literature and our pre-tests. Patients were instructed to fast at least 6 h before sampling and refrain from cleaning their teeth with toothpaste or mouthwash. Samples were also taken in a healthy control group under the same conditions and instructions. Patients were instructed to breathe a few times through the slightly opened mouth. Air from each participant's breath was collected using a 5 mL Luer syringe directly from the mouth. During transport, each syringe was closed with a stopper to prevent contamination. The procedure was repeated twice. All samples were analyzed within 20 min. Additionally, two syringes filled with room air were analyzed.

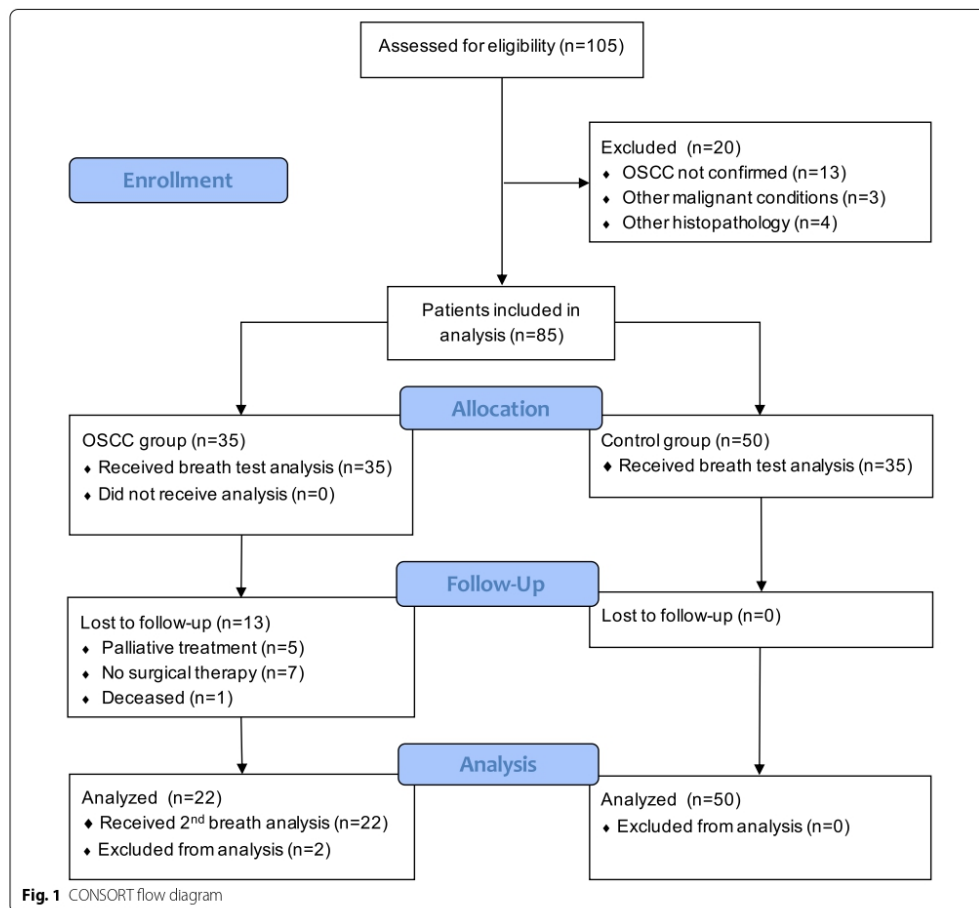
If analysis within 20 min was not possible ($n = 2$), the sample was transferred to a single use mylar bag (Quin-Tron, Milwaukee, WI, USA), stored at room temperature and analyzed within 24 h [31]. During analysis we made sure that these samples did not differ significantly from the other samples. Sampling always took place the morning before surgery or panendoscopy.

Gas chromatography/ion mass spectrometry (GC/IMS)

Breath sample analysis was executed using BreathSpec® (GAS Dortmund, Germany). The device facilitated two-fold separation via GC combined with IMS to detect gaseous compounds in a mixture of analytes. VOCs were pre-separated based on their retention times via GC and detected using an IMS electrometer based on specific drift times needed to travel a fixed distance (drift tube) in a defined electric field.

Samples were injected using a 5 mL-Luer-syringe via a Luer-Lock-Adapter into the BreathSpec® (GAS Dortmund, Germany). Samples were heated to 60 °C while passing through the first transfer line and were pumped

into the sample loop (40 °C). A carrier gas transported the sample gas in the loop to the GC column (60 °C). During the first separation, different VOCs pass through the GC capillary column (30 m × 0.53 mm, 0.5 µm) at various speeds due to their different retention times. Next, when passing through the second transfer line (60 °C), separated compounds consecutively are fed into the IMS ionization chamber (45 °C). The first separation reduces levels of competition between analytes for reactant ions and enhances the sensitivity of IMS detection. VOCs are softly chemical-ionized initiated by a low-radiation tritium (H3) source. The collision between fast electrons emitted from the β-radiator (H3) with an inserted



reagent gas, which is followed by a cascade of reactions, generates reactant ions. This forms the so-called reaction ion peak (RIP), which represents the number of ions available. The chemical ionization of analytes by reactant

ions creates specific analyte ions, as long as the affinity of the analyte to the reactant ion is greater than its affinity to water, which is typical for all heteroatom-organic compounds. Specific analyte ions travel at atmospheric

Table 1 Characteristics of OSCC patients: Age, sex (m: male, f: female), smoking habits (+: smoker, -: non-smoker, +a: former smoker), ICD 10 code (*: recurrence), TNM classification

