

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie

Univ.-Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Martin Gosau

**Einflussnehmende Faktoren auf die diagnostische Wertigkeit der
optischen Vibrationsspektroskopie kleinster Gewebeproben
- eine *ex vivo* Machbarkeitsstudie am oralen
Plattenepithelkarzinom**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Jasper Friedrich Tegtmeyer
aus Bad Oldesloe

Hamburg 2024

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 08.04.2025**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Guido Sauter

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Ralf Smeets

Inhaltsverzeichnis

<u>1.</u>	<u>ARBEITSHYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG</u>	<u>4</u>
<u>2.</u>	<u>EINLEITUNG</u>	<u>5</u>
<u>3.</u>	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	<u>17</u>
<u>4.</u>	<u>ERGEBNISSE</u>	<u>30</u>
<u>5.</u>	<u>DISKUSSION</u>	<u>51</u>
<u>6.</u>	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>60</u>
<u>7.</u>	<u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u>	<u>62</u>
<u>8.</u>	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	<u>63</u>
<u>9.</u>	<u>ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS</u>	<u>69</u>
<u>10.</u>	<u>DANKSAGUNG</u>	<u>72</u>
<u>11.</u>	<u>LEBENS LAUF</u>	<u>73</u>
<u>12.</u>	<u>PUBLIKATIONSVERZEICHNIS</u>	<u>74</u>
<u>13.</u>	<u>EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG</u>	<u>75</u>

1. Arbeitshypothese und Fragestellung

Die Früherkennung des Plattenepithelkarzinoms der Mundhöhle (oral squamous cell carcinoma = OSCC) ist eine grundlegende Voraussetzung für dessen kurative Therapie und damit entscheidend für das Gesamtüberleben (*overall survival* = OS) sowie das progressionsfreie Überleben (*progression-free survival* = PFS) der betroffenen Patient:innen. Im klinischen Alltag ist die Frühdiagnose des Plattenepithelkarzinoms der Mundhöhle jedoch fehleranfällig und häufig mit einer kritischen Diagnoselatenz verbunden. Dies ist unter anderem auf interindividuelle Parameter, wie der behandlerabhängigen, klinischen Indikationsstellung zur Biopsie und der potentiell variablen Differentialdiagnostik durch den Pathologen zurückzuführen.

Das Potential der Raman-Spektroskopie für die Diagnostik dieser Neoplasie war bereits Gegenstand erster wissenschaftlicher Untersuchungen. Insbesondere die in der vorliegenden Arbeit verwendete SERDS-Methodik (SERDS = *shifted-excitation Raman difference spectroscopy*) wurde in der eigenen Arbeitsgruppe bereits erfolgreich für die optische Diagnostik des oralen Plattenepithelkarzinoms an intraoperativ entnommenen Resektaten des OSCC erprobt. Um den Transfer von *bench to bedside* zu ermöglichen, sollen in der vorliegenden Arbeit die Anwendbarkeit der Methodik auch für kleinste Gewebeprobe (Biopsien) des OSCC evaluiert und maßgebliche Störfaktoren der durchzuführenden optischen Messung, die u.a. durch das geringe Gewebeangebot einer Biopsie sowie die Varianz in der Topographie bedingt sind, identifiziert werden.

Das grundlegende Ziel dieser Arbeit ist es, eine Validierung und robuste Standardisierung der erarbeiteten optischen Methodik für kleinste Biopsate der Mundschleimhaut unabhängig von Interferenzen zu etablieren, um zukünftig die hoch differenzierte Diagnostik und Differenzierung von multiplen Vorläuferläsionen des OSCC und die Abgrenzung zu benignen Läsionen zu ermöglichen.

2. Einleitung

2.1. Einführung in die Thematik

Die Zahl der jährlichen Todesfälle durch maligne Erkrankungen ist in Deutschland laut Robert-Koch-Institut seit 1999 um 10 % auf knapp 230.000 angestiegen (Bertz et al., 2004, Robert-Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2019). Bei den 45- bis 65-Jährigen stellte eine Krebserkrankung im Jahr 2019 die häufigste Todesursache dar (Statistisches Bundesamt, 2021). Ein steigendes Gesundheitsbewusstsein, Erfolge in der Prävention und Fortschritte in der medizinischen Versorgung haben zwar zu einem Rückgang der Erkrankungsraten sowie der altersstandardisierten Sterberaten an Neubildungen insgesamt geführt (Bertz et al., 2004, Robert Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2019), jedoch ist dieser positive Trend nicht vollständig für das OSCC nachzuvollziehen. Als Ursachen werden u.a. die Kumulation von Faktoren wie der steigende Altersdurchschnitt der Bevölkerung, die orale Aufnahme von Karzinogenen wie Tabakrauch und Alkohol, aber auch topische physikalische Schädigungen durch mechanische und thermische Einwirkungen sowie genetische Prädispositionsfaktoren und eine virale Genese durch eine Infektion mit dem humanen Papilloma-Virus (HPV) diskutiert (Bray et al., 2018, Jemal et al., 2011, Speight et al., 2018).

Darüber hinaus bestehen für kurative Therapieansätze des OSCC nicht selten ästhetische wie auch funktionelle Limitationen, welche aufgrund der Tumorlokalisation nicht selten bereits bei gering fortgeschrittenem Tumorstadium zu erheblichen Einschränkungen der Lebensqualität führen können. Der Früherkennung und Abgrenzung zu nicht befallenen, aber häufig entzündlich oder leukoplakisch verändertem Gewebe kommt daher eine besondere Bedeutung zu. Dabei gilt die alleinige initiale Inspektion der Mundhöhle und visuelle Beurteilung malignomverdächtiger Veränderungen als wenig sensitiv und ist nicht selten mit einer kritischen Zeitverzögerung bis zur definitiven histopathologischen Abklärung verbunden (Hadzic et al., 2017). Die aktuellen wissenschaftlichen Bemühungen richten sich daher zunehmend auf eine zeitnahe *Point-of-Care*-Diagnostik mittels untersucherunabhängiger nicht-invasiver Verfahren der Bio-Optik, um den rechtzeitigen Einsatz kurativer Therapiemodalitäten zu ermöglichen.

2.2. Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle

2.2.1. Epidemiologie

Das Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle gehört weltweit zu den sechs häufigsten Neoplasien und betrifft Männer häufiger als Frauen (Rivera, 2015). Weltweit lag die Zahl der Neuerkrankung im Jahr 2020 bei über 370.000 Menschen mit mehr als 177.000 neuen Todesfällen (Sung et al., 2021). Die meisten dieser Tumoren entstehen auf der Basis von Vorläuferläsionen, wie etwa Leukoplakien und Erythroplakie (Rivera, 2015). Laut Bericht des Robert-Koch-Institutes „Krebs in Deutschland für 2015/2016“ beträgt das mittlere Erkrankungsalter in Deutschland zu dieser Zeit für Männer 63 und für Frauen 66 Jahre. Doch auch jüngere Patient:innen unter 45 Jahren finden sich häufiger betroffen (Dos Santos Costa et al., 2018). Die relative 5-Jahres-Überlebensrate für Frauen liegt in Deutschland mit 63 % über der für Männer mit 47 % und nimmt mit Progression des Tumorstadiums ab: erfolgt eine Erstdiagnose im UICC-Stadium I (UICC = Union for International Cancer Control), liegt die relative 5-Jahres-Überlebensrate für beide Geschlechter gemittelt bei 83 %, während bei einer Erstdiagnose im UICC-Stadium IV diese nur noch 41 % beträgt (Robert-Koch-Institut and Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2019).

2.2.2. Pathogenese

Die Kanzerogenese des OSCC ist als multifaktorieller Prozess zu verstehen, der sich als Folge mutagener Einflüsse auf Epithelzellen der Mundhöhle ergibt (Rivera, 2015). Als wichtigste ätiologische Faktoren gelten laut aktueller S3-Leitlinie zur Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms langjähriger Tabak- und Alkoholkonsum (Wolff et al., 2021), welchen ein synergistischer Effekt auf die Entwicklung eines OSCC zugeschrieben wird (Montero and Patel, 2015). Darüber hinaus wird seit mehreren Jahren die Rolle einer Infektion mit humanem Papilloma-Virus (HPV) bei der Entstehung des OSCC diskutiert (Speight et al., 2018). Als erwiesen scheint, dass sich Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle aus so genannten epithelialen Vorläuferläsionen mit unterschiedlichem malignen Potential entwickeln (Warnakulasuriya et al., 2020) bzw. aufgrund einer erhöhten Wahrscheinlichkeit einer malignen Transmutation den Ursprung eines oralen Plattenepithelkarzinoms darstellen (Sarode et al.,

2014). Als relevanteste Entitäten dieser Vorläuferläsionen gelten in diesem Zusammenhang Leukoplakien, Erythroplakien und chronisch verlaufende Mukodermatosen wie z.B. das orale Lichen planus (van der Waal and Scully, 2010).

2.3. Symptomatik

Auch heute noch stellt die Früherkennung des Plattenepithelkarzinoms der Mundhöhle eine diagnostische Herausforderung dar, da Vorläuferläsionen ebenso wie frühe Tumorstadien aufgrund fehlender Symptome unerkannt bleiben (Bugshan and Farooq, 2020). Dabei stellt der Schmerz in 30-40 % der Fälle das Leitsymptom der Patient:innen mit Mundhöhlenkrebs dar. Beschwerden führen in der Regel jedoch erst dann zur Diagnostik, wenn der Tumor eine gewisse Größe erreicht hat oder weitere Symptome wie Blutungen, ein erhöhter Lockerungsgrad von einzelnen Zähnen, Atemprobleme, Sprachschwierigkeiten, Dysphagie, Trismus, Parästhesien, Foetor ex ore oder Probleme in der Verwendung von Prothesen auftreten (Bagan et al., 2010). Darüber hinaus fehlt es an einem Screening Programm für eine standardisierte orale Untersuchung auf Vorläuferläsionen des PEC in der täglichen Arbeit von Zahnärzt:innen (Klosa et al., 2011).

2.4. Diagnostik

2.4.1. Konventionelle diagnostische Verfahren

Laut aktueller Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde erfordern klinisch auffällige Läsionen der Mundhöhle ein initial konservatives Vorgehen mit kurzfristiger Verlaufskontrolle der Läsion. Die konservative Behandlung umfasst zudem die Beseitigung mechanisch-irritativer oder toxischer Ursachen sowie die Therapie einer möglicherweise ursächlichen Grunderkrankung. So sollte schließlich bei Persistenz einer solchen Veränderung von mehr als zwei Wochen eine histologische Abklärung erfolgen (Deutsche Gesellschaft für Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie, 2019). Hierfür sind eine chirurgische Biopsie, histologische Aufbereitung sowie mikroskopische Untersuchung des Gewebes durch einen erfahrenen Pathologen notwendig. Dieses Verfahren stellt den derzeit geltenden Goldstandard für die Diagnose des oralen Plattenepithelkarzinoms dar (Lingen et al., 2008).

Dabei differenziert die histopathologische Einteilung der epithelialen Vorläuferläsionen laut WHO-Klassifikation des Jahres 2017 in gering-, mäßig-, bis hochgradige Dysplasie (SIN I-III), wobei SIN III einem *Carcinoma in situ* entspricht (Deutsche Gesellschaft für Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie, 2019).

2.4.2. Limitationen der konventionellen diagnostischen Verfahren

Die konventionelle Diagnostik von prämaligen und malignen Läsionen der Mundhöhle findet sich durch Faktoren belastet, welche die Option einer kurativen Therapie für die Patient:innen deutlich einschränkt.

Insbesondere die interindividuelle Expertise des Untersuchenden hat einen hohen Einfluss auf die frühzeitige Diagnosestellung von malignen und prämaligen oralen Läsionen (Applebaum et al., 2009). Jedoch ergab eine im Bundesland Schleswig-Holstein durchgeführte Studie aus dem Jahr 2010, dass weniger als 50 % der Zahnärzte in der Lage waren, Fragen zur Symptomatik bzw. dem Erscheinungsbild eines OSCC im frühen Tumorstadium korrekt zu beantworten (Hertrampf et al., 2012). Dies könnte u.a. als Grund für den relativ späten Zeitpunkt der Erstdiagnose gesehen werden, so dass mehr als 60 % der Patient:innen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose ein Tumorstadium von 3 und 4 aufweisen (Lingen et al., 2008).

Zudem belegt eine Studie unter Zahnärzt:innen aus dem Jahr 2011 eine Diskrepanz zwischen dem selbst eingeschätzten Wissen über Entstehung und Früherkennung des OSCC und der tatsächlichen Umsetzung dieses Wissens in der täglichen Arbeitspraxis. Demnach wurden anamnestische Fragen bezüglich Tabak- und Alkoholkonsum der Patient:innen nur eingeschränkt erhoben und dokumentiert sowie das Wissen über Risikofaktoren, frühe Erkrankungszeichen und Symptome nicht angemessen an die Patient:innen weitergegeben. Ebenfalls zu gering fand sich die Zahl an Zahnärzt:innen, die regelmäßige Routineuntersuchungen bei ihren risikogefährdeten Patient:innen durchführten. (Klosa et al., 2011). In einer retrospektiven Kohortenstudie wurde aufgezeigt, dass die Latenz bis zur Diagnosestellung eines OSCC durch den Arzt oder Ärztin bzw. Zahnarzt oder Zahnärztin derzeit durchschnittlich 85 Tage beträgt und sich somit als belastender Einflussfaktor auf die Prognose erweist (Thomas et al., 2021). Dabei werden bereits Therapieverzögerungen von mehr als 4

Wochen mit einem signifikant negativen Einfluss auf die Prognose assoziiert (Kowalski and Carvalho, 2001).

Des Weiteren limitiert die durch den/die Behandler:in subjektive Einstufung verdächtiger Läsionen in unterschiedliche Dysplasiegrade die Genauigkeit und Vergleichbarkeit der Diagnosen. Selbst unter Pathologen, welche über eine spezielle Expertise in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie verfügen, besteht eine hohe Varianz für die Einstufung einer verdächtigen Läsion in verschiedene Dysplasiegrade (Yang et al., 2018).

Angesichts dieser Tatsachen wird die entscheidende Rolle der Tumor-Früherkennung und das Bemühen um eine signifikante Reduktion der Latenzzeit bis zur Diagnosestellung für den Therapieerfolg deutlich.

2.4.3. Alternative diagnostische Verfahren

Die o.g. Limitationen des Goldstandards der konventionellen diagnostischen Verfahren haben dazu geführt, dass in den letzten Jahrzehnten eine Vielzahl nicht-invasiver Techniken erprobt wurden, welche im Folgenden zusammengefasst vorgestellt werden.

Intravitalfärbung mittels Toluidinblau

Die Technik der Intravitalfärbung mittels Toluidinblau wird seit Jahrzehnten als Hilfsmittel zur Identifizierung von Schleimhautanomalien der Cervix uteri genutzt (Lingen et al., 2008). Das Verfahren beruht auf der Färbung von Desoxyribonukleinsäuren mittels Toluidinblau und dessen Retention im Intrazellulärraum dysplastischen Epithels. Der erhöhte DNA- und RNA-Gehalt und das größere intrazelluläre Volumen neoplastischer Zellen im Vergleich zu gesundem Gewebe ermöglichen somit deren Diskriminierung (Giovannacci et al., 2016). Neben geringen Kosten, umfassender Anwendbarkeit in der Mundhöhle und schneller Verfügbarkeit der Ergebnisse als Stärken dieser Methode, bleibt diese jedoch aufgrund ihrer geringen Spezifität in der Abgrenzung entzündlicher Läsionen und Ulcera von Dysplasien limitiert (Yang et al., 2018). Eine maßgebliche Entwicklung und Verbreitung der Methode sei daher laut SK2-Leitlinie nicht mehr zu erwarten (Deutsche Gesellschaft für Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie, 2019).

Photodynamische Diagnostik mittels 5-Aminolävulinsäure

Das Prinzip dieser lichtinduzierten Fluoreszenztechnik basiert auf dem Nachweis von Fluoreszenz endogener Fluorophore im Gewebe oder exogener Fluoreszenz von Photosensibilisatoren, welche sich im neoplastischen Geweben anreichern lassen (Zheng et al., 2004). Als vielversprechender Photosensibilisatoren zur Diagnostik neoplastischer Veränderungen der Mundschleimhaut steht vor allem 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) im Zentrum des Interesses (Zheng et al., 2004, Marcus et al., 1996, Kennedy et al., 1996, Betz et al., 2002). Zwar fluoresziert die Substanz nicht selbst, doch induziert diese die Fluoreszenz von Protoporphyrin IX (PPIX) im untersuchten Gewebe. Durch topisch oder systemisch verabreichte 5-ALA lässt sich deren selektive Anreicherung in neoplastischen Geweben der Mundhöhle aufgrund des sich ergebenden optischen Kontrasts zum gesunden Gewebe diagnostisch nutzen (Zheng et al., 2004). Obgleich laut Literatur auf diese Weise eine mit 95-100% hoch sensitive Erkennung prämaligener und maligner Schleimhautveränderungen möglich ist, führen benigne orale Läsionen aufgrund geringer methodischer Spezifität von 63,5% zu falsch-positiven Ergebnissen (Epstein et al., 1992, Zheng et al., 2004). Zudem erweist sich die Latenzzeit der Anreicherung von PPIX im Zielgewebe mit ca. 1,5 Stunden als nachteilig (Leunig et al., 2000).

Bürstenbiopsie

Mit Einführung der Bürstenbiopsie als Weiterentwicklung der oralen exfoliativen Zytologie im Jahr 1963 ergab sich eine deutlichere Optimierung der Gewinnung ausreichend zellhaltiger Proben (Alsarraf et al., 2018). Speziell angefertigte Abstrichbürsten erlaubten zudem eine homogenere Verteilung der gewonnenen Zellen auf dem Objektträger. Darüber hinaus gelangen hiermit minimalinvasive Probenentnahmen aus tieferen Schleimhautschichten, in welchen sich squamöse intraepitheliale Vorläuferläsionen entwickeln (Mehrotra et al., 2009). Eine derart etablierte Analysemethode existiert aktuell mit *Oral CDx[®]* von *CDx Laboratories, INC* (Suffern, NY, USA). Diese ermöglicht mittels computerassistierter Analyse des zytologischen Abstrichs eine Untersuchung aller Zellschichten der oralen Mundschleimhaut zur Identifizierung entdifferenzierten bzw. neoplastischen Gewebes. Hierbei wird unter Einsatz der

Technik neuronaler Netzwerke ein Bildverarbeitungssystem zur Erkennung oraler Präkanzerosen und Krebszellen genutzt (Casparis et al., 2014). Kriterien für eine Atypie sind dabei zelluläre Keratinisierungen und morphologische Abweichungen. Die Ergebnisse der Analyse werden anhand repräsentativer Ausstriche durch einen/eine Patholog:in bewertet, welcher die Empfehlung für das weitere Prozedere hinsichtlich des klinischen Follow-Ups, einer Wiederholung der Bürstenbiopsie oder einer konventionellen Biopsie mittels Skalpell ausspricht (Mehrotra et al., 2009). In Reviews der Jahre 2009 und 2018 kommen die Autor:innen jedoch zu der Schlussfolgerung, die Methode der konventionellen Bürstenbiopsie aufgrund ihrer mangelnden Zuverlässigkeit (Sensitivität 76,8-94,6% und Spezifität 93,3-100) für eine zuverlässige Diagnosestellung des Plattenepithelkarzinomen und hoch verdächtiger Metaplasien nicht zu empfehlen. Darüber hinaus betonen die Autor:innen, dass zwar durch eine Computer assistierte Analyse eine Verbesserung der Genauigkeit erzielt werden konnte, jedoch für die Bestätigung der Diagnose die chirurgische Exzision mit anschließender histopathologischer Begutachtung als Goldstandard bestehen bleibt (Mehrotra et al., 2009, Alsarraf et al., 2018).

2.4.4. Autofluoreszenz-spektroskopische Verfahren

Diese Technik beruht auf Exposition verdächtiger Läsionen gegenüber monochromatischem Licht und der Erfassung hierbei emittierter Fluoreszenzspektren endogener Gewebefluorophoren (Jayanthi et al., 2009). Als wichtigste Fluorophore der Mundschleimhaut finden sich Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NADH) und Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) im Epithel bzw. in Kollagenquervernetzungen des Stromas. Diese absorbieren Photonen der exogenen Lichtquelle und emittieren niederenergetische Photonen als optisch erfassbare Fluoreszenz, wobei jedem Fluorophor spezifische Anregungs- und Emissionswellenlängen zugeordnet sind. Bei Bestrahlung mit Wellenlängen zwischen 375 und 440 nm zeigen die genannten Fluorochrome eine Fluoreszenz im grünen Spektralbereich als Merkmal intakter Schleimhaut, welche bei Betrachtung durch einen schmalbandigen Filter eine blassgrüne Autofluoreszenz aufweist. Aufgrund des intensiven Lichts, das zur Anregung der Fluorochrome verwendet wird, ist eine präzise Filterung von höchster Bedeutung. Ohne sie wäre es unmöglich, das blasse wie auch schmale

Autofluoreszenzsignal zu visualisieren. Zusätzlich lässt die Störung der Fluorochromverteilung in dysplastischen Geweben die Fluoreszenzemission verblassen und im Vergleich zu umgebendem gesunden Gewebe dunkler erscheinen (Nagi et al., 2016).

Der Literatur ist zu entnehmen, dass diese Technik zwar die Erkennung verdächtiger Läsionen der Mundschleimhaut verbessern lässt, bei nur geringer Spezifität die Diskriminierung von Hochrisikoläsionen jedoch deutlich einschränkt. Darüber hinaus bleibt die subjektive Erfahrung des/der Behandler:in jedoch entscheidend, da es sich bei der Technik lediglich um eine Kontrastverstärkung der einzelnen Gewebeentitäten handelt (Rashid and Warnakulasuriya, 2015).

2.4.5. Diffuse Reflexionsspektroskopie

Die Technik der diffusen Reflexionsspektroskopie stellt einen weiteren Ansatz zur optischen Detektion eines OSCC dar. Die Methode basiert auf den strukturellen Veränderungen der zellulären und subzellulären Gewebearchitektur sowie der Vaskularisierung neoplastischer Gewebetransformationen. So wird weißes Licht auf ein zu untersuchendes Gewebe projiziert, dringt in dieses ein und wird durch eine Kombination aus mehrfacher elastischer Streuung wie auch Absorption verändert. Das hieraus resultierende vom Gewebe emittierte Lichtspektrum liefert somit Informationen über dessen Absorptions- und Streuungsverhalten in Abhängigkeit von der Gewebetransformation (Mallia et al., 2008). Hierbei hat sich das Absorptionsverhalten oxidierten Hämoglobins als wesentliches Merkmal maligner Läsionen in Abgrenzung zu gesunder Schleimhaut der Mundhöhle erwiesen (Subhash et al., 2006).

In der Literatur findet sich eine Vielzahl an Studien, welche sich mit dieser Diagnostik von Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle und dessen Vorläuferläsionen befassen (Einstein et al., 2016, Mallia et al., 2008, Stephen et al., 2013, Subhash et al., 2006).

Die Qualität der mittels diffuser Reflexionsspektroskopie gewonnenen Spektren wird jedoch durch verschiedene Faktoren bestimmt. So spielt vor allem die geringe Eindringtiefe des Lichts eine maßgebliche Rolle, da diese Technik

hierdurch auf die Untersuchung oberflächlicher Gewebeschichten begrenzt bleibt (Majumder et al., 2008).