Patient no	Age	Sex	Smoker	ICD 10	Location	TNM
1	76	M	-	C03.1	Lower gum	T4a N0 M0
2	52	M	+	C03.1	Lower gum	T4a N1 M0
3	61	M	+	C02.1	Border of tongue	T2 N0 M0
4	59	M	+	C04.0	Anterior floor of mouth	T1 N0 M0
5	62	M	+	C04.1	Lateral floor of mouth	T3 N3b M0
6	53	M	+a	C02.1	Border of tongue	T1 N0 M0
7	80	F	+	C03.0	Upper gum	T4a N2c M0
8	60	F	-	C02.1	Border of tongue	T1 N0 M0
9	76	F	+	C04.0	Anterior floor of mouth	T1 N0
10	86	F	+a	C02.1	Border of tongue	T3 N3b M1
11	74	F	+	C04.0	Anterior floor of mouth	T1 N0 M0
12	89	M	+	C05.0*	Hard palate	T4a N0 M0
13	81	M	-	C03.0	Upper gum	T4a N0 M0
14	63	M	+	C02.1	Border of tongue	T3 N3b M0
15	76	M	+	C04.8	Overlapping lesion of floor of mouth	T3 N1 M0
16	61	M	+a	C03.1	Lower gum	T4a N0 M0
17	63	F	+	C14.8	Overlapping lip, oral cavity	T4a N1 M0
18	75	M	-	C05.1	Soft palate	T1 N1
19	71	M	-	C06.0	Cheek mucosa	T1 N0 M0
20	72	M	+	C03.1	Lower gum	T4a N3b M0
21	49	M	+	C03.1	Lower gum	T4a N0 M0
22	58	F	-	C02.1	Border of tongue	T1 N0 M0
23	62	M	+	C06.0	Cheek mucosa	T4 N2 M0
24	83	M	+	C02.0	Dorsal surface of tongue	T2 N0 M0
25	63	F	+	C04.8	Overlapping lesion of floor of mouth	T4b N2 M0
26	63	F	+	C05.0	Hard palate	T3 N2c
27	88	M	+a	C03.1	Lower gum	T4b N2 M0
28	43	M	+	C02.0*	Dorsal surface of tongue	T4 N0 M0
29	81	F	-	C06.0	Cheek mucosa	T4a N0 M0
30	44	M	+	C05.0	Hard palate	T4a N2 M0
31	83	M	+	C04.9	Floor of mouth	T2 N0 M0
32	58	M	-	C04.8*	Overlapping lesion of floor of mouth	T3 N0 M1
33	62	M	-	C02.1	Border of tongue	T1 N0 M0
34	65	M	+	C04.0	Anterior floor of mouth	T2 N0 M0
35	61	F	-	C03.1	Lower gum	T1 N0 M0

Table 2 Summary table of the cohort

	Male	Female	Smoker	Non-smoker	Former smoker	T1/2	T3/4
Before surgery	24	11	21	10	4	14	21
After surgery	15	7	13	6	3	9	13

pressure versus a flow of inert drift gas in the drift tube, and the resulting ion current is measured using an electrometer (drift length: 98 mm, electrical field strength: 500 V/cm). IMS measurements are extremely fast (30 ms/spectrum). The mass and geometric structure of an ion determines the drift time of each substance. Therefore, IMS can differentiate isomeric molecules.

To perform analyses, two breath samples and two room air samples were taken from each participant. One sample of the patient's breath and one of the surrounding air was analyzed using the positive drift voltage IMS mode and one of each of the breath and air samples were assessed using the negative drift voltage mode. The total processing time for one sample was 10 min.

VOC analysis

For visualization and analysis of data, a software provided by the manufacturer was used (VOCal, Dortmund, Germany). GC separation of VOCs divided compounds based on their retention times in the capillary, which resulted in an offset feed into IMS and generated coordinates on the y-axis of the pictorial representation. IMS was used to separate compounds according to their specific drift times in an electric field, which have been displayed as coordinates on the x-axis. These data produce a two-dimensional visualization scheme. The quantification of compounds was performed down to the low parts per billion (ppb) level, and data were used to create a z-axis in the software. Signal intensity was correlated with the analyte concentration of a sample. For analysis, individual signals were marked manually, and signal intensity changes and the presence of recurring patterns were identified using tools in the software.

Machine learning

To work with the 2-dimensional images, which were produced using the manufacturer's software, they were first transformed into integer arrays. To achieve this, the "Image module" from the Python library pillow (<https://pillow.readthedocs.io/en/stable/reference/Image.html>) was used to load the images. After successfully transferring the images into the Python script, they were subsequently converted to numpy arrays (<https://numpy.org/>), using the function "asarray". The resulting array consists of integer values specifying the color of each pixel in RGB format (<https://htmlcolorcodes.com/>), so for each pixel in the original image, three color values are produced

that represent its respective amount of red, green and blue. Furthermore, to assure all images were of the same size, all images were reshaped to a standard format of 200 × 200 pixels using the numpy function "resize", since even a difference in size by one pixel could potentially influence the results. As a last step, to ensure an equal importance of each feature, the multidimensional array representing the color values was collapsed into a 1-dimensional array using the numpy function "ravel".

To identify the best performing classifier, a number of different models were evaluated, including random forest [32], logistic regression [33], K nearest neighbors [34], and linear discriminant analysis [35]. All methods are implemented in the Python library Scikit-Learn (<https://scikit-learn.org/stable/>), and used with the respective recommended initial parameters. To build each model, depending on the comparison in question, the images were separated into the two categories of "true" and "false" respectively. To train and evaluate the performance of each model, the data was split into training and test set. The training set was used as input for the machine learning model, while the test set was held back so it remained completely unknown to the machine learning model. After finishing the training, each image in the test set was then predicted by the machine learning model to be "true" or "false" and it was assessed if the model did the correct prediction. The prediction accuracy of each model was analyzed multiple times with varying sizes of training and test set. Initially, a tenfold cross-validation was performed [36], where the data set is split into 10 equally sized parts. Each of the 10 subsets is then used once as test set, with the remaining 9 parts being the training set for this specific case.

Additionally, the recall was evaluated using the leave-one-out methodology [37]. In this case, the test set consists only of a single data sample, while all remaining samples were used as a training set to build the model. Here, each image was used once as a test sample and therefore left out while training the model. Subsequently, the left-out test sample was predicted and the prediction was determined to be either true or false.

Results

Manual VOC evaluation

The study population consisted of 55 patients with suspected OSCC before surgery and 50 healthy control subjects. After applying exclusion criteria, some patients could not be included in the final data analysis (Fig. 1).

(See figure on next page.)

Fig. 2 Comparison of pre- and postoperative measurements. The heat map shows 25 areas of Interest revealed using 44 measurements of 22 patients before and after surgery in negative drift mode. Certain VOCs are present in all samples (areas 1, 2, 5, 9), and display different signal intensity (concentration), others are inconsistently observed (e.g. areas 6, 12, 14, 17, 20), and some VOCs are present in exclusively pre- or postoperative samples (e.g. areas 24 and 25)

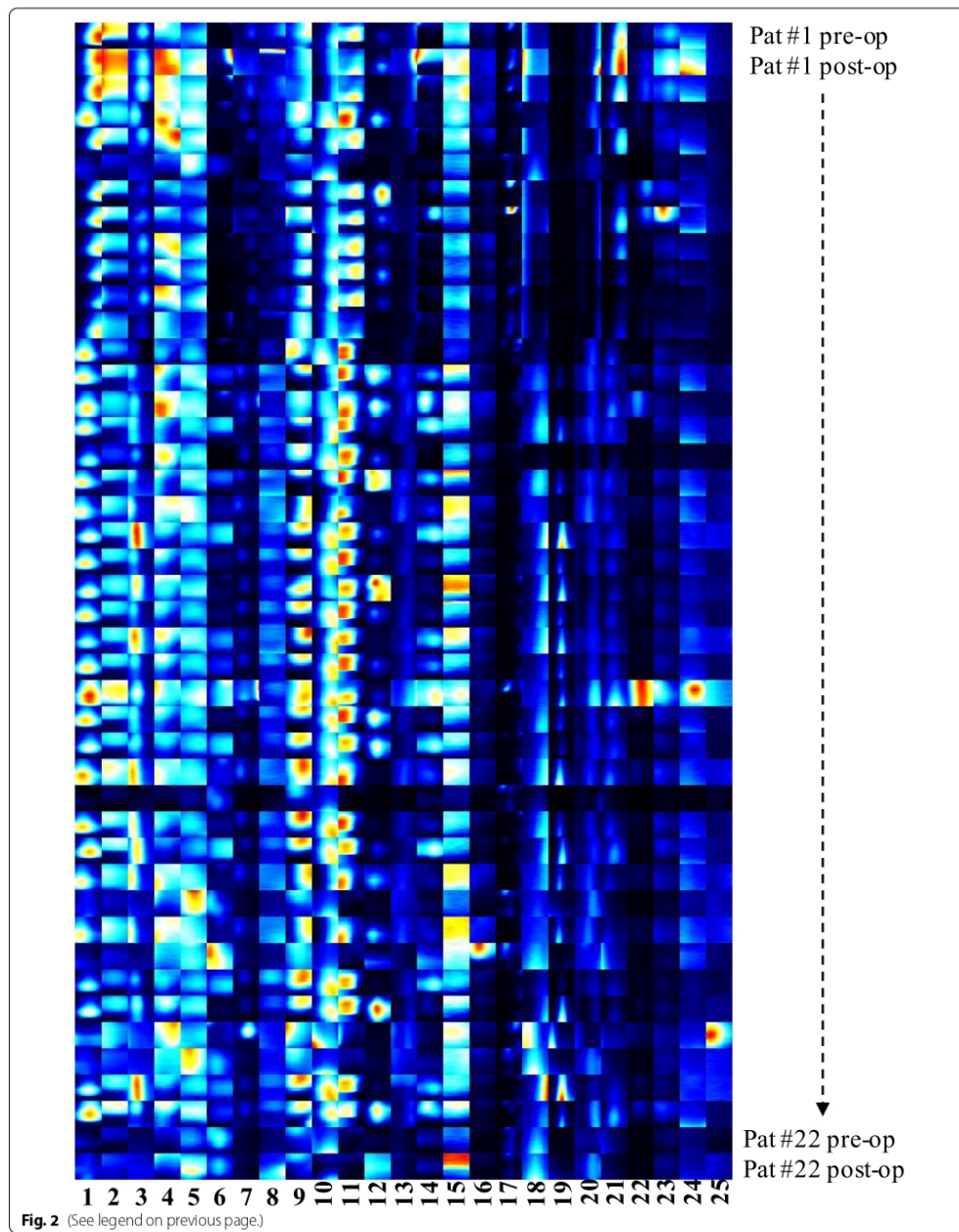


Table 3 Intensity changes in IMS signals between pre- and postoperative measurements: Area no. 1–25 (see Fig. 2), preoperative and postoperative signal count (n of 22 patients with IMS signal in measurement), Δ of IMS signal intensity (0: no or little changes, +: increased signal, -: decreased signal)