2.5. Raman-Spektroskopie

2.5.1. Allgemein

Die Raman-Spektroskopie hat ihren Ursprung in der Entdeckung des Raman-Effekts im Jahr 1928, für welche C. V. Raman 1930 den Nobelpreis erhielt (Singh et al., 2016). Mit der nach ihrem Entdecker benannten Methode ist es möglich, durch lichtinduzierte Molekülanregung im Untersuchungsmaterial Informationen über die molekulare Zusammensetzung und Struktur der Probe zu erhalten. Dies geschieht, indem monochromatisches (Laser-)Licht durch inelastische Streuung in der exponierten Probe zur Emission eines analytisch verwertbaren Lichtspektrums führt (Lau et al., 2005). Auf molekularer Ebene induziert die energetische Anregung der Strukturmoleküle eine zusätzliche Schwingungsenergie innerhalb der chemischen Bindungen des Moleküls. Das einfallende Licht verliert dadurch einen definierten Energieanteil, der in einer Frequenzverschiebung der gestreuten Photone resultiert. Diesen Vorgang bezeichnet man als Raman-Effekt. Da die Schwingungsenergie molekülspezifisch ist, können Raman-Spektren als „chemische Fingerabdrücke“ der molekularen Struktur der untersuchten Substanz bzw. eines Gewebes analytisch genutzt werden (Cals et al., 2018). Die Raman-Spektroskopie bietet somit die Möglichkeit qualitativ hochwertige Spektren auf molekularer Ebene zu erfassen und die so gewonnen Informationen nicht-invasiv, markierungsfrei und ohne Zeitverzug zu gewinnen, auch ohne negative Beeinflussung durch Anwesenheit von Wasser (Butler et al., 2016).

Im folgenden Abschnitt wird auf den bereits oben genannten Raman-Effekt näher eingegangen und zum besseren Verständnis vereinfacht dargestellt.

2.5.2. Das Prinzip der Nutzung des Raman-Effekts

Wenn Licht mit Materie in Wechselwirkung tritt, werden Photonen entweder absorbiert oder diffus in alle Raumrichtungen gestreut (Smith and Dent, 2019). Die Raman-Spektroskopie nutzt diese Raman-gestreuten Photonen (Pudlas, 2012). Führt der lichtinduzierte Streuungsprozess zu einer Kernbewegung, wird diese Energie entweder vom einfallenden Photon auf das streuende Molekül oder vom streuenden Molekül auf das einfallende Photon übertragen. In diesem

Fall spricht man von „inelastischer Streuung“. Die Energie des gestreuten Photons unterscheidet sich vom einfallenden Photon um eine definierte Schwingungseinheit und führt zu einer analytisch auswertbaren, so genannten Raman-Streuung, einem von Natur aus schwachen Prozess, da nur eines von 10^{6-8} Photonen auf diese Weise gestreut wird. Mit Eintritt des Lichts in die Materie werden jedoch auch Störeffekte induziert. So werden die Elektronen der Elektronenhülle der Atomkerne innerhalb der Moleküle polarisiert und in einen kurzlebigen, so genannten „virtuellen Zustand“ überführt. In diesem Zustand werden Photonen des einfallenden Lichts schnell wieder abgegeben. Wird die Elektronenwolke beim Streuprozess lediglich verzerrt, werden bei der Rückkehr der Elektronenwolke in ihre Ausgangsposition Photonen mit der gleichen Frequenz wie die der einfallenden Anregungsstrahlung emittiert. Dieser als „elastisch“ bezeichnete Streuprozess wird als Rayleigh-Streuung bezeichnet (Smith and Dent, 2019), welcher jedoch ohne skalierbaren Energieaustausch zwischen Materie und Photon bleibt und somit auch keine verwertbaren Informationen über die untersuchte Materie bietet. Das signalliefernde Raman-Streulicht ist für dessen Nutzung daher von der Rayleigh-Streuung zu bereinigen (Pudlas, 2012).

Ob während des Streuprozesses entweder Energie vom einfallenden Photon auf das streuende Molekül oder vom streuenden Molekül auf das einfallende Photon übertragen wird, ist abhängig vom energetischen Zustand des Moleküls. Befindet sich dieses im elektronischen Grundzustand, ist das aus dem virtuellen Zustand gestreute Photon um den auf die Kerne übertragenen Betrag energieärmer und das Molekül beginnt zu schwingen. Es kommt zur sogenannten Raman-Stokes-Verschiebung. Befindet sich das Molekül jedoch in einem angeregten Schwingungsniveau des Grundzustands, bringt der Streuprozess das Molekül in den Grundzustand zurück, wodurch die gestreute Strahlung um den Betrag der zugeführten Schwingungsenergie energiereicher wird als die Anregungsfrequenz. Dieser Effekt wird als Raman-Anti-Stokes-Verschiebung bezeichnet (Smith and Dent, 2019). Die meisten Moleküle befinden sich bei Raumtemperatur im elektronischen Grundzustand, der unter den gegebenen Bedingungen den größten Teil der Raman-Streuung als Stokes-Raman-Verschiebung detektieren lässt (Smith and Dent, 2019) und in der vorliegenden Arbeit für die Raman-spektroskopische Analyse von biologischem

Gewebe genutzt wird. Abbildung 1 veranschaulicht das Prinzip der Rayleigh-Streuung sowie der Anti-Stokes- und Stokes-Raman-Verschiebung.

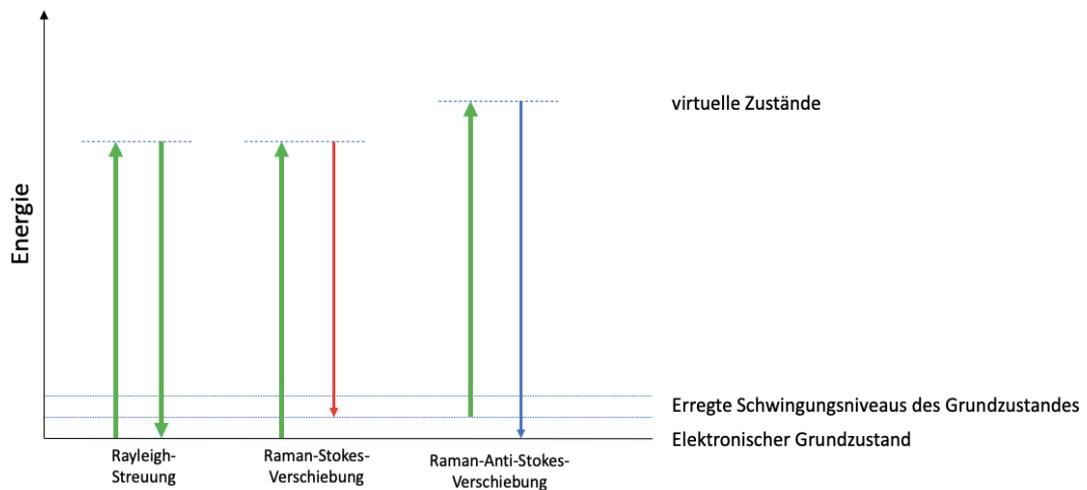


Abbildung 1: Diagramm der Rayleigh- und Raman-Streuprozesse. Die nach oben gerichteten Pfeile stellen die Anregung des Moleküls durch monochromatisches Licht dar. Die nach unten ausgerichteten Pfeile repräsentieren die je nach Interaktion unterschiedlich emittierten Photonen, die mittels Spektrometer detektiert werden können. Die Länge der Pfeile ist proportional zur Energie der Photonen. In Anlehnung an Smith, E. & Dent, G. 2019. Modern Raman Spectroscopy: A Practical Approach

Jedoch geht die Anwendung der Raman-Spektroskopie mit einer hohen Autofluoreszenz der biologischen Gewebe aufgrund ihrer hoch komplexen Zusammensetzung einher. Diese Fluoreszenzinterferenz stellt durch die Überlagerung des detektierten Raman-Spektrums einen limitierenden Störfaktor dar (Gebrekidan, 2014), welcher durch das in der vorliegenden Arbeit verwendete SERDS-Verfahren erfolgreich auf ein Minimum reduziert werden kann. Eine nähere Beschreibung des SERDS-Verfahrens erfolgt in Kapitel 3.6.1.

2.6. Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist die Analyse kleinster Gewebeproben des OSCC im Rahmen einer Machbarkeitsstudie. Zu diesem Zweck werden reine, möglichst interferenzbereinigte Raman-Spektren von kleinsten Gewebeproben der physiologischen Mundschleimhaut und des OSCC gewonnen. Ein Hauptaugenmerk liegt dabei auf der Identifizierung und Eliminierung möglicher Einflussfaktoren auf die optischen Messungen, die sich aus dem geringen Gewebeangebot der Biopsien, der Interferenz durch verschiedene Lagermedien und der Varianz in ihrer topographisch-anatomischen Beschaffenheit ergeben.

Durch die vorliegenden Arbeiten soll somit eine Validierung und robuste Standardisierung der gewonnenen optischen Signale erreicht werden, um eine Grundlage für die zuverlässige optische, nicht-invasive Früherkennung von Karzinomen der Mundhöhle anhand kleinster Gewebeproben in Echtzeit zu bilden. Dabei werden im Spezifischen die folgenden Fragestellungen beantwortet.

2.7. Fragestellungen

(1) Eignung der Methodik des Raman-Messsystems

Ist eine reproduzierbare und valide Akquise suffizienter Raman-Spektren bei kleinsten Gewebeproben von physiologischer Mundschleimhaut und Geweben des OSCC möglich?

(2) Identifikation einflussnehmender Faktoren auf die Methodik

Welche einflussnehmenden Faktoren auf die Qualität und Güte der akquirierten Raman-Spektren von Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle (OSCC) und physiologischer Mundschleimhaut können im Zuge der Arbeit identifiziert werden?

(3) Differenzierbarkeit von malignem zu gesundem Gewebe

Mit welcher Sensitivität und Spezifität kann eine Differenzierung kleinster, nativer humaner Gewebeproben von Geweben des OSCC und physiologischer Mundschleimhaut nach Standardisierung der Messmethodik und Ausschaltung der Störfaktoren erfolgen?

(4) Weiterführende Forschungsfragen

Darüber hinaus wurden im Rahmen der Arbeit folgende Forschungsfragen identifiziert und Lösungsansätze erarbeitet:

- a) Welchen Einfluss hat eine Formalinlagerung der Gewebeproben auf die Akquirierung der Raman-Spektren sowie auf die Güte der Identifikation des OSCC gegenüber physiologischer Mundschleimhaut?
- b) Welchen Einfluss haben topographisch-anatomische Merkmale der Mundhöhle auf die Raman-spektroskopische Untersuchung kleinster OSCC-Gewebeproben?

3. Material und Methoden

3.1. Instrumentelles Setup

Für die Raman-spektroskopischen Untersuchungen kommt ein eigens innerhalb der Arbeitsgruppe entwickelter Raman-Sensor zum Einsatz, welcher im Rahmen der vorliegenden Arbeit interdisziplinär weiterentwickelt und erstmals auf kleinste Gewebeproben angewendet wird. Abbildung 3 zeigt dabei den schematischen Aufbau dieses Systems. Als Lichtquelle zur Anregung der Moleküle wird ein Diodenlaser (DLpro, Toptica Photonics, München, Deutschland) (Abbildung 2) mit einer variablen Laserwellenlänge zwischen 770 und 810 nm und einer Linienbreite von weniger als 500 kHz gewählt. Mit Hilfe

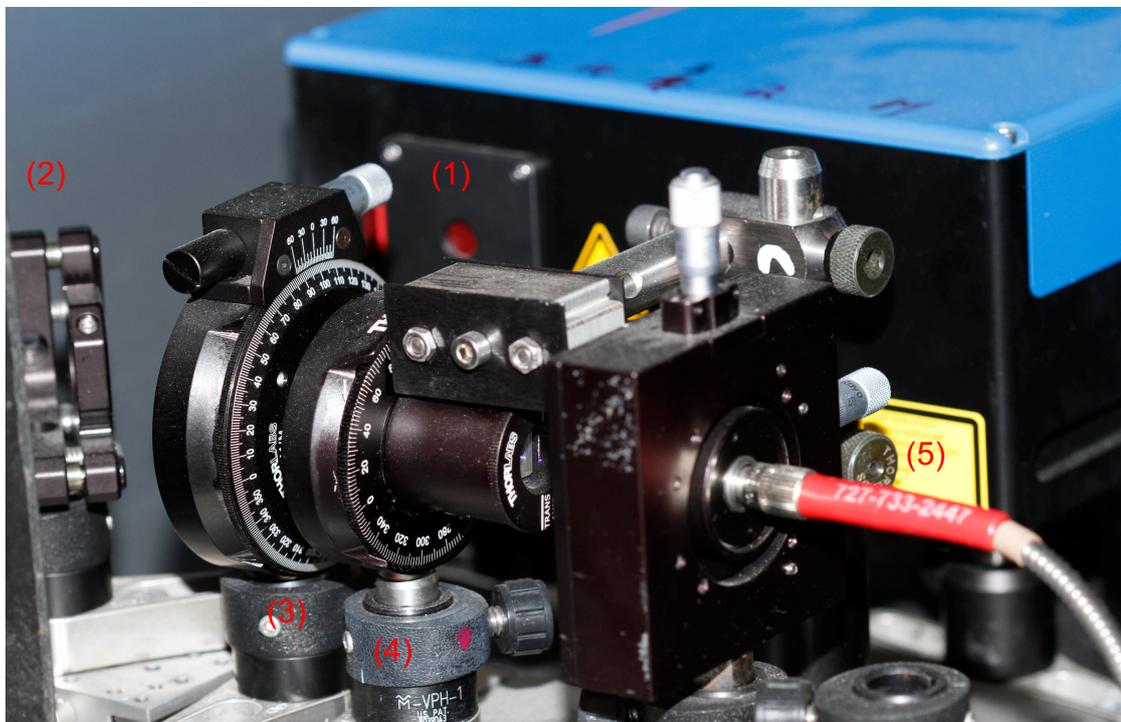


Abbildung 2: Diodenlaser (1), dichroitische Spiegel (2), Glan-Prisma (3), Polarisator (4) und Glasfaserkabel für die Weiterleitung des Anregungslaserstrahls (5)

eines Glan-Laserprismas in Kombination mit einer Verzögerungsplatte wird die Laserleistung von 1 W auf 115 mW verringert. Um die Laserstrahlung zu der Raman-Sonde weiterzuleiten, wird der Anregungslaserstrahl in ein Glasfaserbündel (200 μm Kerndurchmesser, 0.22 NA, Ocean Optics, Rochester, New York, USA) eingeleitet. Ein in die Raman-Sonde eingebauter Kurzpassfilter (780/12 Brightline HC, Semrock, Rochester, New York USA) unterdrückt dabei Wellenlängen über 785 nm welche durch Faser-Licht-Wechselwirkungen bei der Passage des Anregungslaserlichts durch die

Glasfaser als Cut-Off-Effekt entstehen. Nachfolgend wird der Anregungslaserstrahl durch einen dichroitischen Spiegel reflektiert. Dabei ist der dichroitische Spiegel für die Wellenlängen unterhalb von 785 nm hochreflektierend, während er für größere Wellenlängen transparent ist.

Mit Hilfe einer Linse (achromatische Linse, THORLABS, Newton, New Jersey, USA) erfolgt die Fokussierung des Anregungslaserstrahls auf die zu untersuchende Gewebeprobe mit einem Brennpunktdurchmesser von ca. 200 μm . Wie oben bereits beschrieben, bewirkt der Laserstrahl eine molekulare Anregung des Materials mit Emission optischer Signale unterschiedlicher Quellen (elastische Lichtstreuungssignale, Fluoreszenz und die gewünschten Raman-Signale). Ein Teil dieser Signale wird dabei als Rückstreuung durch dieselbe Linse erfasst. Die rot-verschobenen Fluoreszenzsignale und die Raman-Signale passieren den dichroitischen Spiegel zu nachgelagerten Linsen und werden auf ein Detektionsglasfaserbündel (600 μm Kerndurchmesser, 0.37 NA, Ocean Optics, Rochester New York, USA) fokussiert. Dieses leitet die Signale von der Raman-Sonde zum Spektrometer (Ventana-785-Raman, Ocean Optics, Rochester, New York, USA). Die elastischen Lichtstreuungssignale dagegen werden herausgefiltert: zunächst durch den dichroitischen Spiegel, der diese zur Anregungsglasfaser reflektiert, und darüber hinaus durch einen Langpassfilter, der zwischen dem dichroitischen Spiegel und der Signalfokussierlinse montiert ist.

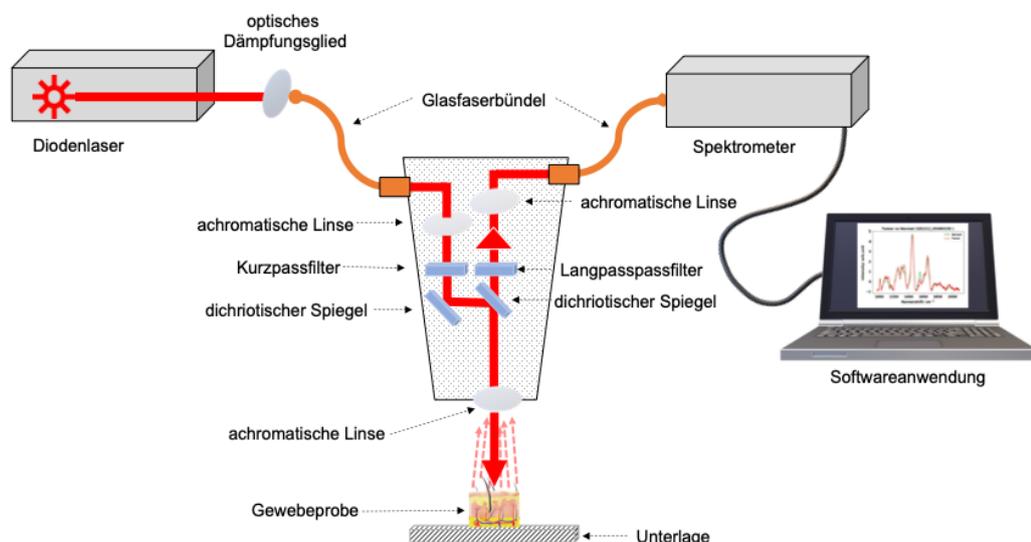


Abbildung 3: Schematische Darstellung des selbst entwickelten Ramansystems

Das so genannte Ventana-Spektrometer ist in der Lage Wellenlängen zwischen 800 und 940 nm, entsprechend Raman-Verschiebungen von 200 bis 2000 cm^{-1} , zu differenzieren. Die spektrale Auflösung wird bei 810 nm mit 10 cm^{-1} angegeben. Bei 810 nm entspricht eine Wellenzahldifferenz von 10 cm^{-1} etwa 0,6 nm. Daher sind Signale mit einer Wellenlängendifferenz von mindestens 0,6 nm als zwei verschiedene Spektral Gipfel aufzulösen.

Mit 1024 Pixeln entlang der Spektralachse des Detektors entspricht ein Pixel etwa 0,137 nm ($\sim 2,44 \text{ cm}^{-1}$) und liegt somit unterhalb der Spektralauflösung.

Dank dreier miteinander kombinierter und elektrisch angetriebener Bewegungsschlitten (NRT150 von THORLABS) ist es möglich die Ramansonde räumlich in drei Ebenen gezielt zu steuern bzw. zu positionieren. Die optische Kontrolle der dafür benötigten 3D-Koordinaten eines ausgewählten Messpunktes auf der Probe erfolgt durch ein 3D-Visualisierungssystem (Ensenso N10 Stereokamera, IDS Imaging Development Systems, Obersulm, Deutschland).

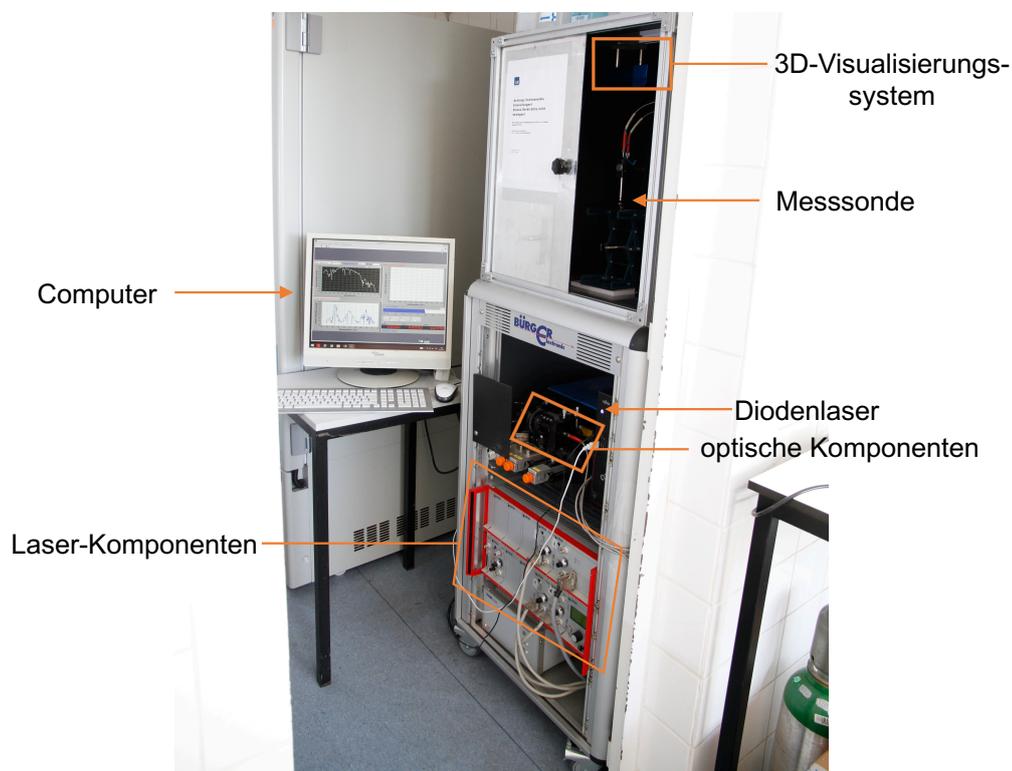


Abbildung 4: Fotoaufnahme des technischen Setups im Labor

Das technische Setup wird während der experimentellen Phase der vorliegenden Arbeit stets mit Referenzmessungen überprüft, um eine hohe Reproduzierbarkeit und Reliabilität der Daten zu gewährleisten. Darüber hinaus werden fortlaufend Anpassungen des technischen Setups zur Optimierung der Praktikabilität und Erhöhung der Effizienz dieser Messmethode vorgenommen.

3.2. Shifted-excitation Raman difference spectroscopy (SERDS)

Um die chemische Zusammensetzung eines Gewebes zu identifizieren, bedarf es der Akquirierung qualitativ hochwertiger Raman-Spektren. Die Erfassung solcher Raman-Spektren gilt nach wie vor als große Herausforderung in der angewandten Raman-Spektroskopie, insbesondere dann, wenn relativ kurze Messzeiten im Bereich von wenigen Sekunden zu realisieren sind (Gebrekidan et al., 2016). Bei der *shifted-excitation Raman difference spectroscopy* (SERDS) handelt es sich um eine Methode zur Verarbeitung von Raman-Spektren aus stark fluoreszenzgestörten Rohspektren. Bereits im Jahr 2015 wurde in einer Publikation von Gebrekidan et al., welche aus den wissenschaftlichen Arbeiten der Arbeitsgruppe entstanden ist, das SERDS-Verfahren unter Verwendung mathematischer Ansätze als eine der effizientesten Methoden zur Eliminierung störender Fluoreszenzinterferenzen beschrieben (Gebrekidan et al., 2016) und dient damit als geeignete Anwendung für die vorliegende Arbeit. Die Methode der SERDS stützt sich dabei auf die Kasha-Regel, welche besagt, dass das Fluoreszenzsignal nahezu unempfindlich gegenüber kleinen Änderungen der Photonenenergie der Anregung ist, im Gegensatz zum Raman-Spektrum, das sich entsprechend der Änderung der Anregungsphotonenenergie verschiebt (Kasha, 1950). Durch die Subtraktion zweier Rohspektren voneinander, die jeweils mit einer geringfügig differenten Photonenenergie angeregt werden, gelingt es, den Fluoreszenzhintergrund zu eliminieren, während das Raman-Differenzspektrum erhalten bleibt (Gebrekidan et al., 2016). Das Prinzip der Spektrenverarbeitung dieser Methode wird in Kapitel 3.6 näher erläutert. Für die weitere detaillierte Darstellung wird auf die genannte Publikation von Gebrekidan et al. verwiesen.