Area no	Preoperative signal count	Postoperative signal count	Δ of IMS signal
1	21/22	20/22	0
2	21/22	19/22	0
3	20/22	17/22	+
4	21/22	17/22	-
5	20/22	18/22	+
6	13/22	19/22	+
7	20/22	14/22	0
8	16/22	13/22	0
9	22/22	22/22	0
10	16/22	13/22	0
11	20/22	15/22	-
12	12/22	15/22	+
13	15/22	12/22	-
14	13/22	13/22	0
15	21/22	16/22	-
16	20/22	11/22	-
17	7/22	11/22	0
18	11/22	14/22	+
19	10/22	12/22	+
20	4/22	13/22	+
21	17/22	17/22	0
22	9/22	9/22	0
23	19/22	18/22	0
24	0/22	2/22	0
25	1/22	0/22	0

The preoperative analysis consisted of 35 patients (24 men and 11 women) with an average age of 67.2 years. According to their medical history, 21 participants were smokers (60%), four were former smokers, ten were non-smokers (28.6%) (Tables 1 and 2).

Postoperative sampling was carried out in 22 patients (some were lost during follow-up, Fig. 1). Breath samples were taken approximately 12 days after surgery. The control group included 50 healthy smokers (25 men and 25 women), with an average age of 55 years.

To compare the occurrence of different VOC areas in the population and between preoperative and postoperative patients, signals in the visual representation that corresponded to substances in analyzed air were manually marked in all measurements. Data from one patient were placed in chronological order and compared using

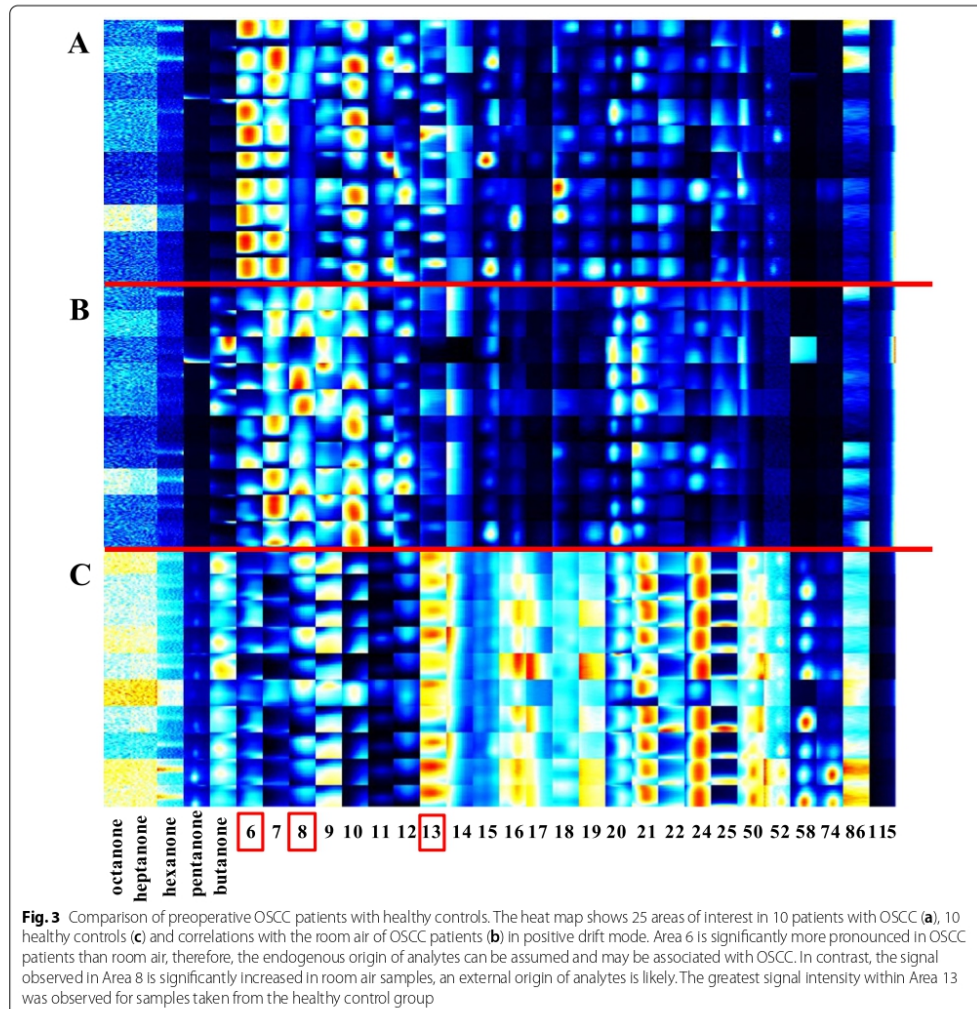
marked signal areas. It was revealed that certain substances occurred in almost all patients (areas 1, 2, 5, 9), while others appeared regularly, but not in every sample. Others were found very sporadically (areas 6, 12, 14, 17, 20) and some areas were exclusively present in pre- or postoperative samples (areas 24, 25). (Fig. 2, Table 3). Some areas were overlapped by VOCs of disinfectants (e.g. ethanol) and were therefore excluded from further analysis.

Signal intensity changes were also assessed. Many signals differed in intensity depending on whether the analysis was preoperative or postoperative, and an increased intensity was associated with an elevated concentration of the respective substance in a sample. In general, signals detected within postoperative samples tended to be elevated relative to preoperative samples. A comparison of OSCC patients and the control group showed that the number and intensity of signals in healthy participants was elevated relative to OSCC patients (Fig. 3). In some cases, the precise evaluation of the control group was difficult due to the presence of overlap between strongly pronounced signals.

Machine learning

In the tenfold cross-validation process, pre- and postoperative samples in positive drift mode could only be distinguished with a highest average accuracy of 0.65 (Fig. 4a). For samples in negative drift mode, however, a highest average accuracy of 0.89 was obtained (Fig. 4b). Additionally, differentiating between preoperative tumor samples and healthy smoker samples using positive and negative drift mode could be done with a highest average accuracy of 0.90 and 0.86, respectively (Fig. 4c, d).

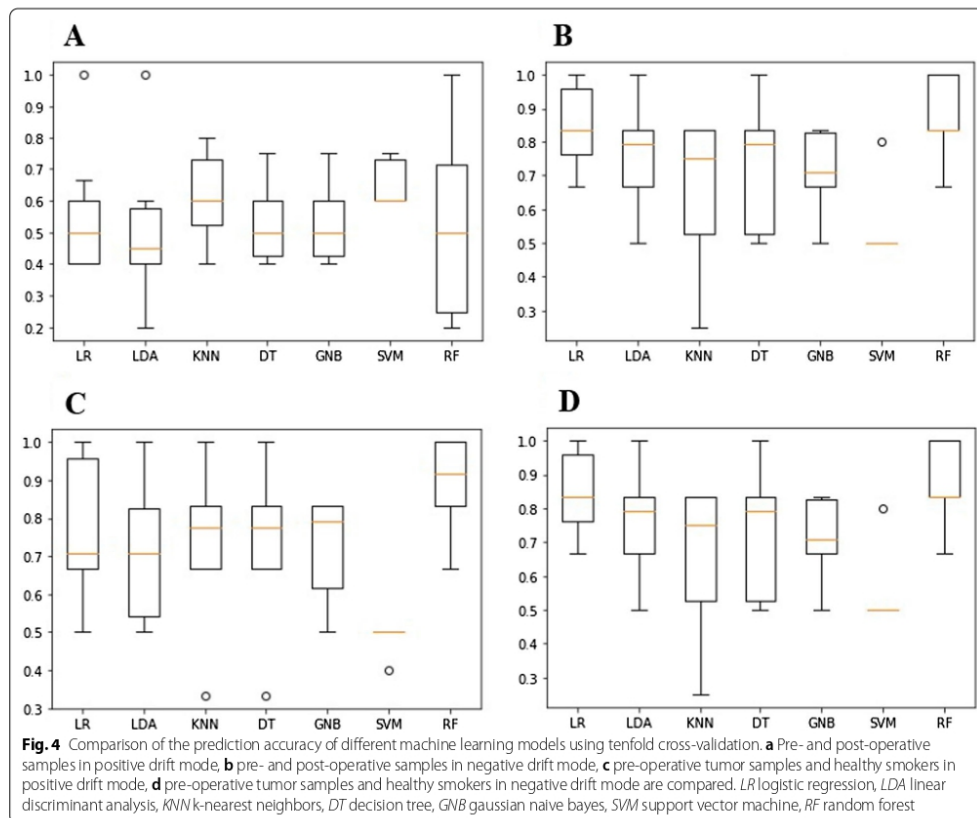
The estimated accuracy of the models was further confirmed using leave-one-out cross-validation, where logistic regression was determined to be the best performing method overall. For pre- and postoperative samples assessed in positive drift mode, 35 of 61 images (57%) were classified correctly (Additional file 1: Table S1). For samples assessed using negative drift mode this ratio improved to 43 of 58 (74%, Additional file 1: Table S2). Samples collected from preoperative tumor patients and healthy smokers were better differentiated. In samples assessed using positive drift mode, 60 of 72 samples (83%) were classified correctly (Additional file 1: Table S3), and in negative drift mode, 61 of 72 (85%) were predicted correctly (Additional file 1: Table S4). Additionally, we created sub-groups matching patients with either T1/2 (18 of 23) or T3/4 (28 of 33) tumors, female or male patients (16 of 35) and smoker or non-smoker (24/31) resulting in lower accuracies.



Discussion and conclusion

This study showed that sampling exhaled air from the oral cavity using disposable syringes and subsequent processing is possible by following a standardized protocol. This eliminates the time-consuming intermediate step of storing samples before analyzing that has been used frequently to date [9, 38]. Sampling was a quick procedure that was easy to carry out and to learn

for the practitioner. Since it is a non-invasive method, patient acceptance was very high. In this study, no patient refused to participate. Data analysis, however, was more complicated and required a trained user with current knowledge of the method. The targeted, pre-selection of relevant substances and automated analysis of specific patterns is needed to make breath testing user-friendly, error-free and widely applied in the future. A critical



point in the study design was to define the healthy volunteers as smokers. The design aimed to make sure that signals from smoking habits would not mislead to the conclusion that by-products, from smoking are associated with OSCC, as also low-nicotine cigarettes lead to distortions in exhaled breath [39]. As some OSCC patients were self-reported non-smokers or former smokers, a control group should have been divided into smokers and non-smokers.