3.3. Akquise der Gewebeproben

Die Durchführung der Messungen erfolgte zunächst an *ex vivo* Gewebeproben aus handelsüblichem Hühnerfleisch und diente der Evaluation potentiell störender Interferenzen des Messverfahrens. Vor ihrer Verwendung wurden die

Gewebeproben behutsam von oberflächlichen Verunreinigungen und Blutrückständen gereinigt, sowie mit 0,9 %iger NaCl-Lösung benetzt.

Die humanen Gewebeproben (Biopsien) stammen dabei von Patient:innen der Klinik für Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf mit Verdacht auf oder bereits histo-pathologisch gesichertem oralem Plattenepithelkarzinom. Die Entnahme der Gewebeproben erfolgte nach Aufklärung der Patient:innen über die Durchführung und Risiken des Eingriffs sowie die weitere Verwendung der Proben zur Umsetzung der wissenschaftlichen Arbeit (vgl. Ethikantrag „243_12 B“ vom 16.07.2017). Zum einen wurden kleinste *ex vivo* Gewebeproben intraoperativ Gesamtresektaten entnommen. Dabei konnten auf diese Weise sowohl Biopsien des OSCC als auch physiologischer Mundschleimhaut gewonnen werden, welche aus dem Randbereich der Läsionen unter chirurgisch definiertem Sicherheitsabstand stammen. Diese dienten primär zum Zweck der Standardisierung des Messverfahrens. Zum anderen wurden zum Zweck der Validierung Biopsien von Patient:innen miteinbezogen, welche sich mit der Verdachtsdiagnose eines oralen PEC in der Ambulanz der Klinik für Mund-, Kiefer, Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf vorstellten. So entstanden zum Teil korrespondierende *ex vivo* Gewebeproben des OSCC (n=30) und physiologischer Mundschleimhaut (n=17). Alle *ex vivo* Gewebeproben wurden der nicht-invasiven, berührungslosen Raman-spektroskopischen Untersuchung zugeführt und teilweise darauffolgend bei -80°C in Formalin asserviert. Die histo-pathologischen Diagnosen wurden mit den Ergebnissen der Raman-spektroskopischen Untersuchungen verglichen und dokumentiert. So konnten Gewebeproben verschiedener anatomischer Lokalisationen (Alveolarkamm, Mundboden, Zunge und Wange) in die vorliegende Arbeit aufgenommen werden. Die humanen *ex vivo* Gewebeproben werden nach ihrer Exzision unverzüglich in 0,9 %iger NaCl-Lösung gelagert und innerhalb von 8 Stunden nach ihrer Entnahme, *tu* Raman-spektroskopisch untersucht. Zuvor wurden diese zur Entfernung von Verunreinigungen und Blutrückständen vorsichtig mittels 0,9 %iger NaCl-Lösung abgespült. Um Alterationen der Gewebeoberfläche zu vermeiden, wurde auf weitere Säuberungsmaßnahmen verzichtet.



Abbildung 5: Vorbereiten einer Gewebeprobe auf schwarzem Teflonpapier

3.4. Versuchsdurchführung

Nach Festlegung der Spezifikationen des instrumentellen Setups erfolgen die Raman-spektroskopischen Messungen kleinster *ex vivo* Gewebeproben oraler Mundschleimhaut von Patient:innen mit gesichertem oralem Plattenepithelkarzinom an der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf. Insgesamt werden 47 heterogene Gewebeproben 29 verschiedener Patient:innen untersucht. Je nach Größe der Gewebeproben werden zwischen drei bis fünf Messpunkte pro Gewebeprobe ausgewählt und das Spektrum für jeden Messpunkt über 50 Einzelspektren gemittelt. So können insgesamt zwischen 7050 und 12000 Einzelspektren akquiriert und der Auswertung zugeführt werden.

3.5. Spektrale Datenverarbeitung und -prozessierung

3.5.1. Spektrale Datenverarbeitung: *shifted-excitation Raman difference spectroscopy* (SERDS)

Die spektrale Datenverarbeitung mittels SERDS-Verfahren erfolgt durch eine Software, welche im Rahmen des Projekts in enger interdisziplinärer Zusammenarbeit mit Bioingenieurwissenschaftlern entwickelt wurde. Die Prüfung der Anwendbarkeit sowie die eigene Validierung durch regelmäßige Referenzmessungen sind dabei Voraussetzungen der vorliegenden Arbeit.

Wie bereits in Kapitel 3.3 beschrieben, handelt es sich bei der *shifted-excitation Raman difference spectroscopy* (SERDS) um eine Methode zur Spektrenverarbeitung stark fluoreszenzgestörten Rohspektren.

Hierbei sind diese zunächst von stark fluoreszenzstörenden Spektren zu reinigen. Abbildung 6 zeigt dieses Verfahren exemplarisch anhand eines simulierten Fluoreszenzhintergrunds. Grundsätzlich sind für diesen Prozess zwei Rohspektren zu ermitteln, welche einen geringfügigen Unterschied der Anregungswellenlänge des Lasers aufweisen (z.B. $a = 784$ und $b = 785$ nm) (Abbildung 6A). Diese jeweils mittleren Spektren werden in einem ersten Schritt mittels z-Standardisierung normiert, um die Ähnlichkeit beider Fluoreszenzbeiträge näher an die Kasha-Regel heranzuführen, welche die Basis für das SERDS-Verfahren bildet (Gebrekidan et al., 2016). Dieser zufolge bleibt die Fluoreszenzemission für minimale Änderungen der Anregungsphotonenenergie unverändert, während sich das Raman-Spektrum entsprechend der Änderung der Anregungsphotonenenergie, wie in Abbildung 6A dargestellt, verschiebt (Kasha, 1950). Es folgt die gegenseitige Subtraktion der beiden normierten Mittelspektren voneinander (Signal „b“ von Signal „a“) (Abbildung 6B), was theoretisch einer vollständigen Eliminierung des störenden Fluoreszenzhintergrunds und somit der Gewinnung eines reinen Raman-Differenzspektrums entspricht. Tatsächlich wird jedoch nur der Großteil des Fluoreszenzhintergrunds eliminiert unter Verbleib von Fluoreszenzresten. Die verbleibende Fluoreszenzinterferenz, welche verglichen mit den ursprünglichen Fluoreszenzwerten gering ist, wird durch mathematische Ansätze, der so genannten Nullzentrierung, weiter reduziert. Dabei bedient man sich einer modifizierten Methode der kleinsten Quadrate, welche die Mitte des breitbandig erscheinenden Differenzspektrums ermitteln lässt (He et al., 2014). Das resultierende gemittelte Differenzspektrum ist in Abbildung 6B (rote Linie) dargestellt. Mittels Subtraktion des gemittelten Differenzspektrums vom breitbandig erscheinenden Differenzspektrums (Signal „c“ minus Signal „d“) wird ein korrigiertes Differenzspektrum generiert (blaue Linie), auf welchem schließlich die Rekonstruktion des reinen Raman-Spektrums als Differenzgleichung basiert, (Gebrekidan et al., 2016). Abbildung 6C zeigt dieses rekonstruierte Differenzspektrum (schwarze Linie).

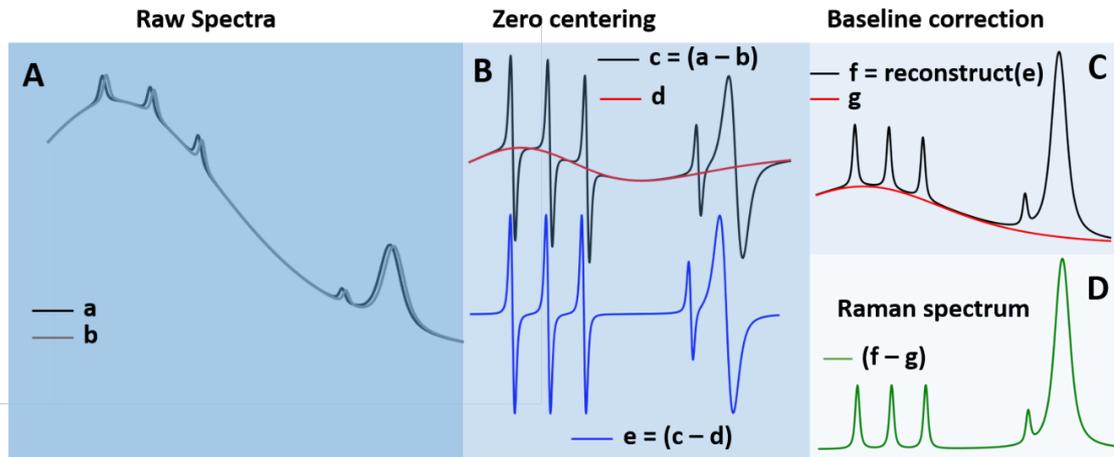


Abbildung 6: schematisches Verfahren zur Extraktion eines reinen Raman-Spektrums dargestellt anhand eines simulierten Fluoreszenzhintergrunds

Da das erhaltene rekonstruierte Spektrum weiterhin einen schwachen Fluoreszenzhintergrund enthält, gilt es diesen zu eliminieren. Hierzu dient eine Basislinienkorrektur auf Grundlage einer stückweisen asymmetrischen Anpassung der kleinsten Quadrate (Abbildung 6C, rote Linie) (Gebrekidan et al., 2016) basierend auf dem Bayes'schen Optimierungssatz. Dieser lässt die Parameter unter Berücksichtigung der Verlustfunktion optimiert als Mittelwert des nullzentrierten Differenzspektrums berechnen. Letztlich erhält man ein reines Raman-Spektrum (Abbildung 6D). Die hier beschriebene Extraktion reiner Raman-Spektren nach der SERDS-Methode, sowie die vorangegangene automatische Erfassung von Spektren ausgewählter Messstellen, erfolgt mittels einer Softwareanwendung, die in enger interdisziplinärer Zusammenarbeit mit einem der Arbeitsgruppe angehörenden Bioingenieur entwickelt wurde. In Abbildung 7 findet sich die Benutzeroberfläche dieser Softwareanwendung dargestellt.

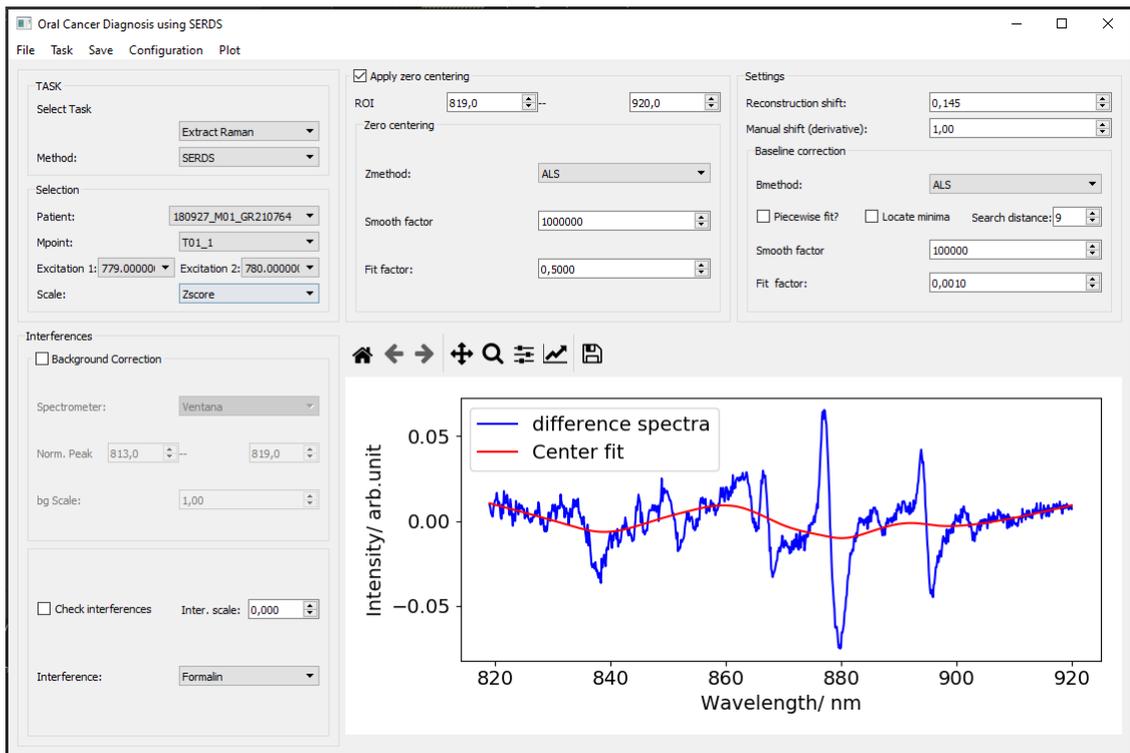


Abbildung 7: Benutzeroberfläche der eigens entwickelten Softwareanwendung

Darüber hinaus beinhaltet die Software einen Algorithmus für die Voigt-Profil-Anpassung. Diese erlaubt die präzise Zuordnung spektraler Merkmale innerhalb eines Spektrums zu ihren jeweiligen molekularen Ursprüngen durch Fraktionierung der Raman-Banden. Wie Abbildung 8 beispielhaft zeigt, werden für die Anpassung des Voigt-Profiles an das Raman-Spektrum gesunder Mundschleimhaut die Raman-Banden in ihre „Untermerkmale“ zerlegt, um somit die Position der diskriminierenden Raman-Spitzen präzise erfassen zu können.

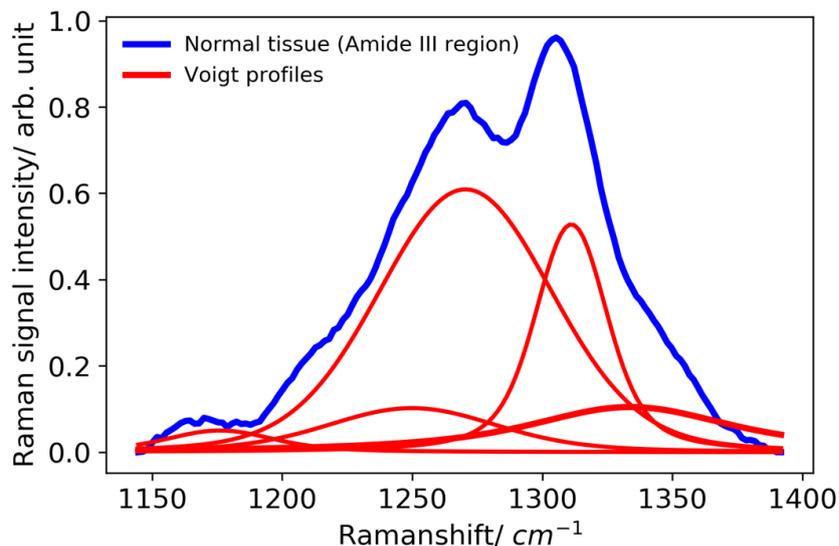


Abbildung 8: Entfaltung der Raman-Banden mittels Voigt-Profil-Anpassung

Die Gruppierung der akquirierten Spektren erfolgt unter der Verwendung eines optimierten Klassifizierungsmodells. Eine detailliertere Beschreibung des Klassifizierungsmodells wird im folgenden Abschnitt vorgenommen.

3.6. Datenprozessierung

Nach erfolgter Extraktion der Rohspektren sowie Entfaltung der Raman-Banden mittels Voigt-Profil-Anpassung innerhalb der Softwareanwendung, werden die gewonnenen Daten der mathematischen Datenanalyse zugeführt. Dem Ziel dieser Arbeit folgend werden zur Unterscheidung zwischen physiologischer Mundschleimhaut und OSCC-Läsionen ausschließlich Raman-Verschiebungen zwischen 630 bis 1800 cm^{-1} berücksichtigt. Die Datenanalyse umfasst sowohl die Datenprozessierung mittels Hauptkomponentenanalyse zur Erkennung signifikanter spektraler Muster der Gewebeproben als auch die auf Linearer Diskriminanzanalyse basierenden Klassifikation der untersuchten biologischen Gewebe. Beide genannten Verfahren werden nachfolgend kurz erläutert.

3.6.1. Hauptkomponentenanalyse (*Principal Component Analysis* – PCA)

Die Hauptkomponentenanalyse (*Principal Component Analysis*; PCA) ist eine Methode der Vorbehandlung zur Reduzierung der Anzahl der spektralen Parameter durch Generierung eines neuen Satzes unabhängiger Merkmale, geordnet nach der größten Variabilität im Datensatz (Khan and Farooq, 2012). Sie wird in der Regel verwendet, um die Dimensionalität eines Datensatzes miteinander in Beziehung stehender Variablen zu reduzieren, während die aussagekräftigen Dimensionen, die den größten Teil der Informationen ausmachen, erhalten bleiben. Die grundlegende Idee der PCA besteht darin, Hinweise auf Hauptkomponenten im Originaldatensatz aufzufinden, die sich in Form hoher Datenvarianz darstellen. Die Anzahl dieser Hauptkomponenten wird so gewählt, dass sie für die Dimensionalitätsreduktion oder Datenkompression kleiner ist als die Zahl der ursprünglichen Variablen. Nachfolgend wird ein neuer Datensatz mit reduzierter Dimensionalität durch Projektion des Originaldatensatzes auf die ausgewählten Hauptkomponenten erstellt. Hauptkomponenten ergeben sich hierbei als orthogonale Achsen, als gedrehte Version der ursprünglichen Achsen in Ausrichtung der maximalen Datenvarianz (s. Abbildung 9).

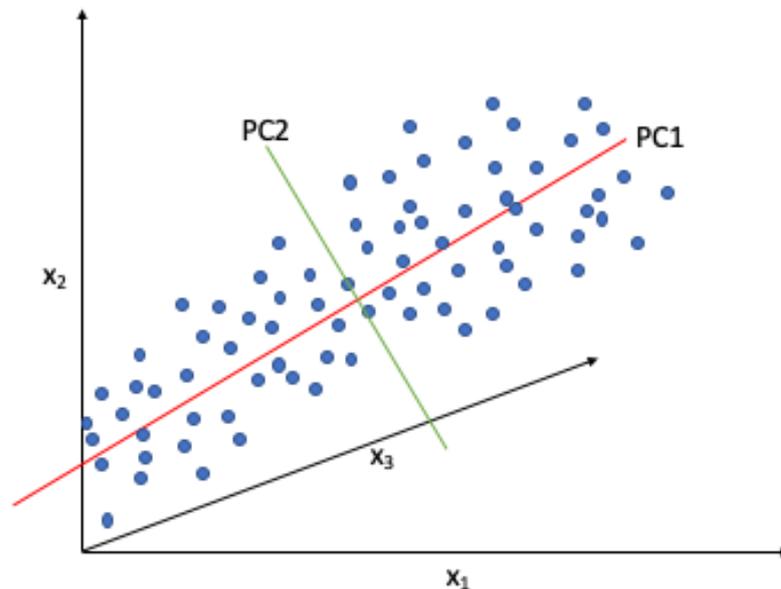


Abbildung 9: Beispiel einer Hauptkomponentenanalyse

Die Mathematik zur Ermittlung der PCA basiert auf der Berechnung von Kovarianzmatrizen, Eigenwerten und Eigenvektoren. Zur Verbesserung der Leistung und Interpretierbarkeit der Daten erfolgt zunächst deren Mittelwertzentrierung, d.h. die Mittelwerte aller Variablen gleich Null zu setzen. Aus den resultierenden, mittelzentrierten Daten lässt sich eine Kovarianzmatrix der Variablen berechnen, aus welcher sich die Eigenwerte und Eigenvektoren dieser Matrix in Form der Hauptkomponenten ableiten lassen. Die so genannte erste Hauptkomponente schneidet durch die größte Datenvariation (s. Abbildung 9) und dient als führende Informationsquelle über die Variablen mit dem höchsten Prozentsatz an Variation. Auch entspricht diese dem größten Eigenwert der Kovarianzmatrix. Die übrigen Hauptkomponenten umfassen die Restvarianz der Daten im Verhältnis zu den Eigenwerten, denen sie entsprechen. Hauptkomponenten mit nur geringer Datenvarianz bleiben dabei unberücksichtigt, ohne die nützlichen Informationen im Originaldatensatz zu beeinträchtigen. Auf diese Weise kann durch Auswahl der Hauptkomponenten als Repräsentation des größten Teils der ursprünglichen Dateninformationen ein neuer Datensatz mit weniger Dimensionen gebildet werden (Gebrekidan, 2014).

3.6.2. Lineare Diskriminanzanalyse (Linear Discriminant Analysis – LDA)

Für die nachfolgende Untersuchung des Ausmaßes der Differenzierung zwischen OSCC-Läsionen und physiologischer Mundschleimhaut wird die Lineare Diskriminanzanalyse (Linear Discriminant Analysis; LDA) verwendet. Hierbei handelt es sich um eine Methode, welche der multivariaten Datenanalyse zugeordnet wird und der Analyse von Gruppenunterschieden dient. Durch dieses Verfahren lassen sich mehrere Gruppen anhand mehrerer Variablen in Bezug auf ihre Unterschiedlichkeit prüfen (Backhaus et al., 2018). Ähnlich wie bei der PCA wird auch hier eine Linearkombination zwischen den Variablen gebildet. Jedoch ist das Ziel der LDA eine möglichst eindeutige Trennung der Gruppen (Danzer et al., 2001). Für diese Trennbarkeit sucht die LDA einen Projektionsvektor, welcher durch die Maximierung einer Zielfunktion so bestimmt wird, dass der Abstand zwischen den Mittelwerten der verschiedenen Klassen zunimmt, während die Variabilität der Daten innerhalb jeder Klasse, die so genannte Streuung, minimiert wird (Gebrekidan, 2014). Das Klassifikationsmodell der LDA wird durch eine fünffache Kreuzvalidierung getestet, bei welcher der Spektraldatensatz mittels iterativer Schleife in Trainings- und Testdatensätze unterteilt wird. Pro Kreuzvalidierungsiterationsschleife werden ca. 80 % des Datensatzes zum Trainieren des Modells und ca. 20 % des Datensatzes zum Testen seiner Prädikationsfähigkeit verwendet. Darüber hinaus wird eine verschachtelte innere Kreuzvalidierung implementiert. Anhand dieser lässt sich auf Grundlage einer sequentiellen modellbasierten Optimierung, auch als Bayes'sche Optimierung bekannt, die optimale Anzahl von Hauptkomponenten und Hyperparametern des Klassifikators berechnen (Bergstra et al., 2015). Abbildung 10 veranschaulicht dieses Klassifizierungsschema.

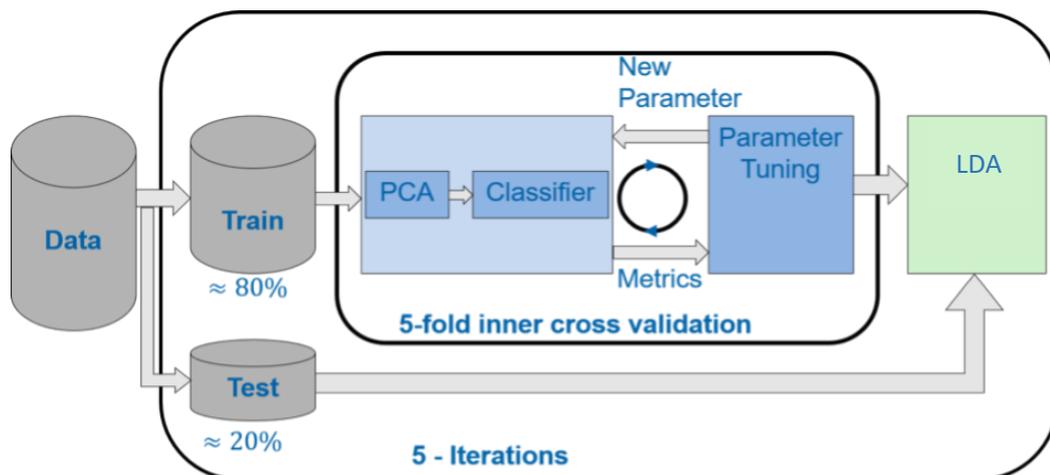


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Datenverarbeitung und Klassifizierung

Darüber hinaus wurde dem Klassifikator eine gleichmäßige Verteilung beider Klassen für das Training zugewiesen, indem Methoden zur Lösung von Datenungleichgewichten angewandt werden. So wird auf diese Weise eine unbeabsichtigte Voreingenommenheit des Klassifikators für Klassen mit Minderheitsdatensätzen vermeidbar (Chawla et al., 2002).

4. Ergebnisse

4.1. Standardisierung der Messreihe an kleinsten Gewebeproben der Mundhöhle

Bereits in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe (Gebrekidan, 2014, Gebrekidan et al., 2018, Knipfer et al., 2015) fand das SERDS-Verfahren erfolgreich Anwendung in der Analyse von Gewebe physiologischer Mundschleimhaut wie auch des OSCC. In Fortsetzung dieser Vorarbeiten liegt der Fokus der hier erstellten Arbeit nicht mehr auf den Gesamtresektaten dieser Entitäten, sondern kleinsten Gewebeproben mit variabler Schichtdicke, Post-Prozessierung sowie Topographie. Somit können die bisherigen Ergebnisse und erarbeiteten Spezifikationen (Abstände zwischen der Messsonde und den Gewebeproben, Integrationszeiten, Anregungswellenlängen sowie Intensität des Lasers) Anhaltspunkte für die aktuell zu nutzenden Spezifikationen des eingesetzten SERDS-Systems finden.

Bereits seit Beginn der Vorarbeiten unterliegen Instrumentarium sowie analytische Methodik des angewandten Messverfahrens stetiger Kontrollen und Weiterentwicklungen durch unsere Arbeitsgruppe. Auch die vorliegende Arbeit zielt auf eine Optimierung des SERDS-Systems zur Gewinnung möglichst stör- und fehlerfreier Raman-Spektren an kleinsten Gewebeproben. Dazu werden zunächst für das neu entwickelte und optimierte Raman-Messsystem geeignete Einstellungsparameter etabliert. Dies erfolgt in enger interdisziplinärer Zusammenarbeit und mit der Expertise eines auf Raman-spektroskopische Anwendungen im medizinischen Bereich spezialisierten Ingenieurs der TU Bergakademie Freiberg. Der hier Anwendung findende detaillierte Aufbau ist unter 3.1 erläutert.

Da sich die vorliegende Arbeit auf die Untersuchung kleinster Gewebeproben von wenigen Millimetern Größe konzentriert, ist es ein wichtiges Ziel, prä- und intraanalytische Störfaktoren zu eliminieren, um fehlerhafte Ergebnisse zu vermeiden. Zu diesem Zweck werden im Folgenden bereits vorhandene Literatur zu ähnlichen Versuchsreihen und die Erfahrungen aus Vorarbeiten der Arbeitsgruppe vorgestellt und diskutiert.

4.1.1. Auswahl des optimalen Abstands zwischen Messsonde und Gewebeprobe

Der Abstand zwischen Gewebeprobe und Sondenspitze sollte möglichst der Brennweite der Linse entsprechen, um somit den Brennpunkt des Lasers innerhalb des Zielobjektes zu positionieren. Auf diese Weise wird ein Volumen erzeugt, welches durch eine hohe Leistungsdichte die Lichtstreuung optimiert und diesem ein Höchstmaß an detektierter Streuung zuzuordnen lässt (Smith and Dent, 2019). Die Brennweite der im technischen Setup gewählten achromatischen Linse an der Spitze der Raman-Sonde beträgt 7-10 mm (AC080-010-B-ML von Thorlabs), welche der Distanz der Gewebeprobe zur Sondenspitze entspricht. Die oft unregelmäßige Beschaffenheit von Gewebeprobe aus Exzisionsbiopsien steht einer festgelegten Distanzeinstellung zwischen Gewebeprobe und Sondenspitze entgegen. Diese ist daher zur Erfassung optimaler Raman-Spektren individuell zu fokussieren. So werden die Proben in der vertikalen Ebene mittels manuell justierbarem Hebetisch unter Beobachtung der Intensität der Rohspektren bewegt. Befindet sich der Fokus innerhalb der Gewebeprobe, ist ein starkes Rohspektrum zu beobachten. Dieses reduziert sich jedoch unter abnehmender Zentrierung aus dem Gewebe.

4.1.2. Auswahl einer geeigneten Integrationszeit

Die Integrationszeit beschreibt die Zeitspanne, in der ein einzelnes Raman-Spektrum aufgenommen wird. Durch eine Zunahme der Integrationszeit steigt die Raman-Signalintensität, da mehr Photonen detektiert werden können. Dieses ist jedoch mit einem erhöhten Fluoreszenzrauschen verbunden und damit einer Reduktion des Signal-/Rausch-Verhältnisses. Darüber hinaus sind für Anwendungen an biologischen Geweben kurze Integrationszeiten notwendig, um exogene Alterationen durch thermische Denaturierung auszuschließen, zudem um die Praktikabilität der klinischen Nutzung zu optimieren. Die Integrationszeit von drei Sekunden, entsprechend einer bereits publizierten Studie der eigenen Arbeitsgruppe (Knipfer et al., 2015), basiert im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit auf Untersuchungen zusammenhängender Tumormassen (engl. bulk tumor). Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit richtet sich dagegen auf Raman-spektroskopische Untersuchungen kleinster Biopsate unter gewebsschonender Verkürzung der Integrationszeit auf eine Sekunde.

4.1.3. Auswahl geeigneter Wellenlängen

Anregungswellenlängenbereich

Bei der Anwendung der Raman-Spektroskopie kommt der Auswahl der Anregungswellenlänge eine entscheidende Bedeutung zu (Butler et al., 2016). Diese hat einen erheblichen Einfluss auf Empfindlichkeit und Intensität des Raman-Spektrums, dessen räumliche Auflösung sowie die Auswirkung des Fluoreszenzhintergrundes auf die Signaldiskriminierung, da sich die Intensität des Raman-Signals umgekehrt proportional zur vierten Potenz der Anregungswellenlänge verhält. Hieraus ergibt sich für eine niedrige Anregungswellenlänge eine höhere Intensität des Raman-Signals. Zusätzlich findet sich eine Steigerung der räumlichen Auflösung mit sinkender Anregungswellenlänge. Jedoch zeigt sich bei niedrigen Anregungswellenlängen eine erhöhte Störung durch den Fluoreszenzhintergrund (Devpura et al., 2014). Grundsätzlich kann dieser negative Fluoreszenzeffekt auf ein Raman-Spektrum durch eine präzise Anpassung der Anregungswellenlänge weitgehend minimiert werden (Butler et al., 2016).

Dies ist z.B. der Fall, wenn Anregungswellenlängen unterhalb einer Schwelle von ca. 270 nm gewählt werden (Hanlon et al., 2000). Jedoch birgt die Verwendung dieser energiereichen Wellenlängen im UV-Bereich das Risiko einer Licht-induzierten Schädigung der Probe (Krafft and Sergo, 2006).

Anregungswellenlängen von über 270 nm lassen den Fluoreszenzhintergrund mit steigender Anregungswellenlänge hin zum NIR-Bereich abnehmen. Doch nimmt auch gleichzeitig die Intensität des Raman-Signals ab, sodass ein Kompromiss zwischen möglichst geringem Fluoreszenzhintergrund und ausreichender Intensität des Raman-Signals zu finden ist (Pålsson, 2003).

Unter der Prämisse dieses Kompromisses konnten Vorarbeiten der Arbeitsgruppe zeigen, dass sich Anregungswellenlängen im roten Spektralbereich bei ca. 785 nm für die Charakterisierung von biologischen Geweben als optimal erweisen (Gebrekidan et al., 2016, Knipfer et al., 2015).

Anregungswellenlängen-Shift

Wie bereits erwähnt, wird in der vorliegenden Arbeit das SERDS-Verfahren als Methode zur Spektrenverarbeitung gewählt. Die Grundlage bildet die Subtraktion zweier mit leicht unterschiedlichen Anregungswellenlängen aufgenommener Spektren voneinander, welche die Eliminierung des

Fluoreszenzhintergrundes ermöglicht. Das Raman-Differenzspektrum bleibt jedoch erhalten (Gebrekidan et al., 2016). In einer Vorarbeit der Arbeitsgruppe aus dem Jahr 2016 werden fünf unterschiedliche Anregungswellenlängen (784, 784.1, 784.4, 784.5 und 785) angewendet, um die Auswirkung der einzelnen Anregungswellenlängendifferenzen auf die Qualität der rekonstruierten Spektren zu vergleichen. Als Ergebnis ergibt sich die Empfehlung einer Differenz der Anregungswellenlängen von 1 nm (entsprechend einer Wellenzahlverschiebung von ca. 16.3 cm^{-1}), da sich hiermit eine Optimierung der Spektren durch erhöhte Signalintensität erzielen, und der Klassifizierungsfehler von Geweben reduzieren lässt (Gebrekidan et al., 2016). Aufgrund dieser Erkenntnisse bietet der Einbau eines Kurzpassfilters und die Wahl der Anregungswellenlängen von 779 und 780 nm für die vorliegende Arbeit einen adäquaten Kompromiss zwischen der Stärke des Fluoreszenzhintergrunds und der Intensität des Raman-Signals.

4.1.4. Auswahl einer geeigneten Intensität des Lasers

Da das Raman-Signal von Natur aus schwach ist, werden vergleichsweise hohe Laserleistungen von ca. 100 – 300 mW benötigt (Pålsson, 2003). Je nach Art der Probe sind die Belichtungszeiten und Laserleistungen auf Bereiche einzustellen, welche Schädigungen der Probe vermeiden lassen (Smith and Dent, 2019).

In einer Vorarbeit der Arbeitsgruppe aus dem Jahr 2014 wird bereits festgestellt, dass neben der unter 4.1.3 diskutierten Anregungswellenlänge auch die Leistung des Lasers sowohl eng mit der Wahrscheinlichkeit einer Gewebeschädigung als auch mit der Qualität der aufgenommenen Raman-Spektren korreliert (Gebrekidan, 2014). Daher ist es von maßgeblicher Bedeutung für ein optimales Ergebnis diese Parameter korrekt aufeinander einzustellen. Den Analysen erwähnter Vorarbeiten zufolge, sind bei einer Laserleistung von 115 mW und einer Anregungswellenlänge von 785 nm keine signifikante Alteration der zellulären wie auch intrazellulären Komponenten des zu untersuchenden Gewebes zu beobachten. Das histopathologische Bild und die Befundung werden demnach nicht durch die biooptische Untersuchung alteriert (Leunig et al., 2000). Basierend auf diesen Erkenntnissen wie auch den Erfahrungen der eigenen Arbeitsgruppe, wird die Laserleistung von 115 mW

standardisiert und vor jeder Messung mittels einer digitalen optischen Leistungs- und Energiemesskonsole (PM100D von Thorlabs, Newton, New Jersey, USA) validiert.

4.2. Forschungsfrage (1): Validierung der Methodik durch die Akquise reiner Raman-Spektren von kleinsten *ex vivo* Gewebeproben physiologischer Mundschleimhaut und OSCC

Die vorliegende Arbeit basiert auf der Analyse von insgesamt 47 Gewebeproben (30 = OSCC; 17 = physiologische Mundschleimhaut; Patient:innen: n=29). Aus 30 OSCC-Gewebeproben wurden unter Einbeziehung von 119 Messpunkten insgesamt 11.900 Einzelspektren akquiriert und diese zu 238 gemittelten Raman-Spektren verarbeitet. Aus 17 Gewebeproben physiologischer Mundschleimhaut wurden unter Einbeziehung von 61 Messpunkten insgesamt 6.100 Einzelspektren akquiriert, aus welchen wiederum 122 gemittelte Raman-Spektren extrahiert ausgewertet werden (Tab. 1).

Tabelle 1: Der Arbeit zugrunde liegende Patient:innen, Proben und Messungen

	OSCC	gesunde Mundschleimhaut
Gesamtanzahl an Gewebeproben	47	
Gesamtanzahl an Patient:innen	29	
Gewebeproben	30	17
Messpunkte	119	61
gesammelte Einzelspektren	11.900	6.100
gesammelte mittlere Spektren	238	122

Als Grundlage der Suche nach Differenzierungsmerkmalen der unterschiedlichen Gewebe werden zunächst mittels SERDS-Verfahren jeweils ein gemitteltes Raman-Spektrum für OSCC-Gewebe sowie eines für physiologische Mundschleimhaut rekonstruiert. Abbildung 11 zeigt diese exemplarischen mittleren Raman-Spektren, wobei sich die molekularen Gewebebestandteile den spektralen Raman-Spitzen zuordnen lassen. In Tabelle 2 findet sich die Aufstellung der spektralen Raman-Merkmale unter Zuordnung zu deren molekularem Ursprung laut Literatur zusammengefasst

(Movasaghi et al., 2007, Venkatakrishna et al., 2001). Durch Präzisierung der Raman-Spitzen mittels Voigt-Profil-Anpassung lässt sich bereits ein grundsätzlicher Unterschied im gesamten Spektralbereich gesunder Mundschleimhaut gegenüber OSCC-Gewebe darstellen. Dieser findet seine deutlichste Ausprägung jedoch in der so genannten Fingerprint-Region (1200-1800 cm^{-1}). Gesunde Mukosa weist hier durch einen dominanten Lipidmolekülanteil, eine starke CH_2 -Bande um 1448 cm^{-1} , zwei scharfe Spitzen/Banden um die Amid-III-Region, die schärferen Spitzen um die Amid-I-Region und das Fehlen des spektralen Merkmals der Nukleinsäure als gewebstypische Merkmale auf. Signifikant anders verhalten sich die spektralen Merkmale pathologischer Mundschleimhaut: auffällig sind hier die breiteren

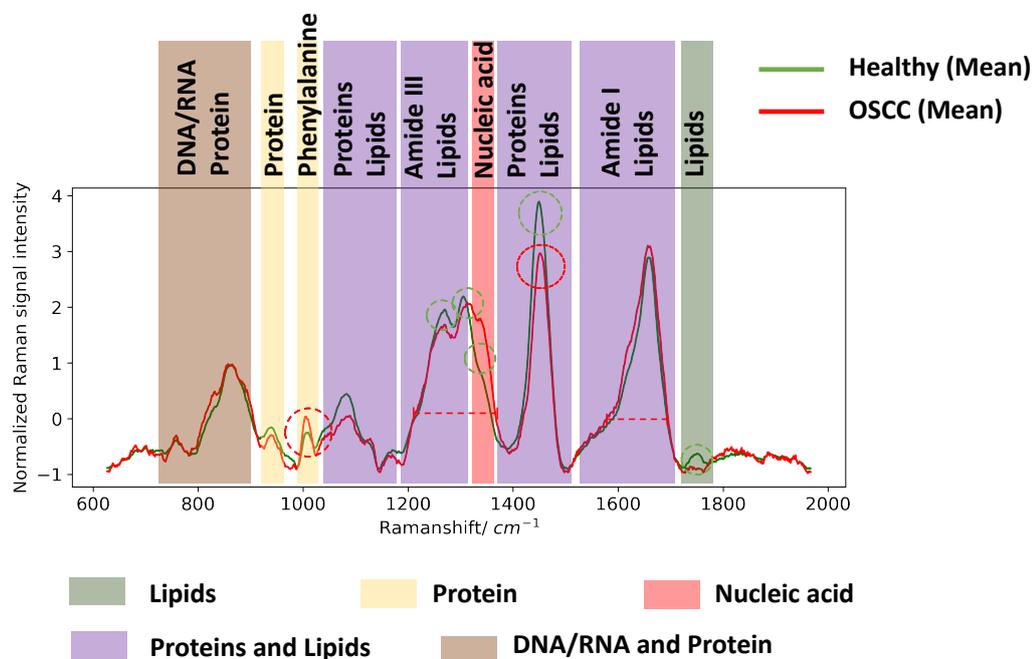


Abbildung 11: Rekonstruierte mittlere Raman-Spektren von physiologischer Mundschleimhaut (grüne Linie) sowie OSCC-Gewebe (rote Linie) mit Spitzen-Positionszuordnung zu ihrem jeweiligen molekularen Ursprung. Lipide (hellgrün), Protein (hellgelb), sowohl Proteine als auch Lipide (lila), Nukleinsäure (hellrot) sowie Proteine, Nukleinsäure und Kohlenhydrate (hellbraun).

Amid-I- und III-Regionen, eine verschobene und schwächere CH_2 -Bande sowie die dominante Phenylalanin-Spitze.

Im Vergleich der gemittelten Raman-Spektren (s. Abbildung 11) lassen sich somit spezifische spektrale Merkmale physiologischen Mundschleimhautgewebes von OSCC-Gewebe differenzieren. Als führendes Unterscheidungskriterium stellt sich die Spitze um 1750 cm^{-1} dar. Diese resultiert aus der Vibration der C=O- Lipidbindung und findet sich exklusiv im

Raman-Spektrum der Proben aus physiologischer Mundschleimhaut. Als weiteres Kriterium der Unterscheidung zwischen OSCC- und physiologischem oralen Gewebe erweist sich die Spitze bzw. die Bande um 1656cm^{-1} im Amid-1-Bereich, welche aus den C=C-Lipidbindungen resultiert und sich im Spektrum der physiologischen Mundschleimhaut schärfer als die Amid-1-Spitze des OSCC-Gewebes um 1658cm^{-1} darstellt. Darüber hinaus ist auch der Spektralbereich um 1448cm^{-1} als valides Unterscheidungsmerkmal zu identifizieren. Hier erscheint die CH_2 -Bande des physiologischen Gewebes durch CH_2 -Biegung bzw. Verformung in ihrer Intensität verstärkt und gegenüber OSCC-Gewebe signifikant verschoben. Im OSCC-Gewebe dagegen erweisen sich sowohl das prominente Spektralmerkmal des Phenylalanins um 1003cm^{-1} , als auch die deutlich ausgeprägte Spitze der Nukleinsäure (1340cm^{-1}) als dominante Unterscheidungskriterien der Raman-Spektren.

Tabelle 2: Zuordnung der spektralen Merkmale im mittleren Raman-Spektrum zu den Molekülschwingungen und dem molekularen Ursprung (Movasaghi et al., 2007, Venkatakrishna et al., 2001)

physiologisches Gewebe	OSCC-Gewebe	Hauptzuordnung	molekularer Ursprung
1003	1002	Phenylalanin	Protein
	1340	Nukleinsäure	
1448		CH_2 Biegung/Deformation	Lipid
	1450	CH_2 Biegung	Protein
1656		C=C	Lipid
	1658	Amid-I (α -helix)	Protein
1750		C=O (Lipid in gesunder Mukosa)	Lipid

4.3. Forschungsfrage (2): Identifikation einflussnehmender Faktoren auf die Methodik der akquirierten Raman-Spektren

4.3.1. Interferenzen durch Reste steriler Mullkompressen

Sterile Mullkompressen (Fink und Walter GmbH) sind häufig verwendete Operationsmaterialien. Ihr Einsatz erfolgt vor allem zur Stillung von Blutungen durch Kompression, zur Befreiung kontaminierter Geweboberflächen von Blut, Verunreinigungen bzw. Rückständen sowie zur Lagerung und Schutz von Präparaten oder Biopsaten während des Transports zur histopathologischen Aufarbeitung und Befundung. Durch den Kontakt mit Mullkompressen sind jedoch Verunreinigungen der Gewebeproben durch Materialbestandteile der Kompressen mit Auswirkungen auf die Rohspektren nicht ausgeschlossen. Dies zeigen Störungen im Raman-Spektrums des hoch sensibel reagierenden Spektroskops: der Querschnitt des Raman-Spektrums der untersuchten Mullkompressen überlagert den des oralen Gewebes deutlich und stört somit das zu analysierende Spektrum der Gewebeproben (s. Abbildung 12).

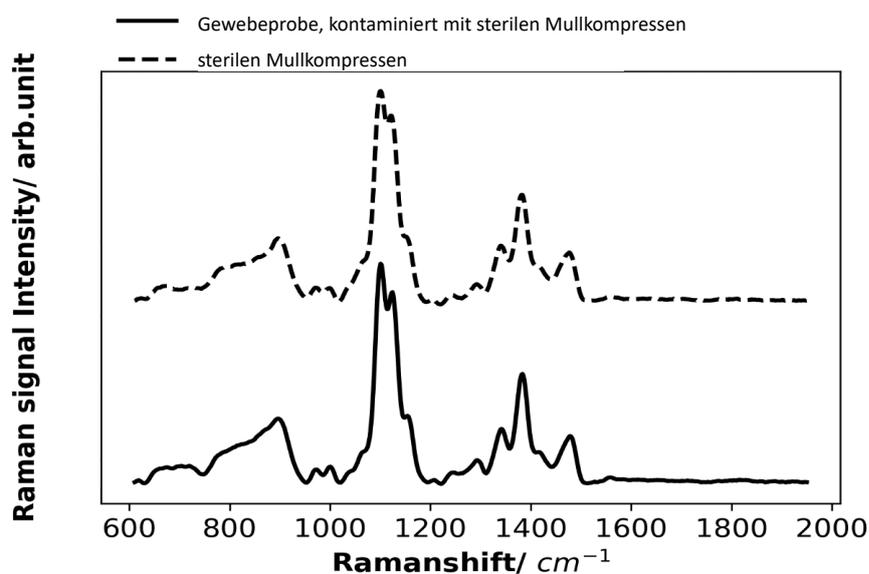


Abbildung 12: Raman-Spektrum von sterilen Mullkompressen (schwarz gestrichelte Linie) und Raman-Spektrum von oralem Gewebe, welches mit sterilen Mullkompressen verunreinigt ist (schwarze durchgezogene Linie)

Als Ursache störender spektraler Interferenzen lassen sich somit Bestandteile verwendeter steriler Mullkompressen identifizieren, sodass im weiteren Verlauf der Untersuchungen auf deren Verwendung gänzlich verzichtet wird.

4.3.2. Interferenzen aufgrund unzureichender Schichtdicke der Gewebeproben

Die Entnahme von Gewebeproben für diagnostische Zwecke setzt einerseits eine ausreichende Größe des Präparates aus dem verdächtigen Gebiet der Mundschleimhaut des/der Patient:in voraus. Andererseits ist der Eingriff

möglichst atraumatisch und wenig belastend für den/die Patient:in vorzunehmen. Dies ist notwendig, um eine korrekte Betrachtung und Diagnosestellung durch den Pathologen und eine adäquate Wundheilung für den/die Patient:in zu gewährleisten. Die Schichtdicke der Gewebeproben hat dabei einen entscheidenden Einfluss auf die Akquirierung reiner Raman-Spektren oraler Schleimhaut. So führen Interferenzen mit selbstklebenden Abdecktüchern (Foliodrape, Paul Hartmann AG), auf welchen die Gewebeproben aus Hygienegründen während der Messungen gelagert werden,

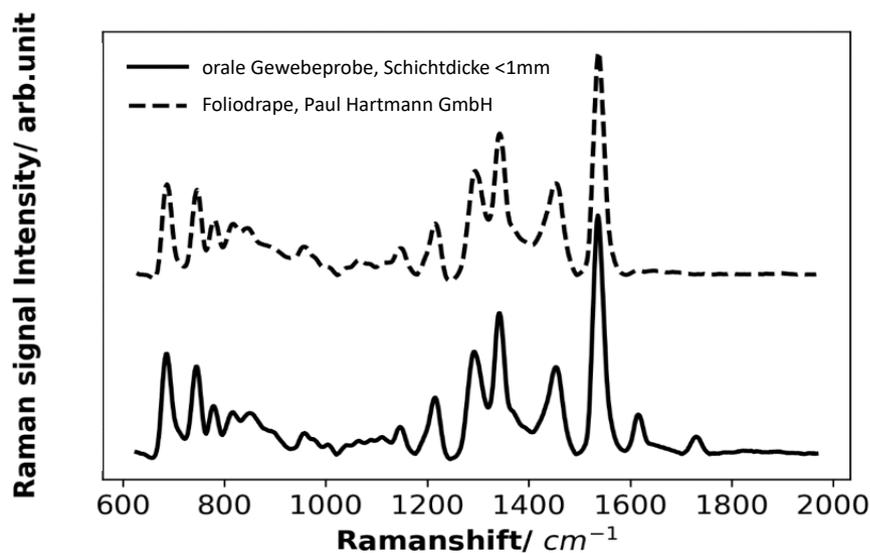


Abbildung 13: isoliertes Raman-Spektrum von Foliodrape (gestrichelte Linie) und Raman-Spektrum einer *ex vivo* Gewebeprobe aus der Mundhöhle mit einer Schichtdicke von weniger als 1mm, welche auf Foliodrape platziert wurde (durchgezogene Linie)

zu Störungen des Raman-Spektrums. Bei einer NIR-Anregungsenergie der Probe von 785 nm durchdringt der Laserstrahl diese aufgrund geringer Schichtdicke unter Erfassung der untergelegten Abdecktücher mit der Folge von Überlagerungsstörungen (s. Abbildung 13).