Various factors significantly influence the measurement data including food supply, oral hygiene, oral flora, the existence of other severe pre-existing malignant conditions, and the composition of air within the room [40–42]. To minimize these factors, samples from OSCC patients were consistently taken in the morning to observe a sobriety phase of at least 6 h. In addition,

patients were asked to refrain from cleaning their teeth with toothpaste or mouthwash before sampling. Other pre-existing malignant conditions were an exclusion criterion for study participation. Even with these precautions, substances were present that were believed to be caused by food and oral hygiene products. A longer fasting episode may be necessary for completely eliminating these types of by-products. Two breath samples had to be stored in Mylar bags according to a widely accepted standard and we double-checked these samples prior to analysis, but some compounds/signals may have been not stable until GC/IMS [31, 43]. It was difficult to ensure the sobriety of participants in the control group and prevent their use of oral hygiene products. This may have explained the enhanced intensity of signals observed for the group [44]. Also, substances from inhaled room air

were recognizable in breath samples. Since these were hospital rooms, specific substances such as disinfectants were present in high quantities.

A comparison between OSCC patients and healthy smokers showed that certain substances were more prevalent in OSCC patients than healthy smokers (Fig. 3). For example, area 11 was significantly more pronounced in healthy participants than OSCC patients. Since area 11 was present in the lowest quantities in room air, it seems to be an endogenous human substance, which may be reduced as a result of OSCC. The structure of the compound should be evaluated in subsequent studies. A comparison between pre- and postoperative data revealed some substances that showed similar changes, e.g. the IMS signals of areas 4, 11, 13, 15, and 16 decreased postoperatively (Fig. 2, Table 3).

Our results showed that a detailed breakdown of single substances within samples is complex, and that patient compliance with detailed instructions is extremely important. The identification of purely endogenous substances associated with OSCC is difficult [45]. An increased intensity of signals in postoperative samples may be explained by worsened oral hygiene after surgery as a result of intraoral wounds [46].

Machine learning was able to distinguish between the OSCC patients and healthy volunteers. With an increased amount of data, the differentiation between pre- and postoperative patients might be possible as well to find out signals that may be emitted exclusively by tumor tissues. This is supported by the encouraging tenfold cross-validation result for samples in negative drift mode, where an average accuracy of 0.89 could be attained. This accuracy needs to be further evaluated with a larger patient cohort. In a larger cohort, a subgroup analysis of different tumor sizes, sex and smoking status will be interesting as well. Furthermore, it has to be noted, that the models are currently optimized to achieve an optimal overall accuracy.

At this stage, the testing of high-risk patients for OSCC is not yet feasible. Further studies focussing on (1) pattern recognition using machine learning in a larger cohort and (2) in vitro studies of tumor tissues using GC/MS to find out about specific VOCs with the help of libraries [47] must be carried out. The present study showed that breath sampling using GC/IMS was user-friendly and revealed results for the determination of OSCC in breath samples using machine learning with the highest achieved average accuracy of 86–90% when compared to healthy individuals. It also showed that breath sampling remains prone to interferences by by-products, so that further studies with much larger

cohorts are necessary to remove interferences before going on with the development of an e-Nose that may be usable for early detection of OSCC.

Abbreviations

OSCC: Oral squamous cell carcinoma; GC-IMS: Gas chromatography coupled with ion mobility spectrometry; VOC: Volatile organic compounds; GC-MS: Gas chromatography coupled with mass spectrometry; ppb: Parts per billion.

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s12903-021-01862-z>.

Additional file 1. Tables S1–4 provide details of the machine learning results.

Acknowledgements

The authors would like to thank Dr. Anna Vogt for her help in patient recruitment.

Authors' contributions

SM was involved in breath sampling, breath analysis, later analyzed and interpreted data, wrote the first version of the manuscript, designed figures. KG analyzed and interpreted data, developed machine learning approach. OW was involved in breath sampling, preliminary breath analysis. RP was involved in interpretation of the machine learning data. SN analyzed and interpreted data. MH analyzed and interpreted data. SP conceived the study, performed the analysis, wrote the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Funding

Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL. This work was funded by the German Research Foundation (DFG; PR 1562/1-1).

Availability of data and materials

The datasets used are available from the corresponding author on reasonable request.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

The Ethical Review Committee of Charité – University Medicine Berlin approved the retrospective analysis of our patient data (EA1/203/19). Written informed consent for study participation was obtained from study participants.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹Department Oral and Maxillofacial Surgery, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Corporate Member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin, and Berlin Institute of Health, Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin, Germany. ²Science-IT and Institute of Physiology, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Corporate Member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin, and Berlin Institute of Health, Philippstrasse 12, 10115 Berlin, Germany.

Received: 30 April 2021 Accepted: 24 September 2021

Published online: 06 October 2021

References

- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394–424.
- Lippman SM, Spitz M, Trizna Z, Benner SE, Hong WK. Epidemiology, biology, and chemoprevention of aerodigestive cancer. *Cancer*. 1994;74(9 Suppl):2719–25.
- Fakhry C, Westra WH, Wang SJ, van Zante A, Zhang Y, Rettig E, Yin LX, Ryan WR, Ha PK, Wentz A, et al. The prognostic role of sex, race, and human papillomavirus in oropharyngeal and nonoropharyngeal head and neck squamous cell cancer. *Cancer*. 2017;123(9):1566–75.
- Denaro N, Merlano MC, Russi EG. Follow-up in head and neck cancer: Do more does it mean do better? A systematic review and our proposal based on our experience. *Clin Exp Otorhinolaryngol*. 2016;9(4):287–97.
- Gigliotti J, Madathil S, Makhoul N. Delays in oral cavity cancer. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2019;48(9):1131–7.
- Jones TM, Hargrove O, Lancaster J, Fenton J, Shenoy A, Roland NJ. Waiting times during the management of head and neck tumours. *J Laryngol Otol*. 2002;116(4):275–9.
- Pitiphat W, Diehl SR, Laskaris G, Cartos V, Douglass CW, Zavras AI. Factors associated with delay in the diagnosis of oral cancer. *J Dent Res*. 2002;81(3):192–7.
- Petti S. Lifestyle risk factors for oral cancer. *Oral Oncol*. 2009;45(4–5):340–50.
- Finamore P, Scarlata S, Incalzi RA. Breath analysis in respiratory diseases: state-of-the-art and future perspectives. *Expert Rev Mol Diagn*. 2019;19(1):47–61.
- Oakley-Girvan I, Davis SW. Breath based volatile organic compounds in the detection of breast, lung, and colorectal cancers: a systematic review. *Cancer Biomark*. 2017;21(1):29–39.
- Rondanelli M, Perdoni F, Infantino V, Faliva MA, Peroni G, Iannello G, Nichetti M, Alalwan TA, Perna S, Cocuzza C. Volatile organic compounds as biomarkers of gastrointestinal diseases and nutritional status. *J Anal Methods Chem*. 2019;2019:7247802.
- Saktiawati AMI, Putera DD, Setyawan A, Mahendradhata Y, van der Werf TS. Diagnosis of tuberculosis through breath test: a systematic review. *EBioMedicine*. 2019;46:202–14.
- Chandran D, Ooi EH, Watson DI, Kholmurodova F, Jaenisch S, Yazbeck R. The use of selected ion flow tube-mass spectrometry technology to identify breath volatile organic compounds for the detection of head and neck squamous cell carcinoma: a pilot study. *Medicina (Kaunas)*. 2019;55(6):306.
- Amann A, Costello Bde L, Miekisch W, Schubert J, Buszewski B, Pleil J, Ratcliffe N, Risby T. The human volatilome: volatile organic compounds (VOCs) in exhaled breath, skin emanations, urine, feces and saliva. *J Breath Res*. 2014;8(3):034001.
- Halliwel B. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? *Biochem J*. 2007;401(1):1–11.
- Buljubasic F, Buchbauer G. The scent of human diseases: a review on specific volatile organic compounds as diagnostic biomarkers. *Flavour Fragr J*. 2015;30(1):5–25.
- Leunis N, Boumans ML, Kremer B, Din S, Stobberingh E, Kesels AG, Kross KW. Application of an electronic nose in the diagnosis of head and neck cancer. *Laryngoscope*. 2014;124(6):1377–81.
- van de Goor R, Hardy JCA, van Hooren MRA, Kremer B, Kross KW. Detecting recurrent head and neck cancer using electronic nose technology: a feasibility study. *Head Neck*. 2019;41(9):2983–90.
- van Hooren MR, Leunis N, Brandsma DS, Dingemans AC, Kremer B, Kross KW. Differentiating head and neck carcinoma from lung carcinoma with an electronic nose: a proof of concept study. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2016;273(11):3897–903.
- Schmutzhard J, Rieder J, Deibl M, Schwentner IM, Schmid S, Lirk P, Abraham I, Gunkel AR. Pilot study: volatile organic compounds as a diagnostic marker for head and neck tumors. *Head Neck*. 2008;30(6):743–9.
- Hakim M, Billan S, Tisch U, Peng G, Dvorkind I, Marom O, Abdah-Bortnyak R, Kuten A, Haick H. Diagnosis of head-and-neck cancer from exhaled breath. *Br J Cancer*. 2011;104(10):1649–55.
- Gruber M, Tisch U, Jerjes R, Amal H, Hakim M, Ronen O, Marshak T, Zimmerman D, Israel O, Amiga E, et al. Analysis of exhaled breath for diagnosing head and neck squamous cell carcinoma: a feasibility study. *Br J Cancer*. 2014;111(4):790–8.
- Bouza M, Gonzalez-Soto J, Pereira R, de Vicente JC, Sanz-Medel A. Exhaled breath and oral cavity VOCs as potential biomarkers in oral cancer patients. *J Breath Res*. 2017;11(1):016015.
- 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;157(6):981–7.
- Bi Q, Goodman KE, Kaminsky J, Lessler J. What is machine learning? A primer for the epidemiologist. *Am J Epidemiol*. 2019;188(12):2222–39.
- Turkki R, Byckhov D, Lundin M, Isola J, Nordling S, Kovanen PE, Verrill C, von Smitten K, Joensuu H, Lundin J, et al. Breast cancer outcome prediction with tumour tissue images and machine learning. *Breast Cancer Res Treat*. 2019;177(1):41–52.
- Ardila D, Kiraly AP, Bharadwaj S, Choi B, Reicher JJ, Peng L, Tse D, Etemadi M, Ye W, Corrado G, et al. End-to-end lung cancer screening with three-dimensional deep learning on low-dose chest computed tomography. *Nat Med*. 2019;25(6):954–61.
- Thawani R, McLane M, Beig N, Ghose S, Prasanna P, Velcheti V, Madabhushi A. Radiomics and radiogenomics in lung cancer: a review for the clinician. *Lung Cancer*. 2018;115:34–41.
- Brunese L, Meraldo F, Reginelli A, Santone A. An ensemble learning approach for brain cancer detection exploiting radiomic features. *Comput Methods Programs Biomed*. 2020;185:105134.
- Pangti R, Mathur J, Chouhan V, Kumar S, Rajput L, Shah S, Gupta A, Dixit A, Dholakia D, Gupta S, et al. A machine learning-based, decision support, mobile phone application for diagnosis of common dermatological diseases. *J Eur Acad Dermatol Venerol*. 2021;35(2):536–45.
- Le HV, Sivret EC, Parcsi G, Stuetz RM. Impact of storage conditions on the stability of volatile sulfur compounds in sampling bags. *J Environ Qual*. 2015;44(5):1523–9.
- Svetnik V, Liaw A, Tong C, Culberson JC, Sheridan RP, Feuston BP. Random forest: a classification and regression tool for compound classification and QSAR modeling. *J Chem Inf Comput Sci*. 2003;43(6):1947–58.
- Wright RE. Logistic regression. In: Grimm LG, Yarnold PR, editors. Reading and understanding multivariate statistics. Washington: American Psychological Association; 1995. p. 217–44.
- Zhang Z. Introduction to machine learning: k-nearest neighbors. *Ann Transl Med*. 2016;4(11):218.
- Izenman AJ. Linear discriminant analysis. In: Izenman AJ, editor. Modern multivariate statistical techniques: regression, classification, and manifold learning. New York: Springer; 2008. p. 237–80.
- Geisser S. The predictive sample reuse method with applications. *J Am Stat Assoc*. 1975;70(350):320–8.
- Stone M. Cross-validated choice and assessment of statistical predictions. *J R Stat Soc Ser B (Methodol)*. 1974;36(2):111–47.
- Kim YH, Kim KH. Experimental approach to assess sorptive loss properties of volatile organic compounds in the sampling bag system. *J Sep Sci*. 2012;35(21):2914–21.
- Pauwels C, Hintzen KFH, Talhout R, Cremers H, Pennings JLA, Smolinska A, Opperhuizen A, Van Schooten FJ, Boots AW. Smoking regular and low-nicotine cigarettes results in comparable levels of volatile organic compounds in blood and exhaled breath. *J Breath Res*. 2020;15(1):016010.
- Krilaviciute A, Leja M, Kopp-Schneider A, Barash O, Khatib S, Amal H, Broza YY, Polaka I, Parshutin S, Rudule A, et al. Associations of diet and lifestyle factors with common volatile organic compounds in exhaled breath of average-risk individuals. *J Breath Res*. 2019;13(2):026006.
- Blanchet L, Smolinska A, Baranska A, Tigchelaar E, Swertz M, Zhernakova A, Dallinga JW, Wijmenga C, van Schooten FJ. Factors that influence the volatile organic compound content in human breath. *J Breath Res*. 2017;11(1):016013.
- Phillips M, Herrera J, Krishnan S, Zain M, Greenberg J, Cataneo RN. Variation in volatile organic compounds in the breath of normal humans. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 1999;729(1–2):75–88.
- Le H, Sivret EC, Parcsi G, Stuetz RM. Stability of volatile sulfur compounds (VSCs) in sampling bags—impact of temperature. *Water Sci Technol*. 2013;68(8):1880–7.