Das Raman-Spektrum des Gewebes wird vollständig durch das Spektrum des darunter liegenden Materials überdeckt. Ursächlich für diese Interferenz lässt sich die deutlich höhere Raman-Streuung des Foliodrapes identifizieren. Das vergleichsweise niedrige Raman-Streuungssignal der Gewebeproben wird unter dieser Bedingung nahezu vollständig vom intensitätsdominanten Raman-Spektrum des Fremdmaterials überlagert.

Um derartige negative Effekte zu vermeiden, wird in einem nachfolgenden Experiment die Mindestschichtdicke für Gewebeproben eruiert, welche Stör-

und Schädigungseffekte ausschließen lässt. Hierzu wird als Ersatz für humane Biopsien handelsübliches Hühnerfleisch in Schichtdicken von 1, 3 und 5 mm eingesetzt, auf schwarzer Teflonfolie platziert und mittels zuvor dargestellter Untersuchungsmethode Raman-spektroskopisch gemessen (s. Abbildung 14). Für jede angegebene Schichtdicke wird eine Hühnerfleischgewebeprobe (N = 3; 1 mm: n = 1; 3 mm: n = 1; 5 mm: n = 1) unter der Einbeziehung eines Messpunktes Raman-spektroskopisch gemessen. So werden für jede Schichtdicke 20 Einzelspektren akquiriert und aus diesen jeweils ein gemitteltes Raman-Spektrum extrahiert. Bei Betrachtung dieser Raman-Spektren zeigt

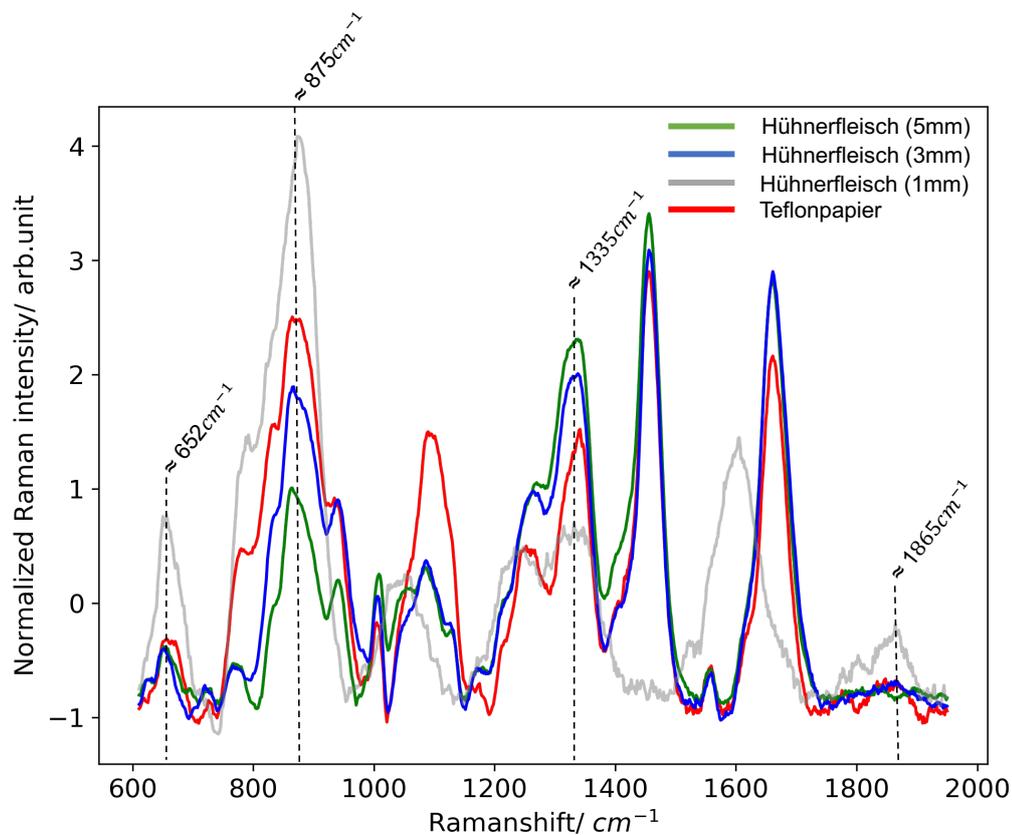


Abbildung 14: Raman-Spektren von Proben handelsüblichen Hühnerfleisches in unterschiedlichen Schichtstärken platziert auf schwarzer Teflonfolie: 1 mm (grau), 3 mm (blau), 5 mm (grün). Isoliertes Raman-Spektrum von schwarzer Teflonfolie ist ebenfalls dar

sich, dass mit Abnahme der Gewebeschichtstärke die störende Interferenz durch schwarze Teflonfolie in den Regionen um 652 cm^{-1} , 875 cm^{-1} und 1865 cm^{-1} zunimmt. So bildet sich eine prominente, scharfe Spitze des Raman-Spektrums durch die Teflonfolie invers zur Probenschichtdicke aus. Als Ursache für dieses Phänomen erweist sich auch hier eine fokale Miterregung der schwarzen Teflonunterlage, welche zu störenden Interferenzen mit Gewebeprobe von unter 3 mm Schichtdicke führt. Weitere spektroskopische

Untersuchungen werden daher ausschließlich an Gewebeproben und -resektaten mit einer Schichtdicke von mindestens 3 mm durchgeführt.

4.4. Forschungsfrage (3): Differenzierbarkeit kleinster humaner in 0,9 %iger NaCl-Lösung gelagerten Gewebeproben von physiologischer Mundschleimhaut und OSCC-Gewebe

Um die Differenzierbarkeit kleinster, humaner Gewebeproben von physiologischer Mundschleimhaut und OSCC-Gewebe zu testen, erfolgte die Anwendung der Hauptkomponentenanalyse (PCA = principal component analysis) sowie der Linearen Diskriminanzanalyse (LDA = linear discriminant analysis). Hierfür werden die 30 Messungen von OSCC-Geweben und die 17 Messungen von physiologischer Mundschleimhaut verwendet, deren Ergebnis sich in Abbildung 15 als Hauptkomponentenanalyse dargestellt finden. Dabei repräsentieren die grünen Punkte physiologische Mundschleimhaut, während die roten Punkte OSCC-Gewebe darstellen. Die Gewebearten sind nach den ersten drei Hauptkomponenten (PC1, PC2, PC3) angeordnet. Wie aus dem PCA-Cluster hervorgeht, weisen diese deutliche Unterschiede in ihrer räumlichen Anordnung mit minimaler Überlappung auf. In diesem Datensatz

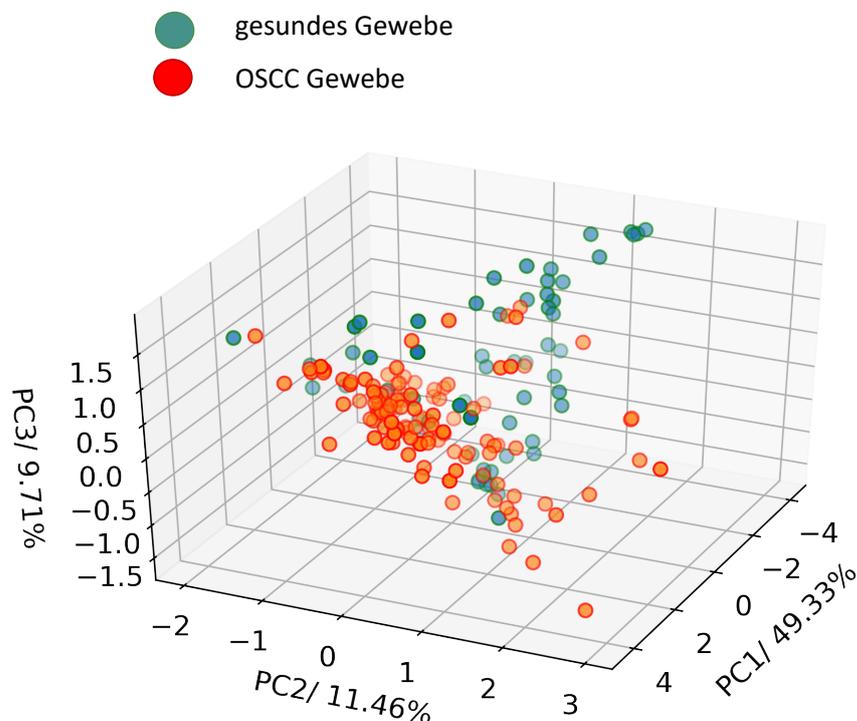


Abbildung 15: Ergebnisse der Hauptkomponentenanalyse generierter Raman-Spektren von OSCC-Läsionen (n=30; rote Punkte) und physiologischer Mundschleimhaut (n=17; grüne Punkte) von insgesamt 47 Patient:innen

enthält die erste Hauptkomponente 49,33 % der spektralen Variation der beiden Gewebearten, während die zweite Hauptkomponente 11,46 % und die dritte 9,71 % umfasst.

Die Durchführbarkeit der Klassifizierung von physiologischem Gewebe und OSCC-Gewebe wird mittels linearer Diskriminanzanalyse (LDA) untersucht. Dazu wird ein LDA-Klassifikationsmodell erstellt, um eine Unterscheidbarkeit der Datensätze von physiologischer Mundschleimhaut und OSCC-Gewebe zu ermöglichen. Die Leistung der angewendeten Klassifikatoren ist in Abbildung 16 als Receiver-Operating-Curve = ROC (dt. Grenzwertoptimierungskurve) dargestellt. Bei der Klassifizierung von physiologischer Mundschleimhaut vs. OSCC-Gewebe wird eine fünffache Kreuzvalidierungsgenauigkeit von 93,9 % mit einer Sensitivität von 97,5 % und einer Spezifität von 96,9 % erzielt. Die Fläche unter der Kurve (Area under the Curve = AUC) wird mit 0,99 ermittelt, wobei nur 11 der 180 Messpunkte einer Fehlklassifizierung, entsprechend einem Klassifikationsfehler von 6,1 %, zuzuordnen sind.

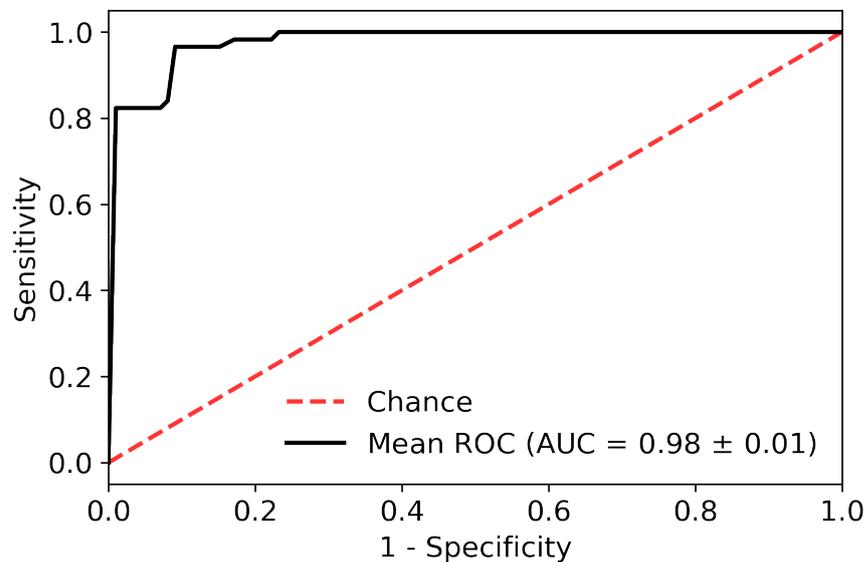


Abbildung 16: Grenzwertoptimierungskurve (ROC), zur Bewertung der Leistung der PCA-LDA-Klassifikatoren zwischen gesunder Mundschleimhaut vs. OSCC-Gewebe (schwarze Kurve)

4.5. Weiterführende Forschungsfragen (4):

4.5.1. Einfluss verschiedener Lagermedien auf die Raman-spektroskopischen Untersuchungen kleinster Gewebeproben

Gewebeproben, die im Rahmen einer Exzisionsbiopsie gewonnen werden und zur histopathologischen Aufbereitung vorgesehen sind, werden in der Regel in Formalin fixiert. Um den Effekt dieses Lagerungsmediums auf die Akquise adäquater Raman-Spektren von biologischen Geweben zu untersuchen, wird zunächst das Raman-Spektrum reinen Formalins mit dem in Formalin gelagerter *ex vivo* Gewebeproben sowie mit dem in 0,9 %iger NaCl-Lösung gelagerten Gewebeproben verglichen. Abbildung 17 zeigt den Effekt des Lagermediums Formalin auf die Akquise von Raman-Spektren oraler Gewebeproben.

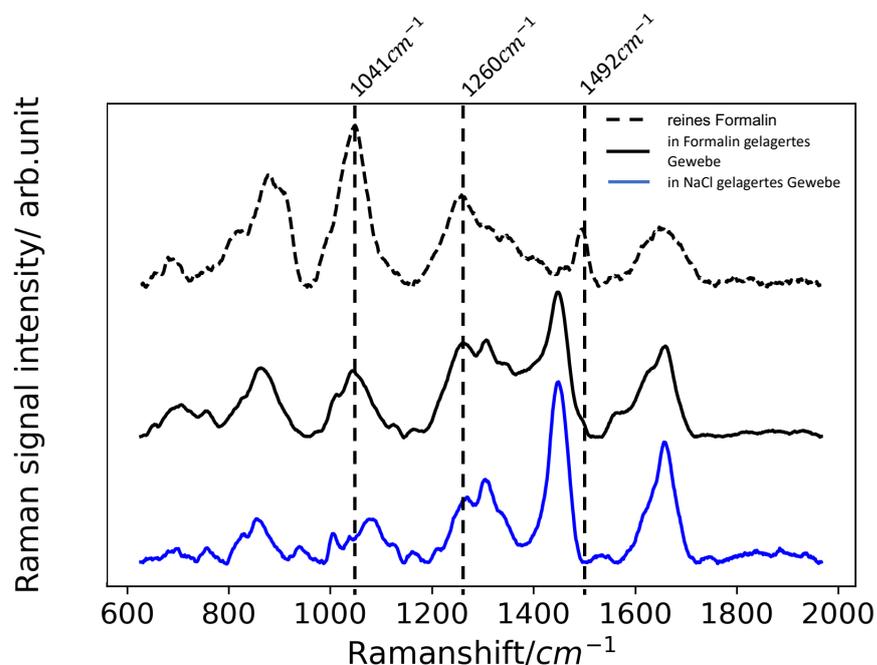


Abbildung 17: Der Effekt Formalins auf das Raman-Spektrum mittels synchronisierter Untersuchungsansätze: reines Formalin (schwarze, gestrichelte Linie), in Formalin gelagertes orales Gewebe (schwarze, durchgezogene Linie) und in 0,9 %iger NaCl-Lösung gelagertes oral

Wie in Abbildung 17 dargestellt, weist das Raman-Spektrum der in Formalin gelagerten Gewebeprobe Formalin-typische Spitzen auf, während diese im Raman-Spektrum der in 0,9 %iger NaCl-Lösung gelagerten Gewebeprobe fehlen. Deutlich sichtbar wird dieser Effekt in den Regionen der Spektralverschiebung um 1041cm^{-1} , 1260cm^{-1} und 1492cm^{-1} . Die für Formalin charakteristischen spektralen Merkmale lassen sich in Form von charakteristischen Spitzen im Raman-Spektrum reinen Formalins, wie auch der in Formalin gelagertem Gewebe wiederfinden.

Um Auswirkungen der im klinischen Alltag routinemäßigen Formalin-Fixierung auf die Raman-Messungen und Analyse kleinster humaner Gewebeproben zu erfassen, wird zunächst das Raman-Spektrum reinen Formalins erstellt, dann mit bereits in 0,9 %iger NaCl-Lösung gemessenen, sekundär in Formalin fixierten Gewebeproben verglichen. Hierzu wird das Raman-Spektrum reinen Formalins, den neu gewonnenen gemittelten Raman-Spektren gesunder Mundschleimhaut sowie der OSCC-Gewebe gegenübergestellt.

Die Gesamtanzahl an Gewebeproben verteilt sich dabei wie folgt auf OSCC-Gewebeproben und Gewebeproben physiologischer Mundschleimhaut (s. Tabelle 3): aus 13 OSCC-Gewebeproben werden anhand von 28 Messpunkten insgesamt 2.800 Einzelspektren akquiriert und aus diesen sodann 56 gemittelte Raman-Spektren extrahiert. Ebenso werden von 10 Gewebeproben physiologischer Mundschleimhaut mittels 18 Messpunkten 1.800 Einzelspektren akquiriert und 36 gemittelte Raman-Spektren extrahiert.

Tabelle 3: Anzahl und Verteilung der Patient:innen, Gewebeproben, gesammelten mittleren Spektren, sowie der Messpunkte für die Analyse des Effekts der Formalin-Fixierung kleinster, oraler Gewebeproben

	OSCC	gesunde Mundschleimhaut
Gesamtanzahl an Gewebeproben	23	
Gesamtanzahl an Patient:innen	14	
Gewebeproben	13	10
Messpunkte	28	18
gesammelte Einzelspektren	2.800	1.800
gesammelte mittlere Spektren	56	36

Nachfolgend konnte unter der erneuten Anwendung des SERDS-Verfahrens aus den gewonnenen Raman-Spektren jeweils ein gemitteltes Raman-Spektrum für OSCC-Gewebe, für physiologische Mundschleimhaut sowie für reines Formalin rekonstruiert und unter Zuordnung der spektralen Raman-Spitzen zu ihren bekannten molekularen Ursprüngen einander

gegenübergestellt werden (s. Abbildung 18). Auch hier ordnen die vertikalen Beschriftungen dabei den spektralen Raman-Spitzen ihren bekannten molekularen Ursprüngen zu.

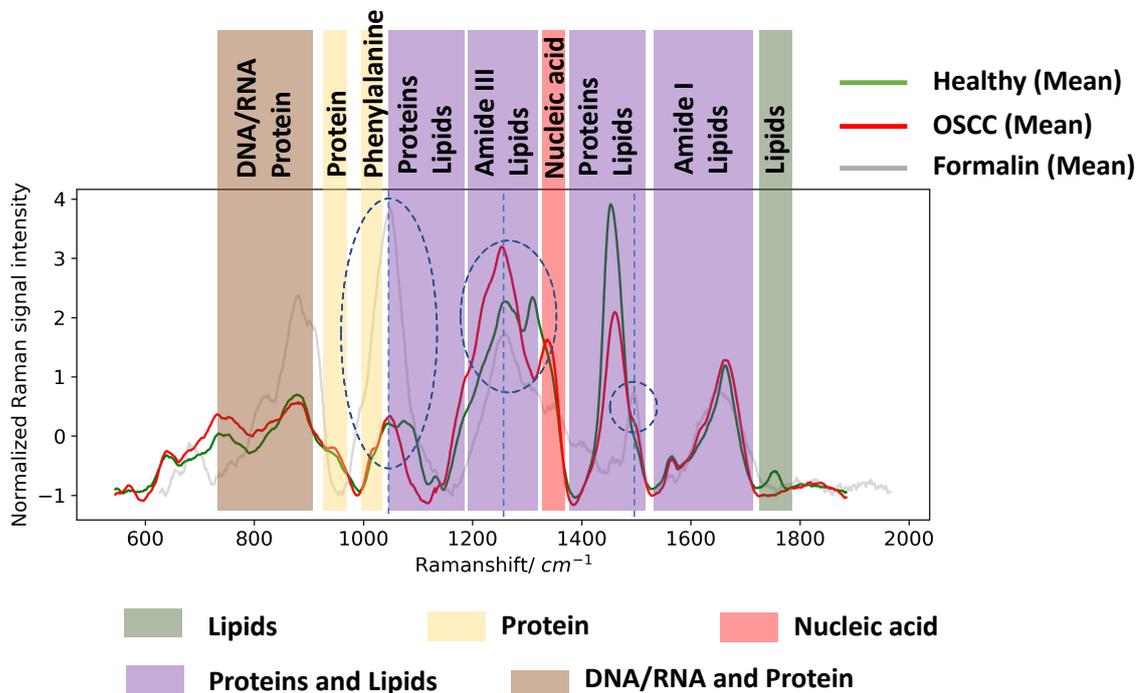


Abbildung 18: Rekonstruierte mittlere Raman-Spektren von in Formalin fixierter physiologischer Mundschleimhaut (grüne Linie) und in Formalin fixiertem OSCC-Gewebe (rote Linie) mit Positionszuordnung zu ihrem jeweiligen molekularen Ursprung. Die graue Linie entspricht dem Raman-Spektrum reinen Formalins

Als grundsätzliche Erkenntnis ist dieser Abbildung der Einfluss des Formalins auf die gemittelten Raman-Spektren physiologischer Mundschleimhaut sowie OSCC-Gewebes zu entnehmen. Der deutlichste Effekt wird hier in der Phenylalanin-Spitze sichtbar, welcher durch den CH-Biegemodus in der Ebene verursacht wird. Ist diese für natives frisches (in 0,9 %iger NaCl-Lösung gelagertes) Gewebe um 1004cm^{-1} zu lokalisieren (vgl. Abbildung 11), erfolgt durch die Formalin-Fixierung eine Verschiebung auf ca. 1039cm^{-1} . Als Erklärung hierfür ist die Interferenz mit der bei ca. 1041cm^{-1} prominentesten Raman-Spitze des Formalins als wahrscheinlichste Ursache zu werten. Darüber hinaus lässt sich der Einfluss der Formalin-Fixierung auch im Bereich der CH_2 -Bande um 1448cm^{-1} feststellen. Während diese Raman-Spitze sich in den in 0,9 %iger NaCl-Lösung gelagerten Geweben als scharf und gestreckt darstellt (vgl. Abbildung 11), ist nach Lagerung in Formalin eine deutliche Verbreiterung festzustellen. Dieser Effekt kommt in Abbildung 18 zur Darstellung, indem sich diese verbreiterten Spitzen und die charakteristische Formalin-Spitze um

1448 cm^{-1} teilweise überlagern. In dieser Region lässt sich darüber hinaus ein s.g. „Knie“ in gemittelten Raman-Spektren der in Formalin fixierten oralen Gewebe lokalisieren.

4.5.2. Differenzierbarkeit kleinster humaner in Formaldehyd gelagerten Gewebeproben von physiologischer Mundschleimhaut und OSCC-Gewebe

Die Abklärung des Einflusses der Formalin-Fixierung auf die Analyse und Differenzierbarkeit kleinster humaner Gewebeproben von physiologischer Mundschleimhaut und OSCC-Gewebe wird nach folgenden Kriterien für die Probenauswahl durchgeführt: jeder Gewebeprobe gesunder Mundschleimhaut ist eine korrespondierende Probe aus OSCC-Gewebe desselben/derselben Patient:in zuzuordnen. Für beide dieser Gewebeproben ist jeweils eine Aufbereitung in 0,9 %iger NaCl-Lösung als auch Formalin erforderlich. Unter diesen Vorgaben werden 18 Gewebeproben von neun Patient:innen analysiert (physiologische Mundschleimhaut = 9; OSCC-Gewebe = 9). Aus diesen werden von in 0,9 %iger NaCl-Lösung gelagerten Gewebeproben physiologischer Mundschleimhaut bzw. aus OSCC-Gewebe unter Einbeziehung von 43 bzw. 41 Messpunkten jeweils 4.300 bzw. 4.100 Einzelspektren generiert und wiederum messpunktbezogenen 86 bzw. 82 gemittelte Raman-Spektren extrahiert sowie ausgewertet. Entsprechend werden für Formalin fixierte Gewebeproben unter Einbeziehung von 19 bzw. 22 Messpunkten insgesamt 1.900 bzw. 2.200 Einzelspektren akquiriert, woraus wiederum 38 bzw. 44 gemittelte Raman-Spektren extrahiert und in die Auswertung miteinbezogen werden (s. Tabelle 4 und 5).

Tabelle 4: Anzahl und Verteilung der Patient:innen, Gewebeprobe, gesammelten Roh- und mittleren Spektren sowie der Messpunkte für die Analyse der Differenzierbarkeit zwischen gesunder Mundschleimhaut und OSCC-Gewebe gelagert in 0,9 %iger NaCl-Lösung

	OSCC	gesunde Mundschleimhaut
Gesamtanzahl an Gewebeprobe	18	
Gesamtanzahl an Patient:innen	9	
Gewebeprobe	9	9
Messpunkte	41	43
gesammelte Einzelspektren	4.100	4.300
gesammelte mittlere Spektren	82	86

Tabelle 5: Anzahl und Verteilung der Patient:innen, der Gewebeprobe, der gesammelten Roh- und mittleren Spektren sowie der Messpunkte bezogen auf die Analyse der Differenzierbarkeit zwischen gesunder Mundschleimhaut und OSCC-Gewebe gelagert in Formalin

	OSCC	gesunde Mundschleimhaut
Gesamtanzahl an Gewebeprobe	18	
Gesamtanzahl an Patient:innen	9	
Gewebeprobe	9	9
Messpunkte	22	19
gesammelte Einzelspektren	2.200	1.900
gesammelte mittlere Spektren	44	38

Zur Prüfung der Klassifizierbarkeit physiologischen Gewebes und OSCC-Gewebes unter Einfluss der verschiedenen Lagermedien wird erneut die linearere Diskriminanzanalyse (LDA) angewandt. Hierfür werden zwei LDA-Klassifikationsmodelle erstellt, um zwischen den Datensätzen von

physiologischer Mundschleimhaut und OSCC-Gewebe, welche jeweils in 0,9 %iger NaCl-Lösung bzw. in Formalin gelagert werden, zu unterscheiden. Abbildung 19 und 20 zeigen die Leistung bzw. Performance des Klassifikators in Form von ROC-Kurven (Receiver-Operating-Curve = dt. Grenzwertoptimierungskurve) in Bezug auf die eingesetzten Lagermedien. Unter Verwendung von 0,9 %iger NaCl-Lösung zur Lagerung der Gewebeproben physiologischer Mundschleimhaut und OSCC-Geweben (s. Abbildung 19) ergibt die Validierung der Unterscheidbarkeit für diese eine fünffache Kreuzvalidierungsgenauigkeit von 95,2 % mit einer Sensitivität von 97,6 % und einer Spezifität von 93,0 %. Die Fläche unter der ROC-Kurve (Area Under the Curve = AUC) als Performance-Indikator wird mit 0,972 als höchst zuverlässig ermittelt. Nur 4 von 84 Messpunkte werden unter den beschriebenen Bedingungen falsch klassifiziert, entsprechend einem Klassifikationsfehler von nur 4,8 %.

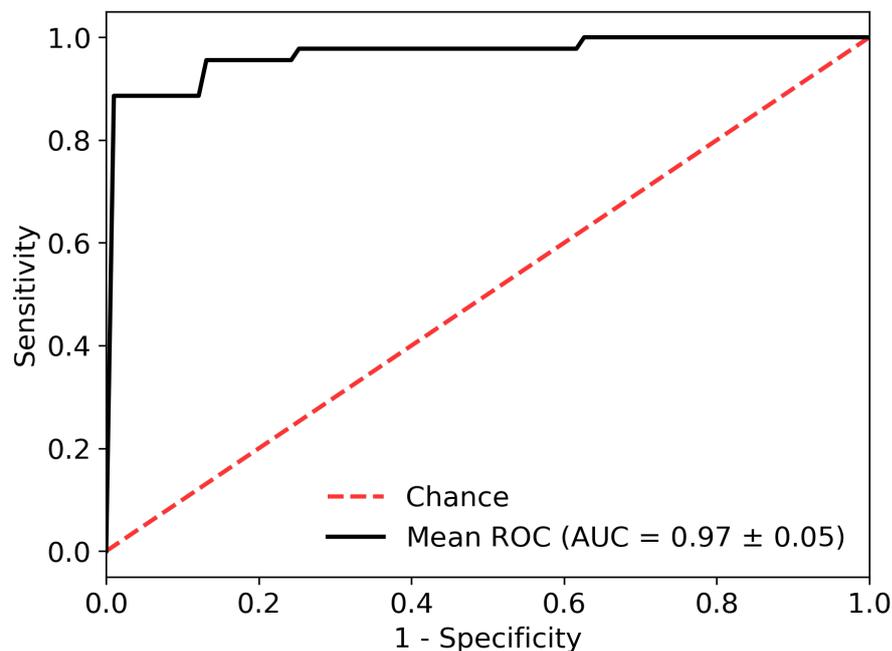


Abbildung 19: Grenzwertoptimierungskurve (ROC), zur Bewertung der Leistung der PCA-LDA-Klassifikatoren zwischen in 0,9 %iger NaCl-Lösung gelagerter gesunder Mundschleimhaut vs. OSCC-Gewebe (schwarze Kurve)

Wird Formalin zur Lagerung physiologischer Mundschleimhaut und OSCC-Gewebes genutzt (s. Abbildung 20) ist eine fünffache Kreuzvalidierungsgenauigkeit von 85,4 % mit einer Sensitivität von 90,9 % und einer Spezifität von 78,9 % zu erzielen. Die Fläche unter der ROC-Kurve (Area

Under the Curve = AUC) ergibt mit 0,799 eine Fehlerklassifizierung für 6 von 41 Messpunkten, was einem Klassifikationsfehler von 14,6 % entspricht.

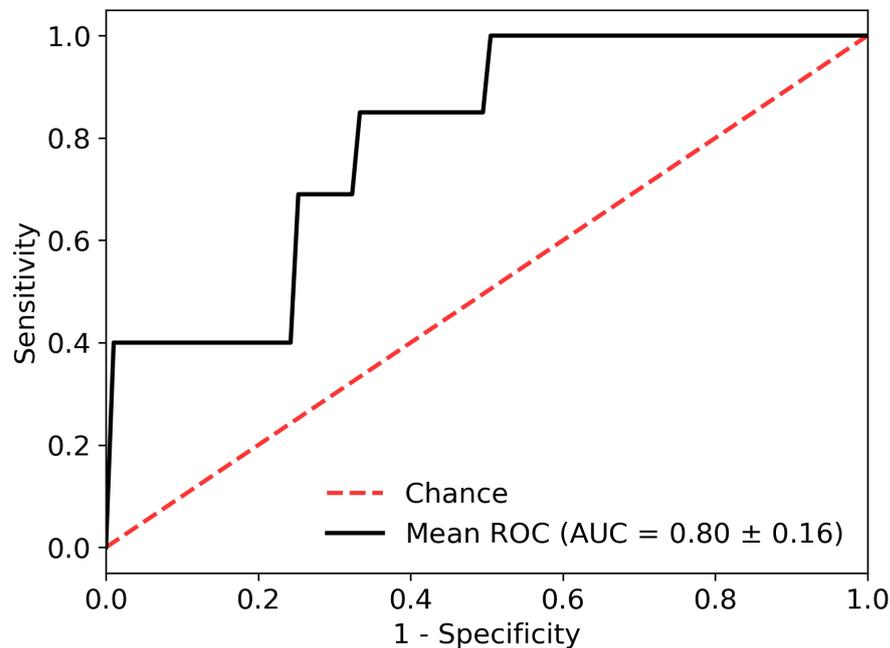


Abbildung 20: Grenzwertoptimierungskurve (ROC), zur Bewertung der Leistung der PCA-LDA-Klassifikatoren zwischen in Formalin gelagerter gesunder Mundschleimhaut vs. OSCC-Gewebe (schwarze Kurve)

4.5.3. Einfluss topographisch-anatomischer Merkmale auf die Raman-spektroskopischen Untersuchungen kleiner Gewebeproben

Als ein weiteres Ziel dieser Arbeit wird der mögliche Einfluss unterschiedlicher Entnahmeorte der Gewebeproben innerhalb der Mundhöhle auf die Analyseergebnisse untersucht. Hierzu werden Gewebeproben einer Patient:innengruppe (n=13) mit vier unterschiedlichen Entnahmegebieten (Alveolarkamm, Mundboden, Zunge, Wange) an jeweils 12 Messpunkten analysiert. Für jedes Entnahmegebiet werden in beschriebener Weise insgesamt 1.200 Einzelspektren akquiriert und als 24 gemittelte Raman-Spektren in die Auswertung miteinbezogen. Tabelle 6 liefert einen detaillierten Überblick über die Verteilung der Gewebeproben, Messpunkte sowie der gesammelten Raman-Spektren.

Tabelle 6: Anzahl und Verteilung der Patient:innen, der Gewebeproben, der gesammelten Roh- und mittleren Spektren sowie der Messpunkte bezogen auf die unterschiedlichen anatomischen Entnahmegebiete

	Alveoarkamm	Mundboden	Zunge	Wange
Gewebeproben	3	3	3	4
Messpunkte	12	12	12	12
gesammelte Einzelspektren	1.200	1.200	1.200	1.200
gesammelte mittlere Spektren	24	24	24	24
Anzahl an Patient:innen	3	3	3	4
Gesamtanzahl aller Patient:innen	13			

Es folgt die Anwendung der Hauptkomponentenanalyse (PCA = Principal Component Analysis), um ggf. bestehende Unterschiede zwischen kleinsten OSCC-Gewebeproben unterschiedlichen anatomischen Ursprungs zu identifizieren. Die Ergebnisse der Untersuchungen dieser Gewebeproben sind in Form eines 2D-Diagramms (s. Abbildung 21) nach den ersten zwei Hauptkomponenten (PC1, PC2) angeordnet. So zeigt das PCA-Clustering bei einer räumlich großen Überlappung keine signifikante Diskriminierung in Bezug auf den topographischen Ursprung. In diesem Datensatz enthält die erste Hauptkomponente 33,50 % der spektralen Variation der vier anatomischen Regionen, die zweite Hauptkomponente 18,56 %.

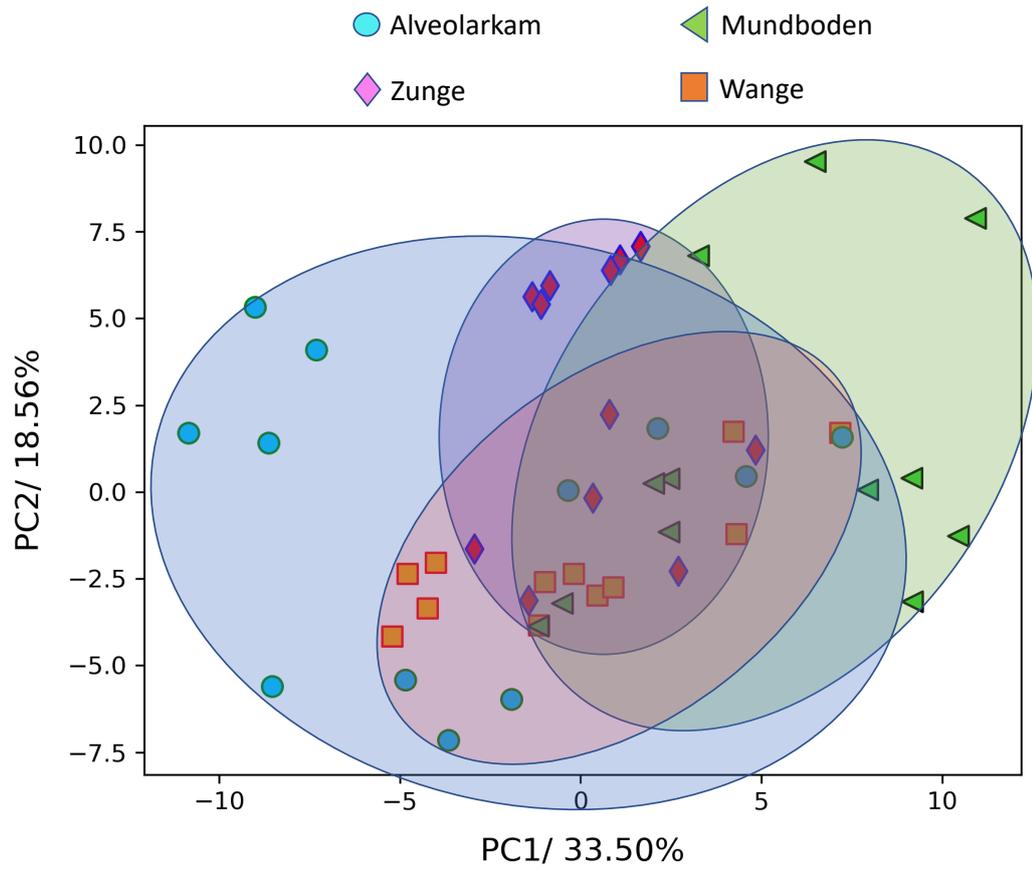


Abbildung 21: Ergebnisse der Hauptkomponentenanalyse (PCA) von Raman-Spektren von OSCC-Geweben unterschiedlichen anatomischen Ursprungs (violette Rauten = Zunge, grüne Dreiecke = Mundboden, orangene Quadrate = Wange, hellblaue Kreise = Alveolarkamm)

5. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Erprobung eines eigenständig entwickelten Raman-Systems auf Basis der SERDS-Technik („shifted-excitation Raman difference spectroscopy“) als nicht-invasives Echtzeit-Diagnoseverfahren für kleinste orale Gewebeproben im Rahmen einer zukünftigen *Point-of-Care*-Diagnostik. Bisher wird diese Methode vor allem in der Industrietechnik als hochsensitives und präzises Materialanalyseverfahren eingesetzt, z.B. in der Pharmaindustrie zur Quantifizierung von Medikamentenbestandteilen (Jesus et al., 2020). Zunehmend werden aber auch medizinische Anwendungsmöglichkeiten untersucht. Diese finden bereits Anwendung in Verfahren wie der Diagnostik des Gebärmutterhalses, der Haut, des Gastrointestinaltraktes, der Speiseröhre und auch der Mundhöhle (Pence and Mahadevan-Jansen, 2016).

Bereits in früheren Publikationen unserer Arbeitsgruppe konnte die Eignung der SERDS-Technik zur Differenzierung von physiologischer Mundschleimhaut und OSCC-Gewebe an intraoperativ entnommenen großen Gesamtresektaten des Tumors gezeigt werden (Gebrekidan, 2014, Knipfer et al., 2015). Die daraus gewonnenen Erkenntnisse wurden für die vorliegende Arbeit genutzt und weiterentwickelt, um die Technik auch für kleinste Gewebeproben im Sinne von Probeexzisionen zu etablieren und dies unter Einbezug etwaiger Störfaktoren, der Topografie und Postprozessierung von Biopsien. Da vergleichbare Anwendungen der SERDS-Technik an biologischem Gewebe kleinster Proben bisher fehlen und zukünftige Untersuchungen der Arbeitsgruppe sich auf die Differenzierung kleinster *ex vivo* Gewebeproben von Vorläuferläsionen des OSCC im Rahmen klinischer Biopsien konzentrieren sollen, dient diese Arbeit als methodischer Brückenschlag zur Etablierung des Verfahrens für den klinischen Alltag.

Vor dem Hintergrund fehlender vergleichbarer Arbeiten und den Erkenntnissen vorangegangener Veröffentlichungen der Arbeitsgruppe wurden die in Kapitel 4.1 erläuterten Spezifikationen des instrumentellen Setups getroffen und somit eine Standardisierung des Messvorganges erreicht.

Der Abstand zwischen der Messsonde und den Gewebeproben kann dabei nicht einheitlich festgelegt werden. Vielmehr ist aufgrund der unregelmäßigen

Beschaffenheit der Gewebeproben aktuell eine noch individuelle Fokussierung im Bereich der Brennweite (7-10 mm) der achromatischen Linse erforderlich. Die Integrationszeit wurde auf eine Sekunde festgelegt, um exogene Alterationen der kleinsten Gewebeproben durch thermische Denaturierung auszuschließen und die Anwendbarkeit im klinischen Umfeld zu ermöglichen. In einer bereits 2015 publizierten Studie der eigenen Arbeitsgruppe findet sich eine Integrationszeit von drei Sekunden, wobei hier zusammenhängende OSCC-Tumormassen (engl. bulk tumor) untersucht werden (Knipfer et al., 2015). Sato et al. verwendeten für ihre Raman-spektroskopischen Untersuchungen an Proben gesicherter Colonkarzinome eine Integrationszeit von fünf Sekunden. Jedoch werden hier neben einer höheren Anregungswellenlänge von 1064 nm auch größere, in Polyninylidenchlorid-Folie eingebettete Gewebeproben (1 cm Blockproben) verwendet ohne deren Einfluss auf die Messergebnisse zu kommentieren (Sato et al., 2019).

Die Auswahl der für die SERDS-Technik erforderlichen Anregungswellenlängen in der vorliegenden Arbeit von 785 und 784 nm beruhen auf den experimentellen Untersuchungen von Gebrekidan (Gebrekidan, 2014) sowie auf den vorangegangenen Veröffentlichungen der Arbeitsgruppe (Gebrekidan et al., 2018, Gebrekidan et al., 2016, Knipfer et al., 2015). In dem Zuge der aktuellen Arbeit wurden diese Ergebnisse nochmals verifiziert und finden in dieser Arbeit Anwendung.

Bereits im Jahr 2004 beschreibt Pålsson die Notwendigkeit einer vergleichsweise hohen Laserleistung von ca. 100 – 300 mW für die Generierung auswertbarer Raman-Signale, und die damit verbundene Gefahr zellulärer Alterationen (Pålsson, 2003). Die gewählte Laserleistung von 115 mW für die eigenen Untersuchungen dieser Arbeit in Verbindung mit den oben genannten Messparametern bewegen sich damit im unteren Bereich des von Pålsson beschriebenen Bereiches und lassen wie in den vorangegangenen Arbeiten der Arbeitsgruppe auch an kleinsten Gewebeproben keinerlei thermische Alterationen nachweisen (Gebrekidan et al., 2018, Gebrekidan et al., 2016, Knipfer et al., 2015).

Bei der in dieser Arbeit angewandten SERDS-Technik werden die Gewebeproben nacheinander mit zwei Laserstrahlen angeregt. Dabei

unterschieden sich diese in ihrer Wellenlänge um 1 nm. Die gemittelten Spektren werden anschließend unter Bildung eines Differenzspektrums voneinander subtrahiert, welches sich nahezu frei von Fluoreszenzstörungen darstellt. Dies ist möglich, da bei minimaler Änderung der Anregungsphotonenenergie die Fluoreszenzemission unverändert bleibt, während sich das Raman-Spektrum entsprechend der Änderung der Anregungsphotonenenergie verschiebt (Kasha's rule) (Gebrekidan et al., 2016). Auch wenn sich die SERDS-Technik als zeitaufwendiger erweist als vergleichbare Techniken, bietet sie den Vorteil der Eliminierung von Fluoreszenzstörungen vor allem durch einen physikalischen Ansatz ohne negative Beeinflussung der grundlegenden Eigenschaften des Raman Spektrums (Gebrekidan et al., 2016). Durch Anwendung der SERDS-Technik kann in der vorliegenden Arbeit eine Spezifität von 96,9 % und eine Sensitivität von 97,5 % für Untersuchungen kleinster Gewebeprobe der Mundschleimhaut erzielt werden. Die SERDS-Technik kam bereits wiederholt in wissenschaftlichen Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe zum Einsatz (Gebrekidan, 2014, Gebrekidan et al., 2018, Knipfer et al., 2015) und findet sich prinzipiell-methodisch ausführlich von Gebrekidan et al. beschrieben (Gebrekidan et al., 2016). Doch stellt die Reduzierung von Fluoreszenzinterferenzen, die bei der Anregung biologischer Gewebe mit Nahinfrarotlicht naturgemäß auftreten, eine kritische Grenze für die Optimierung der Signalqualität, der Spektrenverarbeitung und der statistischen Analyse dar. Diesbezüglich bestehen grundsätzlich neben der SERDS-Technik weitere Ansätze zur Reduzierung möglicher Fluoreszenzstörungen. So ist mit der Time-Gated Raman-Spektroskopie ein weiterer physikalischer Ansatz gegeben, welcher durch zeitlich präzise Synchronisierung gepulster Laseranregung mit einem hochsensitiven wie auch hochauflösenden Detektor das Raman-Signal während der kurzen Laserpulse erfassbar macht und dabei Fluoreszenzemissionen mit längerer Verzögerung während der Leerlaufzeit des Detektors unterdrückt. Zwar liefert diese Methode eine wirksame Unterdrückung unerwünschter Fluoreszenz, doch ist der Aufbau sehr komplex und kostspielig (Kögler and Heilala, 2020), was einer potentiellen Anwendung im klinischen Alltag noch entgegen steht. Des Weiteren besteht neben diesen physikalischen Ansätzen auch die Möglichkeit, Fluoreszenzstörungen mittels mathematischer

Ansätze zu reduzieren. So findet u.a. eine Methode basierend auf Polynombildung (Lieber and Mahadevan-Jansen, 2003) oder einem Ansatz angepasster kleinster Quadrate und Approximation (Baek et al., 2015) Anwendung, um eine Minimierung des Autofluoreszenzhintergrundes zu erreichen. Bei beiden mathematischen Verfahren besteht jedoch die Gefahr, durch Eliminierung der störenden Fluoreszenz auch Raman-Signale zu eliminieren oder negativ zu beeinflussen (Gebrekidan et al., 2016).