44. Beauchamp J. Inhaled today, not gone tomorrow: pharmacokinetics and environmental exposure of volatiles in exhaled breath. *J Breath Res.* 2011;5(3):037103.
45. Pleil JD, Stiegel MA, Risby TH. Clinical breath analysis: discriminating between human endogenous compounds and exogenous (environmental) chemical confounders. *J Breath Res.* 2013;7(1):017107.
46. Ratiu IA, Ligor T, Bocos-Bintintan V, Szeliga J, Machala K, Jackowski M, Buszewski B. GC-MS application in determination of volatile profiles emitted by infected and uninfected human tissue. *J Breath Res.* 2019;13(2):026003.
47. Lemfack MC, Gohlke BO, Toguem SMT, Preissner S, Piechulla B, Preissner R. mVOC 2.0: a database of microbial volatiles. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(D1):D1261–5.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



Lebenslauf

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

Komplette Publikationsliste

Mentel S, Gallo K, Wagendorf O, Preissner R, Nahles S, Heiland M, Preissner S. Prediction of oral squamous cell carcinoma based on machine learning of breath samples: a prospective controlled study. *BMC Oral Health*. 2021 Oct 6;21(1):500. doi: 10.1186/s12903-021-01862-z. PMID: 34615514; PMCID: PMC8496028.

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei allen bedanken, die an der Umsetzung der Studie beteiligt waren und die Entstehung dieser Arbeit begleitet haben. Ganz besonderer Dank gilt Frau Priv.-Doz. Dr. Saskia Preißner für ihre Arbeit an dieser Studie, ihr Engagement und ihre Betreuung während des gesamten Prozesses der Promotion. Ich hätte mir keine bessere Unterstützung, sowohl fachlich als auch menschlich, wünschen können.

Außerdem danke ich Frau Gallo für ihre Auswertung der Daten anhand des Machine Learnings und ihre geduldige Hilfe bei Rückfragen.

Herzlichen Dank an Herrn Karaman für die statistische Beratung und Unterstützung.

Auch möchte ich mich bei Frau Dr. Anna Voge und Frau Sally Preißner für ihre Hilfe bei der Durchführung der Probenahmen und der Datenerfassung bedanken.

Vielen herzlichen Dank an meine Eltern für ihre Unterstützung und das Korrekturlesen.

Zu guter Letzt – Danke Jacob für Geduld, gutes Zureden und Hilfe in vielen Lebenslagen.