Nach derzeitigem Wissensstand ist mit der vorliegenden Arbeit erstmals das SERDS-Verfahren eingesetzt worden, um kleinste *ex vivo* Gewebeproben der Mundschleimhaut zu untersuchen. In ihrer Arbeit aus dem Jahr 2001 untersuchten Venkatakrishna et al. erstmalig *ex vivo* Gewebeproben physiologischer Mundschleimhaut und aus OSCC-Geweben mittels Raman-Spektroskopie, welche in 0,9 %iger NaCl-Lösung gelagert und innerhalb von einer halben Stunde gemessen wurden. Die Gewebeproben wurden dabei im Rahmen von Exzisionsbiopsien sowie intraoperativ durch chirurgische Tumorsektion gewonnen. Wie dort beschrieben ließen sich mittels PCA jeweils unterschiedliche charakteristische Merkmale für beide Gewebeentitäten identifizieren (Venkatakrishna et al., 2001). Malini et al. untersuchten in ihrer Studie aus dem Jahr 2005 die Anwendbarkeit der Raman-Spektroskopie zur Differenzierung nicht nur zwischen normalen und entzündlichen, sondern auch prä-malignen und malignen Zuständen oraler Gewebe. Die dort verwendeten, in 0,9 %iger NaCl-Lösung gelagerten *ex vivo* Gewebeproben wurden ebenfalls im Rahmen von Exzisionsbiopsien sowie intraoperativ durch chirurgische Resektion gewonnen. Dabei waren die Autor:innen ebenfalls in der Lage, die Anwendung der Raman-Spektroskopie zur objektiven Unterscheidung von Geweben und deren korrekte Klassifizierung anhand von normalem und diversen pathologischen oralen Geweben zu demonstrieren. (Malini et al., 2006). In ihrer Studie aus dem Jahr 2008 untersuchten Hu et al. insgesamt 66 *ex vivo* Gewebeproben physiologischer Mundschleimhaut sowie OSCC-Geweben mittels konfokaler Raman-Spektroskopie und identifizierten auf diese Weise die wichtigsten charakteristischen Raman-Banden und ihre Zuordnungen zu ihren molekularen Ursprüngen. Mittels PCA konnten sie eine statistisch signifikante Unterscheidung zwischen gesunder Mundschleimhaut und oralem

OSCC-Gewebe vornehmen. Eine statistisch quantifizierbare Zuverlässigkeit dieser Methode wird von den Autor:innen hingegen nicht näher beschrieben (Hu et al., 2008). In ihrer im Jahr 2019 publizierten Studie untersuchten Jeng et al. Raman-spektroskopisch insgesamt 80 Gewebeproben von OSCC-Gewebe als auch physiologischer Mundschleimhaut unterschiedlicher anatomischer Regionen (Zunge (n=24), Wangeninnenseite (n=33), Gingiva (n=23), welche nicht kleiner als 3x3mm waren. Die intraoperativ entnommenen Gewebeproben wurden dabei bis zur Raman-spektroskopischen Analyse bei -80°C kältegelagert. Unter Anwendung der multivariaten Datenanalyse mittels PCA und LDA ließen sich die Gewebeentitäten unabhängig ihrer Entnahmeorte mit einer Spezifität von 86,11 % und einer Sensitivität von 77,27 % voneinander differenzieren. Darüber hinaus untersuchten die Autoren ebenfalls den Einfluss unterschiedlicher Entnahmegebiete (Zunge, Wangeninnenseite und Gingiva) auf die Differenzierung von Gewebeproben des OSCC und gesunder Mundschleimhaut. Obwohl für alle Entnahmegebiete eine hohe Klassifizierungsrate erzielt werden konnte, ergab die Analyse der Gewebeproben der Gingiva mit einer Spezifität von 91 % und einer Sensitivität von 92 % die höchste Klassifizierungsgenauigkeit (Jeng et al., 2019). Eine mögliche Differenzierung aller Gewebeproben, welche auf Merkmalen unterschiedlicher Entnahmegebiete der Mundhöhle basiert, wie es in der vorliegenden Arbeit vollzogen wurde, war jedoch nicht Teil der Studie von Jeng et al.

Alle Raman-spektroskopischen Messungen der vorliegenden Arbeit basieren auf Untersuchungen, die im Forschungslabor der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf durchgeführt wurden. Zur Abdunkelung wurde eine eigens angefertigte Messkammer verwendet, um stark störende Streustrahlung durch Raum- oder Sonnenlicht zu reduzieren. Ein vollständiger Ausschluss von Tageslicht war jedoch nicht das Ziel, da eine mögliche Anwendbarkeit unter möglichst realen Bedingungen, wie sie z.B. in einem Operationssaal oder einem ambulanten Behandlungszimmer herrschen, geprüft werden sollte. Dennoch konnten unter diesen Bedingungen hinsichtlich Spezifität und Sensitivität hervorragende Ergebnisse erreicht werden. Dies ist unseres Erachtens auf den Einsatz der innovativen SERDS-

Technik für biologisches Gewebe zurückzuführen, die es erlaubt, Störungen durch Umgebungslicht zu eliminieren, so dass auch eine *Point-of-Care*-Anwendung im ambulanten oder intraoperativen Setting in Zukunft denkbar ist (Maiwald et al., 2015).

Bei näherer Betrachtung der Raman-Spektren gesunder und pathologischer Gewebe (s. Abbildung 12) wird deutlich, dass die Unterschiede im gesamten Spektralbereich erkennbar sind. Am deutlichsten werden Sie jedoch in der Fingerprint-Region ($1200\text{-}1800\text{cm}^{-1}$). Vergleicht man die Abbildung mit Tabelle 2, welche eine Zuordnung der spektralen Raman-Merkmale zu ihrem molekularen Ursprung erlaubt, so wird deutlich, dass die meisten spektralen Merkmale maligner Gewebe der Mundhöhle Protein- und Nukleinsäuremolekülen entsprechen. Besonders die spektroskopischen Merkmale um 1750cm^{-1} , 1660cm^{-1} , 1451cm^{-1} und 1003cm^{-1} zeigen eine starke Ausprägung und können in Übereinstimmung mit der verfügbaren Literatur zur Differenzierung von Entitätsunterschieden genutzt werden (Bergholt et al., 2012, Carvalho et al., 2015, Krishna et al., 2004, Malini et al., 2006). Dies zeigt sich in Form einer Zunahme des pathologischen Schweregrades und gleichzeitiger Zunahme der proteinbezogenen Merkmale und des DNA-Gehaltes sowie einer Senkung des Lipidgehalts (Hu et al., 2008, Malini et al., 2006, Venkatakrishna et al., 2001). Dieser Wechsel von Lipid- zu Protein- und DNA-Gehalt in Übereinstimmung mit histopathologischen Veränderungen ist auf Veränderungen in der Gewebestruktur bzw. -morphologie, erhöhter Angiogenese und zellulärer Proliferation, gesteigerte Kern-Plasmarelation und damit erhöhter DNA-Gehalt, bei prämaligen und malignen Läsionen zurückzuführen (Sahu et al., 2016).

Mit Hinblick auf eine universelle Einsetzbarkeit im Alltag wurden in der vorliegenden Arbeit für die Untersuchungen zur Entitätsdifferenzierung alle nativen Gewebeproben in 0,9 %iger NaCl-Lösung bei Raumtemperatur aufbewahrt und binnen weniger Stunden Raman-spektroskopisch gemessen. Auf eine initiale Fixation mittels Formalin wurde bewusst verzichtet, um Einschränkungen der spektroskopischen Ergebnisqualität wie auch der optisch-histologischen Diagnostik zu vermeiden (Huang et al., 2003). Nachfolgend

wurden nach Möglichkeit die Gewebeproben in Formalin asserviert und es erfolgte zu einem späteren Zeitpunkt eine erneute Raman-spektroskopische Untersuchung dieser Gewebeproben. Hierbei wurden die deutlich ausgeprägten charakteristischen Unterschiede der Spektren von nativ gemessenen und in Formalin asservierten Gewebeproben erkennbar. So kommt es zu einer Verschiebung der Phenylalanin-Spitze sowie einer charakteristischen Veränderung der CH_2 -Bande der in Formalin gelagerten Asservate, welche sich als typische Merkmale des reinen Formalins auch im fixierten Gewebe wiederfinden. Trotz dieser Störung durch den Formalingehalt der Gewebeproben konnte mit der vorliegenden Untersuchung eine relativ hohe Zuverlässigkeit der Differenzierung von OSCC-Geweben und gesunder Mundschleimhaut mit einer Sensitivität von 90,9 % und einer Spezifität von 78,9 % erzielt werden. Trotz dieser Erkenntnisse sollte besonders vor dem Hintergrund eines hochdifferenzierten Vergleichs prämaligener Stadien auf eine Formalinfixierung verzichtet werden. Gebrekidan et al. stellten ebenfalls in ihrer Publikation aus dem Jahr 2018 den Einfluss der Formalin-Fixierung auf die Qualität der Analyse von Tumorbrustgewebe mittels Raman-Spektroskopie fest. Auch weisen die Autor:innen für in Formalin fixiertes Brustgewebe auf eine diskrete Verschiebung der charakteristischen Raman-Spitze des Phenylalanins hin und führen diesen Effekt auf die minimale Interferenz mit der prominentesten Raman-Spitze reinen Formalins zurück, welche sich im gleichen Spektralbereich ausprägt. Trotz Formalin-Fixierung der Gewebeproben ermittelten die Autor:innen für diese Methode eine hohe Spezifität und Sensitivität von 90,40 % bzw. 99,15 % (Gebrekidan et al., 2018). Diese Beobachtungen decken sich mit den Erkenntnissen der vorliegenden Arbeit, welche ebenfalls diese Verschiebung der charakteristischen Phenylalanin-Spitze hin in den Bereich der für Formalin charakteristischen Raman-Spitze bei 1041cm^{-1} bestätigen lassen, jedoch mit reduzierter Spezifität von 78,9 % und Sensitivität von 90,9 %. An anderer Stelle wurde der Einfluss von Formalin auf die Raman-Spektroskopie von Huang et al. in einer Studie an insgesamt zehn Proben menschlichen Lungengewebes beschrieben. Die Autor:innen beobachteten eine progressive Abnahme der allgemeinen Intensität der Raman-Peaks in formalinfixiertem Gewebe und schlossen daraus sogar auf die Untauglichkeit einer solchen Fixierung für eine valide Diagnostik (Huang et al.,

2003). Diese Schlussfolgerung findet sich jedoch durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sowie durch Untersuchungen von Gebrekidan et al. (Gebrekidan et al., 2018) zumindest teilweise entkräftet. So ist es nach heutigem Wissensstand mit technischem wie auch mathematischen Methoden möglich, die spektrale Interferenz der Formalin-Fixierung weitestgehend aus den Raman-Spektren der Gewebe zu eliminieren (Baek et al., 2015, Kögler and Heilala, 2020, Lieber and Mahadevan-Jansen, 2003), was sich mit der vorliegenden Arbeit statistisch bestätigen lässt. Dennoch muss zur Kenntnis genommen werden, dass die Fixierung der Gewebeproben in Formalin mit einer Erniedrigung der Spektrenqualität sowie der statistischen Aussagekraft verbunden ist (vgl. Kapitel 4.5.2). Bei ausgeprägten Tumoren mag die Formalinfixierung nur einen dezenten Einfluss auf die Verwendbarkeit der Daten zur Differenzierung zwischen tumorösem und benignen Gewebe bedingen. Bei Vorstadien und Frühstadien des OSCC kann jedoch gerade diese verringerte Differenzierbarkeit ein ausschlaggebender Faktor sein.

Wie bereits in Kapitel 4.3.4 beschrieben, entstammen die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Gewebeproben unterschiedlichen anatomischen Regionen innerhalb der menschlichen Mundhöhle. Diese weisen naturgemäß gewebetypische Eigenschaften auf, wie zum Beispiel variable Schichtdicken der einzelnen Gewebekompartimente, unterschiedliche Strukturen des epithelialen Aufbaus, Umfang der Sekret erzeugenden Gewebeanteile, Ausprägung der Muskulatur und Vaskularisation sowie Bestand an Knochenanteilen (Berkovitz et al., 2017). Die Frage, welchen Einfluss diese Variabilität im Aufbau oraler Gewebe unterschiedlichen anatomischen Ursprungs auf die Raman-spektroskopische Analyse hat, ist von hoher Relevanz, da die Raman-Spektroskopie höchst sensibel auf Veränderungen der Morphologie und Biochemie reagiert. Bergholt et al. beschreiben in ihrer 2012 veröffentlichten Publikation detailliert den Einfluss der histologischen Merkmale verschiedener Regionen der Mundhöhle (harter/weicher Gaumen, Wangeninnenseite, Lippeninnenseite, *Attached* Gingiva, Mundboden, Zungenunterseite, sowie Zungenrücken) auf *in vivo* Raman-Messungen anhand charakteristischer Spektren. Den Autor:innen war es möglich anhand der gewonnenen Raman-Spektren eine Unterteilung in drei Hauptgruppen vorzunehmen: [1] Wange,

innere Lippe, weicher Gaumen; [2] dorsale/ventrale Zunge, Mundboden; [3] Gingiva, harter Gaumen. Sie schlussfolgern, dass die interanatomische Variabilität signifikant ist und bei der Interpretation und Erstellung von diagnostischen Entscheidungsalgorithmen für die Diagnose und Charakterisierung oraler Gewebe berücksichtigt werden sollte (Bergholt et al., 2012). Auch in der vorliegenden Arbeit ist die Frage nach dem Einfluss interanatomischer Variabilität oraler Gewebe unterschiedlichen anatomischen Ursprungs Bestandteil der Untersuchungen. Die hierzu erstellten Raman-Spektren gesicherten OSCC-Gewebes unterschiedlichen anatomischen Ursprungs (Wange, Alveolarkamm, Zunge, Mundboden) und nachfolgend mittels PCA auf eine mögliche Übereinstimmung überprüften Ergebnisse lassen jedoch keine sichere Unterscheidung mittels PCA-Clustering zu (s. Abbildung 21). Die Ursache hierfür könnte mit der relativ geringen Probenanzahl pro anatomischen Ursprung begründet werden (Wange = 4, Lippe = 3, Zunge = 3, Mundboden = 3). Jedoch wurden von jeder Gewebeprobe Raman-Spektren mehrerer Messpunkte akquiriert und insgesamt 4800 Raman-Einzelspektren generiert, welche eine ausreichende Anzahl für eine Auswertung mittels PCA zulassen. Näherliegend erscheint hierbei die Begründung durch eine Entdifferenzierung des Gewebes, welche mit fortschreitendem Tumorstadium einhergeht. Durch diese verlieren die oralen Gewebe ihre interanatomische Variabilität, so dass in den Raman-Spektren dieser Gewebe lediglich der charakteristische Fingerabdruck der entdifferenzierten OSCC-Gewebe übrigbleibt und deren Unterscheidung anhand des anatomischen Ursprungs unmöglich wird.

Durch die vorliegende Arbeit konnte somit gezeigt werden, dass das SERDS-System ein geeignetes Diagnosehilfsmittel ist, um auch kleinste Gewebeproben des OSCC von gesunder Mundschleimhaut zu differenzieren. Geeignete Parameter wurden herausgearbeitet, störende Interferenzen eliminiert sowie die Auswirkungen verschiedener Lagermedien und anatomischer Entnahmegebiete der oralen Gewebeproben untersucht.

6. Zusammenfassung

Ziel der Arbeit ist die Erprobung eines eigens entwickelten Raman-Spektroskopie-Systems basierend auf der SERDS-Technik (*shifted-excitation Raman difference spectroscopy*) zur Analyse kleinster *ex vivo* Gewebeproben physiologischer Mundschleimhaut und des oralen Plattenepithelkarzinoms (engl.: *oral squamous cell carcinoma* = OSCC), um die Einsetzbarkeit dieser minimalinvasiven und zeitsparenden Diagnostikmethode auch für diese Art von Gewebeproben zu prüfen. Es wurden 47 Gewebeproben von 29 Patient:innen untersucht. Die Methodik erwies sich als geeignet, um störungsfreie Raman-Spektren zu akquirieren und eine zuverlässige Differenzierung zwischen OSCC-Gewebe und gesunder Mundschleimhaut mit einer Spezifität und Sensitivität von 96,9 % bzw. 97,5 % zu erreichen. Darüber hinaus wurden störende Interferenzen durch iatrogene Verunreinigungen, Unterschreitung der Mindestschichtdicke der Proben und Umgebungseinflüsse identifiziert und beseitigt. Der Effekt der Formalin-Fixierung der Gewebeproben auf die Akquise und Differenzierung von Raman-Spektren wurde ebenfalls untersucht, wobei die Interferenz des Raman-Spektrums von Formalin auf das Raman-Spektrum der Gewebeproben nachgewiesen werden konnte. Dies führte zu einer Abnahme der Sensitivität von 97,6 % auf 90,9 % und der Spezifität von 93 % auf 78,9 %. Ebenfalls wurde der mögliche Einfluss der interanatomischen Variabilität im Aufbau oraler Gewebe auf die Akquirierung von Raman-Spektren von OSCC-Gewebe untersucht, ohne eine signifikante Diskriminierung in Bezug auf den topographischen Ursprung der Gewebeproben zu erzielen.

Es wurden somit Voraussetzungen geschaffen, um eine zukünftige, möglichst fehlerfreie Analyse auch von kleinsten Gewebeproben unterschiedlichster Entitäten, einschließlich Vorläuferläsionen des OSCC, zu gewährleisten. Die bisher bestehende diagnostische Lücke zwischen der subjektiven Beurteilung durch den Arzt und der chirurgischen Probengewinnung mit der histopathologischen Gewebeaufarbeitung kann so durch objektive Parameter auch für diese kleinsten, oralen Gewebeproben perspektivisch geschlossen werden. Insgesamt bietet die Anwendung der Raman-Spektroskopie bei weiterem Entwicklungsbedarf für die *in situ* Anwendung die Möglichkeit, als technisch-diagnostische Methode der Gewebedifferenzierung im *Point-of-Care-Setting* das Spektrum der nicht-invasiven Diagnostik zu erweitern.

6.1. Summary

The aim of the work is to test a custom-developed Raman-spectroscopy system based on the SERDS technique (shifted-excitation Raman difference spectroscopy) for analyzing smallest *ex vivo* tissue samples of physiological oral mucosa and oral squamous cell carcinoma (OSCC) in order to examine the applicability of this minimally invasive and time-saving diagnostic method for this type of tissue sample. 47 tissue samples from 29 patients were examined. The method proved to be suitable for acquiring interference-free Raman spectra and achieving a reliable differentiation between OSCC tissue and healthy oral mucosa with a specificity and sensitivity of 96.9% and 97.5% respectively. In addition, interferences due to iatrogenic contamination, undercutting of the minimum layer thickness of the samples and environmental influences were identified and eliminated. The effect of formalin fixation of the tissue samples on the acquisition and differentiation of Raman spectra was also investigated, whereby the interference of the Raman spectrum of formalin on the Raman spectrum of the tissue samples could be detected. This led to a decrease in sensitivity from 97.6 % to 90.9 % and in specificity from 93 % to 78.9 %. The possible influence of interanatomical variability in the structure of oral tissue on the acquisition of Raman spectra of OSCC tissue was also investigated without achieving significant discrimination with regard to the topographical origin of the tissue samples.

Thus, the preconditions were provided to ensure a future, error-free analysis of even the smallest tissue samples of different entities, including precursor lesions of OSCC. The existing diagnostic gap between the subjective assessment by the doctor and the surgical sample collection with histopathological tissue processing can thus be closed in the future by objective parameters, even for these smallest oral tissue samples. Overall, the application of Raman spectroscopy offers the possibility of expanding the spectrum of non-invasive diagnostics as a technical diagnostic method of tissue differentiation in the point-of-care setting, provided that further development is required for *in situ* application.

7. Abkürzungsverzeichnis

5-ALA:	5-Aminolävulinsäure
AUC:	area under the curve
DNA:	Desoxyribonukleinacid (Desoxyribonukleinsäure)
FAD:	Flavin-Adenin-Dinukleotid
HPV:	humanes Papilloma_virus
LDA:	Lineare Diskriminanzanalyse (Linear discriminant analysis)
NADH:	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
NIR:	near infrared
OSCC:	oral squamous cell carcinoma
PCA:	Hauptkomponentenanalyse (Principal component analysis)
PC:	Hauptkomponente (Principal component)
ROC-Kurve:	Grenzwertoptimierungskurve (receiver operator characteristic curve)
PPIX:	Protoporphyrin IX
SERDS:	shifted-excitation Raman-difference spectroscopy
SIN:	squamöse intraepitheliale Neoplasie
UICC:	Union for International Cancer Control

8. Literaturverzeichnis

- ALSARRAF, A. H., KUJAN, O. & FARAH, C. S. 2018. The utility of oral brush cytology in the early detection of oral cancer and oral potentially malignant disorders: A systematic review. *J Oral Pathol Med*, 47, 104-116.
- APPLEBAUM, E., RUHLEN, T. N., KRONENBERG, F. R., HAYES, C. & PETERS, E. S. 2009. Oral cancer knowledge, attitudes and practices: a survey of dentists and primary care physicians in Massachusetts. *J Am Dent Assoc*, 140, 461-7.
- BACKHAUS, K. E., B. , PLINKE, W. & WEIBER, R. 2018. *Multivariate Analysemethoden - Eine anwendungsorientierte Einführung*, Berlin, Heidelberg, Springer Gabler.
- BAEK, S. J., PARK, A., AHN, Y. J. & CHOO, J. 2015. Baseline correction using asymmetrically reweighted penalized least squares smoothing. *Analyst*, 140, 250-7.
- BAGAN, J., SARRION, G. & JIMENEZ, Y. 2010. Oral cancer: clinical features. *Oral Oncol*, 46, 414-7.
- BERGHOLT, M. S., ZHENG, W. & HUANG, Z. 2012. Characterizing variability in in vivo Raman spectroscopic properties of different anatomical sites of normal tissue in the oral cavity. *Journal of Raman Spectroscopy*, 43, 255-262.
- BERGSTRÄ, J., KOMER, B., ELIASMITH, C., YAMINS, D. & COX, D. 2015. Hyperopt: a python library for model selection and hyperparameter optimization. *Computational Science & Discovery*, 8, 014008.
- BERKOVITZ, K. B., HOLLAND, G. R. & MOXHAM, B. J. 2017. *Oral Anatomy, Histology and Embryology*, Elsevier.
- BETZ, C. S., STEPP, H., JANDA, P., ARBOGAST, S., GREVERS, G., BAUMGARTNER, R. & LEUNIG, A. 2002. A comparative study of normal inspection, autofluorescence and 5-ALA-induced PPIX fluorescence for oral cancer diagnosis. *Int J Cancer*, 97, 245-52.
- BRAY, F., FERLAY, J., SOERJOMATARAM, I., SIEGEL, R. L., TORRE, L. A. & JEMAL, A. 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 68, 394-424.
- BUGSHAN, A. & FAROOQ, I. 2020. Oral squamous cell carcinoma: metastasis, potentially associated malignant disorders, etiology and recent advancements in diagnosis. *F1000Res*, 9, 229.
- BUTLER, H. J., ASHTON, L., BIRD, B., CINQUE, G., CURTIS, K., DORNEY, J., ESMONDE-WHITE, K., FULLWOOD, N. J., GARDNER, B., MARTIN-HIRSCH, P. L., WALSH, M. J., MCAINSH, M. R., STONE, N. & MARTIN, F. L. 2016. Using Raman spectroscopy to characterize biological materials. *Nat Protoc*, 11, 664-87.
- CALS, F. L. J., BAKKER SCHUT, T. C., CASPERS, P. J., BAATENBURG DE JONG, R. J., KOLJENOVIC, S. & PUPPELS, G. J. 2018. Raman spectroscopic analysis of the molecular composition of oral cavity squamous cell carcinoma and healthy tongue tissue. *Analyst*, 143, 4090-4102.
- CARVALHO, L. F., BONNIER, F., O'CALLAGHAN, K., O'SULLIVAN, J., FLINT, S., BYRNE, H. J. & LYNNG, F. M. 2015. Raman micro-spectroscopy for rapid screening of oral squamous cell carcinoma. *Exp Mol Pathol*, 98, 502-9.
- CASPARIS, S., BORM, J. M., TOMIC, M. A., BURKHARDT, A. & LOCHER, M. C. 2014. Transepithelial Brush Biopsy - Oral CDx(R) - A Noninvasive Method for the Early Detection of Precancerous and Cancerous Lesions. *J Clin Diagn Res*, 8, 222-6.

- CHAWLA, N. V., BOWYER, K. W., HALL, L. O. & KEGELMEYER, W. P. 2002. SMOTE: synthetic minority over-sampling technique. *Journal of artificial intelligence research*, 16, 321-357.
- DANZER, K., HOBERT, H. F., C. & JAGEMANN, K. U. 2001. *Chemometrik - Grundlagen und Anwendungen*, Berlin, Heidelberg, Springer.
- DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR MUND-, KIEFER- UND GESICHTSCHIRURGIE (DGMKG) 2019: SK2-Leitlinie (Langversion) Diagnostik und Management von Virläuferläsionen des oralen Plattenepithelkarzinoms in der Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde, Version September 2019, <https://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/007-092.html>, Zugriff am 30.04.2024 09:13)
- DEVPURA, S., BARTON, K. N., BROWN, S. L., PALYVODA, O., KALKANIS, S., NAIK, V. M., SIDDIQUI, F., NAIK, R. & CHETTY, I. J. 2014. Vision 20/20: the role of Raman spectroscopy in early stage cancer detection and feasibility for application in radiation therapy response assessment. *Med Phys*, 41, 050901.
- DOS SANTOS COSTA, S. F., BRENNAN, P. A., GOMEZ, R. S., FREGNANI, E. R., SANTOS-SILVA, A. R., MARTINS, M. D., DE CASTRO-JUNIOR, G., RAHIMI, S. & FONSECA, F. P. 2018. Molecular basis of oral squamous cell carcinoma in young patients: Is it any different from older patients? *J Oral Pathol Med*, 47, 541-546.
- EINSTEIN, G., UDAYAKUMAR, K., ARUNA, P. R., KOTEESWARAN, D. & GANESAN, S. 2016. Diffuse reflectance spectroscopy for monitoring physiological and morphological changes in oral cancer. *Optik*, 127, 1479.
- EPSTEIN, J. B., SCULLY, C. & SPINELLI, J. 1992. Toluidine blue and Lugol's iodine application in the assessment of oral malignant disease and lesions at risk of malignancy. *J Oral Pathol Med*, 21, 160-3.
- GEBREKIDAN, M. T. 2014. *Shifted Excitation Raman Difference Spectroscopy for Identification of Oral Squamous Cell Carcinoma*. Masters, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg.
- GEBREKIDAN, M. T., ERBER, R., HARTMANN, A., FASCHING, P. A., EMONS, J., BECKMANN, M. W. & BRAEUER, A. 2018. Breast Tumor Analysis Using Shifted-Excitation Raman Difference Spectroscopy (SERDS). *Technol Cancer Res Treat*, 17, 1533033818782532.
- GEBREKIDAN, M. T., KNIPFER, C., STELZLE, F., POPP, J., WILL, S. & BRAEUER, A. S. 2016. A shifted-excitation Raman difference spectroscopy (SERDS) evaluation strategy for the efficient isolation of Raman spectra from extreme fluorescence interference. *Journal of Raman Spectroscopy*, 47, 198-209.
- GIOVANNACCI, I., VESCOVI, P., MANFREDI, M. & MELETI, M. 2016. Non-invasive visual tools for diagnosis of oral cancer and dysplasia: A systematic review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 21, e305-15.
- HANLON, E. B., MANOHARAN, R., KOO, T. W., SHAFER, K. E., MOTZ, J. T., FITZMAURICE, M., KRAMER, J. R., ITZKAN, I., DASARI, R. R. & FELD, M. S. 2000. Prospects for in vivo Raman spectroscopy. *Phys Med Biol*, 45, R1-59.
- HE, S., ZHANG, W., LIU, L., HUANG, Y., HE, J., XIE, W., WU, P. & DU, C. 2014. Baseline correction for Raman spectra using an improved asymmetric least squares method. *Analytical Methods*, 6, 4402-4407.

- HERTRAMPF, K., WENZ, H. J., KOLLER, M. & WILTFANG, J. 2012. Comparing dentists' and the public's awareness about oral cancer in a community-based study in Northern Germany. *J Craniomaxillofac Surg*, 40, 28-32.
- HU, Y., JIANG, T. & ZHAO, Z. 2008. Discrimination of Squamous Cell Carcinoma of the Oral Cavity Using Raman Spectroscopy and Chemometric Analysis. *First International Conference on Intelligent Networks and Intelligent Systems*, 633-636.
- HUANG, Z., MCWILLIAMS, A., LAM, S., ENGLISH, J., MCLEAN, D. I., LUI, H. & ZENG, H. 2003. Effect of formalin fixation on the near-infrared Raman spectroscopy of normal and cancerous human bronchial tissues. *Int J Oncol*, 23, 649-55.
- JAYANTHI, J. L., MALLIA, R. J., SHINY, S. T., BAIJU, K. V., MATHEWS, A., KUMAR, R., SEBASTIAN, P., MADHAVAN, J., APARNA, G. N. & SUBHASH, N. 2009. Discriminant analysis of autofluorescence spectra for classification of oral lesions in vivo. *Lasers in Surgery and Medicine*, 41, 345-352.
- JEMAL, A., BRAY, F., CENTER, M. M., FERLAY, J., WARD, E. & FORMAN, D. 2011. Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 61, 69-90.
- JENG, M. J., SHARMA, M., SHARMA, L., CHAO, T. Y., HUANG, S. F., CHANG, L. B., WU, S. L. & CHOW, L. 2019. Raman Spectroscopy Analysis for Optical Diagnosis of Oral Cancer Detection. *J Clin Med*, 8.
- KASHA, M. 1950. Characterization of electronic transitions in complex molecules. *Discussions of the Faraday Society*, 9, 14-19.
- KENNEDY, J. C., MARCUS, S. L. & POTTIER, R. H. 1996. Photodynamic therapy (PDT) and photodiagnosis (PD) using endogenous photosensitization induced by 5-aminolevulinic acid (ALA): mechanisms and clinical results. *J Clin Laser Med Surg*, 14, 289-304.
- KHAN, A. & FAROOQ, H. 2012. Principal component analysis-linear discriminant analysis feature extractor for pattern recognition. *arXiv preprint arXiv:1204.1177*.
- KLOSA, K., WILTFANG, J., WENZ, H. J., KOLLER, M. & HERTRAMPF, K. 2011. Dentists' opinions and practices in oral cancer prevention and early detection in Northern Germany. *Eur J Cancer Prev*, 20, 313-9.
- KNIPFER, C., MOTZ, J., ADLER, W., BRUNNER, K., GEBREKIDAN, M. T., HANKEL, R., AGAIMY, A., WILL, S., BRAEUER, A., NEUKAM, F. W. & STELZLE, F. 2015. Erratum: Raman difference spectroscopy: a non-invasive method for identification of oral squamous cell carcinoma: publisher's note. *Biomed Opt Express*, 6, 2675.
- KÖGLER, M. & HEILALA, B. 2020. Time-gated Raman spectroscopy – a review. *Measurement Science and Technology*, 32, 012002.
- KOWALSKI, L. P. & CARVALHO, A. L. 2001. Influence of time delay and clinical upstaging in the prognosis of head and neck cancer. *Oral Oncol*, 37, 94-8.
- KRAFFT, C. & SERGO, V. 2006. Biomedical applications of Raman and infrared spectroscopy to diagnose tissues. *Journal of Spectroscopy*, 20, 195-218.
- KRISHNA, C. M., SOCKALINGUM, G. D., KURIEN, J., RAO, L., VENTEO, L., PLUOT, M., MANFAIT, M. & KARTHA, V. B. 2004. Micro-Raman spectroscopy for optical pathology of oral squamous cell carcinoma. *Appl Spectrosc*, 58, 1128-35.

- LAU, D. P., HUANG, Z., LUI, H., ANDERSON, D. W., BEREAN, K., MORRISON, M. D., SHEN, L. & ZENG, H. 2005. Raman spectroscopy for optical diagnosis in the larynx: preliminary findings. *Lasers Surg Med*, 37, 192-200.
- LEUNIG, A., BETZ, C. S., MEHLMANN, M., STEPP, H., ARBOGAST, S., GREVERS, G. & BAUMGARTNER, R. 2000. Detection of squamous cell carcinoma of the oral cavity by imaging 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX fluorescence. *Laryngoscope*, 110, 78-83.
- LIEBER, C. A. & MAHADEVAN-JANSEN, A. 2003. Automated method for subtraction of fluorescence from biological Raman spectra. *Appl Spectrosc*, 57, 1363-7.
- LINGEN, M. W., KALMAR, J. R., KARRISON, T. & SPEIGHT, P. M. 2008. Critical evaluation of diagnostic aids for the detection of oral cancer. *Oral Oncol*, 44, 10-22.
- MAIWALD, M., MÜLLER, A., SUMPFF, B., ERBERT, G. & TRÄNKLE, G. 2015. Capability of shifted excitation Raman difference spectroscopy under ambient daylight. *Appl Opt*, 54, 5520-4.
- MAJUMDER, S. K., KELLER, M. D., BOULOS, F. I., KELLEY, M. C. & MAHADEVAN-JANSEN, A. 2008. Comparison of autofluorescence, diffuse reflectance, and Raman spectroscopy for breast tissue discrimination. *Journal of Biomedical Optics*, 13, 054009.
- MALINI, R., VENKATAKRISHNA, K., KURIEN, J., PAI, K. M., RAO, L., KARTHA, V. B. & KRISHNA, C. M. 2006. Discrimination of normal, inflammatory, premalignant, and malignant oral tissue: a Raman spectroscopy study. *Biopolymers*, 81, 179-93.
- MALLIA, R., THOMAS, S. S., MATHEWS, A., KUMAR, R., SEBASTIAN, P., MADHAVAN, J. & SUBHASH, N. 2008. Oxygenated hemoglobin diffuse reflectance ratio for in vivo detection of oral pre-cancer. *J Biomed Opt*, 13, 041306.
- MARCUS, S. L., SOBEL, R. S., GOLUB, A. L., CARROLL, R. L., LUNDAHL, S. & SHULMAN, D. G. 1996. Photodynamic therapy (PDT) and photodiagnosis (PD) using endogenous photosensitization induced by 5-aminolevulinic acid (ALA): current clinical and development status. *J Clin Laser Med Surg*, 14, 59-66.
- MEHROTRA, R., HULLMANN, M., SMEETS, R., REICHERT, T. E. & DRIEMEL, O. 2009. Oral cytology revisited. *J Oral Pathol Med*, 38, 161-6.
- MONTERO, P. H. & PATEL, S. G. 2015. Cancer of the oral cavity. *Surg Oncol Clin N Am*, 24, 491-508.
- MOVASAGHI, Z., REHMAN, S. & REHMAN, I. U. 2007. Raman Spectroscopy of Biological Tissues. *Applied Spectroscopy Reviews*, 42, 493-541.
- NAGI, R., REDDY-KANTHARAJ, Y. B., RAKESH, N., JANARDHAN-REDDY, S. & SAHU, S. 2016. Efficacy of light based detection systems for early detection of oral cancer and oral potentially malignant disorders: Systematic review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 21, e447-55.
- PÅLSSON, S. 2003. *Methods, Instrumentation and Mechanisms for Optical Characterization of Tissue and Treatment of Malignant Tumours*. Doctoral Thesis (Compilation), Lund University.
- PUDLAS, M. 2012. *Nicht invasive Diagnostik in der Regenerativen Medizin mittels Raman-Spektroskopie*, Stuttgart, Universität Stuttgart.
- RASHID, A. & WARNAKULASURIYA, S. 2015. The use of light-based (optical) detection systems as adjuncts in the detection of oral cancer and oral

- potentially malignant disorders: a systematic review. *J Oral Pathol Med*, 44, 307-28.
- RIVERA, C. 2015. Essentials of oral cancer. *Int J Clin Exp Pathol*, 8, 11884-94.
- ROBERT-KOCH-INSTITUT, H. U. D. & GESELLSCHAFT DER EPIDEMIOLOGISCHEN KREBSREGISTER IN DEUTSCHLAND E.V., H. 2019. Krebs in Deutschland für 2015/2016. 12. Ausgabe.
- SAHU, A., DESHMUKH, A., HOLE, A. R., CHATURVEDI, P. & KRISHNA, C. M. 2016. In vivo subsite classification and diagnosis of oral cancers using Raman spectroscopy. *Journal of Innovative Optical Health Sciences*, 09, 1650017.
- SARODE, S. C., SARODE, G. S. & TUPKARI, J. V. 2014. Oral potentially malignant disorders: A proposal for terminology and definition with review of literature. *J Oral Maxillofac Pathol*, 18, S77-80.
- SATO, S., SEKINE, R., KAGOSHIMA, H., KAZAMA, K., KATO, A., SHIOZAWA, M. & TANAKA, J. I. 2019. All-in-one Raman spectroscopy approach to diagnosis of colorectal cancer: analysis of spectra in the fingerprint regions. *J Anus Rectum Colon*, 3, 84-90.
- SINGH, S. P., IBRAHIM, O., BYRNE, H. J., MIKKONEN, J. W., KOISTINEN, A. P., KULLAA, A. M. & LYNNG, F. M. 2016. Recent advances in optical diagnosis of oral cancers: Review and future perspectives. *Head Neck*, 38 Suppl 1, E2403-11.
- SMITH, E. & DENT, G. 2019. *Modern Raman Spectroscopy: A Practical Approach*.
- SPEIGHT, P. M., KHURRAM, S. A. & KUJAN, O. 2018. Oral potentially malignant disorders: risk of progression to malignancy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 125, 612-627.
- STEPHEN, M. M., JAYANTHI, J. L., UNNI, N. G., KOLADY, P. E., BEENA, V. T., JEEMON, P. & SUBHASH, N. 2013. Diagnostic accuracy of diffuse reflectance imaging for early detection of pre-malignant and malignant changes in the oral cavity: a feasibility study. *BMC Cancer*, 13, 278.
- SUBHASH, N., MALLIA, J. R., THOMAS, S. S., MATHEWS, A., SEBASTIAN, P. & MADHAVAN, J. 2006. Oral cancer detection using diffuse reflectance spectral ratio R540/R575 of oxygenated hemoglobin bands. *J Biomed Opt*, 11, 014018.
- SUNG, H., FERLAY, J., SIEGEL, R. L., LAVERSANNE, M., SOERJOMATARAM, I., JEMAL, A. & BRAY, F. 2021. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*, 71, 209-249.
- THOMAS, A., MANCHELLA, S., KOO, K., TIONG, A., NASTRI, A. & WIESENFELD, D. 2021. The impact of delayed diagnosis on the outcomes of oral cancer patients: a retrospective cohort study. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 50, 585-590.
- VAN DER WAAL, I. & SCULLY, C. 2010. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; present concepts of management. *Oral Oncol*, 46, 423-5.
- VENKATAKRISHNA, K. L., KURIEN, J., PAI, K. M., VALIATHAN, M., KUMAR, N. N., KRISHNA, C. M., ULLAS, G. & KARTHA, V. B. 2001. Optical pathology of oral tissue: A raman spectroscopy diagnostic method. *Current Science*, 80, 665-669.
- WARNAKULASURIYA, S., KUJAN, O., AGUIRRE-URIZAR, J. M., BAGAN, J. V., GONZÁLEZ-MOLES, M. Á., KERR, A. R., LODI, G., MELLO, F. W., MONTEIRO, L., OGDEN, G. R., SLOAN, P. & JOHNSON, N. W. 2020. Oral

potentially malignant disorders: A consensus report from an international seminar on nomenclature and classification, convened by the WHO Collaborating Centre for Oral Cancer. *Oral Dis*.

- WOLFF, K.-D., AL-NAWAS, B., AL-SHARIF, U., BECK, J., BIKOWSKI, K., BISSINGER, O., BÖHME, P., BÖNTE-HIERONYMUS, I., BOOTZ, F., BOZZATO, A., BUDACH, W., BURKHARDT, A., DANKER, H., EBERHARDT, W., ENGERS, K., FIETKAU, R., FRERICH, B., GAULER, T., GEHRMANN-WEIDE, K., GERMANN, G., GIANNAKOPOULOS, N., GITTLER-HEBESTREIT, N., GRÖTZ, K., HERTRAMPF, K., HOFFMANN, J., HORCH, R., IHRLER, S., KAUFMANN, R., KEHRER, A., KEILHOLZ, U., KLUSSMAN, P., KOLK, A., LELL, M., LÜBBE, A., MANTEY, W., MISCHKOWSKI, R., MOLL, R., NIEBERLER, M., NUSSER-MÜLLER-BUSCH, R., PISTNER, H., PARADIES, K., RAU, A., REICHERT, T., REINERT, S., SCHILLING, B., SCHLIEPHAKE, H., K., S., SCHMITTER, M., SINGER, S., TERHEYDEN, H., TROOST, E., WATERBOER, T., WESTHOFEN, M., WEITZ, J., WIRZ, S., WITTLINGER, M. & ZÖPHEL, K. 2021. S3-Leitlinie Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms. *Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V.*
- YANG, E. C., TAN, M. T., SCHWARZ, R. A., RICHARDS-KORTUM, R. R., GILLENWATER, A. M. & VIGNESWARAN, N. 2018. Noninvasive diagnostic adjuncts for the evaluation of potentially premalignant oral epithelial lesions: current limitations and future directions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 125, 670-681.
- ZHENG, W., OLIVO, M. & SOO, K. C. 2004. The use of digitized endoscopic imaging of 5-ALA-induced PPIX fluorescence to detect and diagnose oral premalignant and malignant lesions in vivo. *Int J Cancer*, 110, 295-300.

9. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Diagramm der Rayleigh- und Raman-Streuprozesse. Die nach oben gerichteten Pfeile stellen die Anregung des Moleküls durch monochromatisches Licht dar. Die nach unten ausgerichteten Pfeile repräsentieren die je nach Interaktion unterschiedlich emittierten Photonen, die mittels Spektrometer detektiert werden können. Die Länge der Pfeile ist proportional zur Energie der Photonen. In Anlehnung an Smith, E. & Dent, G. 2019. Modern Raman Spectroscopy: A Practical Approach	15
Abbildung 2: Diodenlaser (1), dichroitische Spiegel (2), Glan-Prisma (3), Polarisator (4) und Glasfaserkabel für die Weiterleitung des Anregungslaserstrahls (5)	17
Abbildung 3: Schematische Darstellung des selbst entwickelten Ramansystems	18
Abbildung 4: Fotoaufnahme des technischen Setups im Labor	19
Abbildung 5: Vorbereiten einer Gewebeprobe auf schwarzem Teflonpapier	22
Abbildung 6: schematisches Verfahren zur Extraktion eines reinen Raman-Spektrums dargestellt anhand eines simulierten Fluoreszenzhintergrunds	24
Abbildung 7: Benutzeroberfläche der eigens entwickelten Softwareanwendung	25
Abbildung 8: Entfaltung der Raman-Banden mittels Voigt-Profil-Anpassung	25
Abbildung 9: Beispiel einer Hauptkomponentenanalyse	27
Abbildung 10: Schematische Darstellung der Datenverarbeitung und Klassifizierung	29
Abbildung 11: Rekonstruierte mittlere Raman-Spektren von physiologischer Mundschleimhaut (grüne Linie) sowie OSCC-Gewebe (rote Linie) mit Spitzen-Positionszuordnung zu ihrem jeweiligen molekularen Ursprung. Lipide (hellgrün), Protein (hellgelb), sowohl Proteine als auch Lipide (lila), Nukleinsäure (hellrot) sowie Proteine, Nukleinsäure und Kohlenhydrate (hellbraun).	35
Abbildung 12: Raman-Spektrum von sterilen Mullkompressen (schwarz gestrichelte Linie) und Raman-Spektrum von oralem Gewebe, welches mit sterilen Mullkompressen verunreinigt ist (schwarze durchgezogene Linie)	37
Abbildung 13: isoliertes Raman-Spektrum von Foliodrape (gestrichelte Linie) und Raman-Spektrum einer <i>ex vivo</i> Gewebeprobe aus der Mundhöhle mit einer Schichtdicke von weniger als 1mm, welche auf Foliodrape platziert wurde (durchgezogene Linie)	38

Abbildung 14: Raman-Spektren von Proben handelsüblichen Hühnerfleisches in unterschiedlichen Schichtstärken platziert auf schwarzer Teflonfolie: 1 mm (grau), 3 mm (blau), 5 mm (grün). Isoliertes Raman-Spektrum von schwarzer Teflonfolie ist ebenfalls dar	39
Abbildung 15: Ergebnisse der Hauptkomponentenanalyse generierter Raman-Spektren von OSCC-Läsionen (n=30; rote Punkte) und physiologischer Mundschleimhaut (n=17; grüne Punkte) von insgesamt 47 Patient:innen	40
Abbildung 16: Grenzwertoptimierungskurve (ROC), zur Bewertung der Leistung der PCA-LDA-Klassifikatoren zwischen gesunder Mundschleimhaut vs. OSCC-Gewebe (schwarze Kurve)	41
Abbildung 17: Der Effekt Formalins auf das Raman-Spektrum mittels synchronisierter Untersuchungsansätze: reines Formalin (schwarze, gestrichelte Linie), in Formalin gelagertes orales Gewebe (schwarze, durchgezogene Linie) und in 0,9 %iger NaCl-Lösung gelagertes oral	42
Abbildung 18: Rekonstruierte mittlere Raman-Spektren von in Formalin fixierter physiologischer Mundschleimhaut (grüne Linie) und in Formalin fixiertem OSCC-Gewebe (rote Linie) mit Positionszuordnung zu ihrem jeweiligen molekularen Ursprung. Die graue Linie entspricht dem Raman-Spektrum reinen Formalins	44
Abbildung 19: Grenzwertoptimierungskurve (ROC), zur Bewertung der Leistung der PCA-LDA-Klassifikatoren zwischen in 0,9 %iger NaCl-Lösung gelagerter gesunder Mundschleimhaut vs. OSCC-Gewebe (schwarze Kurve)	47
Abbildung 20: Grenzwertoptimierungskurve (ROC), zur Bewertung der Leistung der PCA-LDA-Klassifikatoren zwischen in Formalin gelagerter gesunder Mundschleimhaut vs. OSCC-Gewebe (schwarze Kurve)	48
Abbildung 21: Ergebnisse der Hauptkomponentenanalyse (PCA) von Raman-Spektren von OSCC-Geweben unterschiedlichen anatomischen Ursprungs (violette Rauten = Zunge, grüne Dreiecke = Mundboden, orangene Quadrate = Wange, hellblaue Kreise = Alveolarkamm)	50
Tabelle 1: Der Arbeit zugrunde liegende Patient:innen, Proben und Messungen	34
Tabelle 2: Zuordnung der spektralen Merkmale im mittleren Raman-Spektrum zu den Molekülschwingungen und dem molekularen Ursprung (Movasaghi et al., 2007, Venkatakrishna et al., 2001).....	36

Tabelle 3: Anzahl und Verteilung der Patient:innen, Gewebeproben, gesammelten mittleren Spektren, sowie der Messpunkte für die Analyse des Effekts der Formalin-Fixierung kleinster, oraler Gewebeproben	43
Tabelle 4: Anzahl und Verteilung der Patient:innen, Gewebeproben, gesammelten Roh- und mittleren Spektren sowie der Messpunkte für die Analyse der Differenzierbarkeit zwischen gesunder Mundschleimhaut und OSCC-Gewebe gelagert in 0,9 %iger NaCl-Lösung.....	46
Tabelle 5: Anzahl und Verteilung der Patient:innen, der Gewebeproben, der gesammelten Roh- und mittleren Spektren sowie der Messpunkte bezogen auf die Analyse der Differenzierbarkeit zwischen gesunder Mundschleimhaut und OSCC-Gewebe gelagert in Formalin.....	46
Tabelle 6: Anzahl und Verteilung der Patient:innen, der Gewebeproben, der gesammelten Roh- und mittleren Spektren sowie der Messpunkte bezogen auf die unterschiedlichen anatomischen Entnahmegebiete	49

10. Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Ralf Smeets für die Möglichkeit im spannenden Fach der Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie erfolgreich forschen zu können. Seine unterhaltsam gestalteten Vorlesungen und sein überspringender Enthusiasmus für das Fach haben mich sehr geprägt.

Ich danke meinem Betreuer Priv.-Doz. Dr. med. Dr. med. dent. Christian Knipfer für die Einführung in das faszinierende Gebiet der optischen Diagnostikverfahren, den intensiven fachlichen Austausch, die Hilfsbereitschaft sowie für das Vertrauen, welches er mit stets entgegengebracht hat.

Besonderen Dank an Dr.-Ing. Medhanie Tesfay Gebrekidan für die technische Betreuung der Arbeit, die geduldige Anleitung im Labor und den gemeinsamen Spaß.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern Christine und Friedrich sowie meinen Geschwistern Daniel, Laura und Jonathan für ihre unermüdliche Aufmunterung und emotionale Unterstützung.

11. Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

12. Publikationsverzeichnis

Matthies, L., Gebrekidan, M.T., **Tegtmeyer, J.F.**, Oetter, n., Rohde, M., Vollkommer, T., Smeets, R., Wilczak, W., Stelzle, F., Gosau, M., Braeuer, A. S., Knipfer, C. 2021, *Optical diagnosis of oral cavity lesions by label-free Raman-spectroscopy*, *Biomed Opt Express*, 12, 836-851.

13. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: