

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Erstellung und Evaluation eines Raman-spektroskopischen
Messkopfs zur Analyse von Hauttumoren und Auswertung
von klinischen Studiendaten

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Johannes Schleusener

aus Berlin

Datum der Promotion: 26.02.2016

Inhalt

Inhalt.....	1
Abstrakt	2
Abstract	3
Einleitung	4
Zielstellung.....	5
Methodik	6
Experimenteller Aufbau	6
Raman Fiber Probe RFP.....	7
Image Guided Raman Probe IGRP	8
Raman Messungen	8
Charakterisierung Messköpfe.....	9
Störeinflüsse	9
Klinische Erprobung	10
Ergebnisse	11
Charakterisierung der Raman Sonden.....	11
Bestimmung von Störfaktoren	12
Spektrenzuordnung.....	14
Inhomogenität kanzeröser Läsionen.....	15
Klassifizierung Maligner Melanome MM.....	15
Klassifizierung von weißem Hautkrebs BCC und SCC.....	16
Diskussion	16
Literatur.....	18
Eidesstattliche Versicherung	23
Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen.....	24
Publikationen.....	25
Lebenslauf	63
Publikationsliste	64
Danksagung	66

Abstrakt

Die Eignung der Raman-Spektroskopie zur Unterscheidung von Hautkrebs und normaler Haut wurde bereits in einigen Studien gezeigt. In den meisten Studien wurden dazu Raman-Mikroskope verwendet, die für den klinischen *In-vivo*-Einsatz nur bedingt geeignet sind.

In dieser Studie wurden zwei fasergekoppelte Raman-Messköpfe entwickelt, die Anregungs- und Detektionsspotgrößen von $\approx 200 \mu\text{m}$ und damit eine hohe Sensitivität bis zur Tiefe der Basalmembran haben, wo Tumoren der Haut bevorzugt entstehen. Im Vergleich zur Raman-Mikrospektroskopie wird dadurch gleichzeitig über ein größeres Volumen gemittelt, wodurch der Einfluss einzelner Zellen reduziert wird. Die Messköpfe setzen den Schwerpunkt auf einfache klinische Anwendbarkeit und Erreichbarkeit einer Vielzahl an Körperstellen oder auf einen sichtbaren Messspot im Video-Übersichtsbild zur genauen Zuordnung der Messposition mit den histopathologischen Befunden. Beide Messköpfe wurden bezüglich Spotgrößen, Lichtdurchsatz, Untergrundsignal, Tiefensensitivität, klinischer Handhabung und Umgebungslichtunterdrückung evaluiert und bewertet, woraufhin einer der Messköpfe zur Verwendung in einer klinischen Erprobung ausgewählt wurde.

Da die Verwendung optischer Fasern und die *In-vivo*-Anwendung die Empfindlichkeit für Störfaktoren gegenüber der *Ex-vivo*-Anwendung stationärer Raman-Mikroskope erhöht, wurden diese vor Beginn der klinischen Erprobung an dem ausgewählten Messkopf untersucht. Die Auswertung erfolgte mittels Prinzipalkomponentenanalyse (PCA). Zu den deutlichsten, aber prinzipiell kontrollierbaren Störfaktoren gehörten der Einfluss des Umgebungslichts, sowie die Vorbehandlung der Hautläsionen. Geringeren Einfluss zeigte die Immersion mit H_2O sowie variierender Anpressdruck und Faserbiegeradius.

In der klinischen Erprobung wurden Messungen an 111 Probanden an Läsionen mit Verdacht auf malignes Melanom (*MM*), Basalzellkarzinom (*BCC*) und Plattenepithelkarzinom (*SCC*) jeweils vor der geplanten Exzision durchgeführt. Die Klassifizierung der angewendeten Partial-least-squares-Diskriminanzanalyse (PLS-DA) im $300\text{-}1730 \text{ cm}^{-1}$ Fingerprint-Bereich basierte auf den post-operativen histopathologischen Befunden als Goldstandard.

Die Diskriminierung von *MM* zu normalen pigmentierten Naevi (*PN*) erzielte eine Balanced Accuracy (Mittelwert von Sensitivität und Spezifität) von 91%. Die Diskriminierung von *BCC* bzw. *SCC* zu normaler unpigmentierter Haut (*nor*) ergab eine Balanced Accuracy von 73% bzw. 85%. Diese Ergebnisse liegen in der Größenordnung des derzeitigen klinischen Standards, der Dermatoskopie, wurden jedoch objektiv ermittelt und sind daher unabhängig von der Erfahrung des untersuchenden Dermatologen.

Abstract

The potential of Raman-Spectroscopy for the discrimination of skin cancer and normal skin has been shown in various studies. In most cases Raman-microscopes with restricted use in clinical *in vivo* applications were used.

Two fiber-coupled Raman probes with high sensitivity up until the basal membrane, where early stages of skin cancer originate, were developed. This was achieved with spot sizes of $\approx 200 \mu\text{m}$ for excitation and detection. Compared to Raman-micro-spectroscopy, this also averages over a larger volume, reducing the influence of individual cells. The probes have an emphasis on either easy clinical application and access to difficult to access body sites or a video-visible excitation spot for assigning the measurement positions to the histopathological findings. Spot sizes, light throughput, background signal, depth sensitivity, clinical applicability and ambient light suppression of both probes were evaluated, which lead to selecting one probe for a clinical evaluation.

Compared to the *ex vivo* application of stationary Raman-microscopes, *in vivo* use of fiber-probes increase the sensibility to perturbation factors. Therefore, the influence of these factors was examined previous to the clinical evaluation on the selected probe. The evaluations were achieved using principal component analysis (PCA). The most severe but in principle controllable perturbation factors were ambient light influence and the pre-treatment of measured lesions. Minor influences were the H_2O -immersion, as well as varying contact pressure and fiber bending.

In the clinical evaluation, measurements of 111 subjects with lesions suspected to be malignant melanoma (*MM*), basal cell carcinoma (*BCC*) or squamous cell carcinoma (*SCC*) were made prior to the scheduled excision. The classification of the applied partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) in the $300\text{-}1730 \text{ cm}^{-1}$ fingerprint region was based on the post-excisional histopathologic findings as a gold standard.

A 91% balanced accuracy (mean of sensitivity and specificity) was achieved in discriminating *MM* from normal pigmented nevi (*PN*). For the discrimination of *BCC* and *SCC* from normal unpigmented skin (*nor*), a balanced accuracy of 73% and 85% was achieved. This is in the range of results achieved by dermoscopy, the current clinical standard, but, the results are objective and independent on the level of training of the examining dermatologist.

Einleitung

Das derzeitig gängige klinische Verfahren zur Hautkrebserkennung ist die dermatoskopische Untersuchung mit post-operativer histopathologischer Bestätigung. Dieses Verfahren kann Sensitivitäten von 80-90% erreichen [1-6], doch es ist subjektiv und abhängig von der Erfahrung des untersuchenden Arztes oder der untersuchenden Ärztin [7,8].

Eine Herausforderung der Exzision verdächtiger Läsionen besteht in der Bestimmung der idealen Resektionslinie unter Erhalt eines Sicherheitssaumes bei Vermeidung von unnötiger Entfernung gesunder Haut und Bildung von Narbengewebe [9]. Eine objektive nicht-invasive Diagnose könnte die derzeitige Praxis verbessern und dadurch unnötige Exzisionen vermeiden und die Exzidate verkleinern. Durch Echtzeitdiagnose könnten die Histopathologie entlastet, Resektionsgrenzen intra-operativ bestimmt und Nachexzisionen vermieden werden.

Ein mögliches Diagnoseverfahren ist die Raman-Spektroskopie (RS) [10], die Informationen über die molekulare Gewebeszusammensetzung liefert und eine markerfreie Untersuchung ermöglicht [11]. Der Raman-Streuquerschnitt und die Absorption von Wasser ist nur gering [12,13], wodurch *In-vivo*-Messungen in tieferliegende Hautschichten ermöglicht werden [14]. Da nur 1 von $\approx 10^9$ Photonen Raman-gestreut werden, sind die Spektren jedoch durch einen großen Fluoreszenzuntergrund überlagert und lange Messzeiten sind notwendig [15].

In klinischen *Ex-vivo*-Studien konnten mit RS Sensitivitäten und Spezifitäten bis zu 100% erreicht werden [8,16-20]. Diese wurden zumeist mit stationären Raman-Mikroskopen durchgeführt, die durch die eingeschränkte Zugänglichkeit verdächtiger Läsionen, für klinische *In-vivo*-Messungen nur bedingt geeignet sind. Einen wichtigen Entwicklungsschritt stellte das fasergekoppelte Raman-Mikroskop von Lieber *et al* dar [21,22], das in einer *In-vivo*-Studie zur Diskriminierung von weißem Hautkrebs (*BCC* und *SCC*) und normaler Haut (*nor*) eine Klassifikationsgenauigkeit von 96% erreichte, was in der Größenordnung der vorangegangenen *Ex-vivo*-Studien lag [23].

Eine noch bequemere Handhabung wird durch die Verwendung von Fasersonden erreicht, die eine Vielzahl von Körperpositionen erreichen können oder sogar endoskopische Anwendungen ermöglichen [15,24-35]. Die Herausforderung des Optikdesigns dieser Fasersonden besteht in der Optimierung der Filtercharakteristik und des Spotüberlapps von Anregung und Detektion zur Erhöhung des Lichtdurchsatzes und Lage des Detektionsvolumens. Bei der Anwendung von Fasersonden *in vivo* ergibt sich eine eingeschränkte Reproduzierbarkeit, die im Vergleich zu stationären Aufbauten zu einer Verringerung der Klassifikationsgenauigkeit führen kann [8].

Zielstellung

Das Ziel ist die nicht-invasive objektive Diskriminierung von Hauttumoren und normaler Haut *in vivo*. Dazu wurde ein transportabler, kliniktauglicher RS Messplatz aufgebaut.

Eine häufige Anwendung ist die konfokale Raman-Mikrospektroskopie, bei der Spotgrößen von $\approx 1-5 \mu\text{m}$ in einer definierten Tiefe bis zu $\approx 100 \mu\text{m}$ verwendet werden [17,19,22,36]. Dies ermöglicht die Analyse auf Zell-Ebene, oder sogar darunter [37]. Für die Hautkrebserkennung *in vivo* ist es jedoch sinnvoll Messungen über ein größeres Messvolumen zu Mitteln und sich dadurch auf die Hauptbestandteile der Haut zu fokussieren [38]. Durch mikroskopische Einzelmessungen inhomogener Läsionen besteht zudem die Gefahr, an Positionen zu messen, an der keine Hautkrebs-Transformation stattgefunden hat. In einigen Studien wurde dem durch Spotgrößen von 2-3,5 mm auf der Hautoberfläche entgegengewirkt [39-42]. Bei den verwendeten Fasersonden werden die Strahlengänge bei direktem Kontakt gewöhnlicherweise auf der Hautoberfläche fokussiert, wodurch der Strahlverlauf in der Haut divergent ist [43].

Ein weiterer Aspekt zur Wahl der Spotgröße ist die Tiefensensitivität. Eine Abhängigkeit der Klassifikationsgenauigkeit von der Messtiefe wurde *ex vivo* gezeigt [19]. Frühstadien von Hautkrebs entwickeln sich bevorzugt auf der epidermalen Seite der Basalmembran [44], die sich, abhängig von der Körperposition in einer Tiefe von $\approx 50-100 \mu\text{m}$ zwischen Dermis und Epidermis befindet [45,46]. Wenn ein Großteil des detektierten Signals aus diesem Bereich detektiert wird, könnte die Sensitivität für die Hautkrebserkennung daher erhöht werden und eine Detektion von Hautkrebs-Frühestadien erreicht werden [28]. In vorangegangenen Monte-Carlo-Simulationen wurde gezeigt, dass ein Großteil des detektierten Signals bei einer Spotgröße von $\approx 200 \mu\text{m}$ in einer Tiefe von $\leq 100 \mu\text{m}$ entsteht [47]. In der vorliegenden Studie wurden daher Spotgrößen von $200 \mu\text{m}$ auf der Hautoberfläche angestrebt.

Zur Erprobung der klinischen Eignung wurden zwei Messköpfe erstellt. Eine der beiden Messköpfe, die Raman Fiber Probe (RFP), setzte den Schwerpunkt auf leichte Handhabung und Erreichbarkeit einer Vielzahl von Körperpositionen, der andere Messkopf, die Image Guided Raman Probe (IGRP), auf optimierte Filtercharakteristik und einen sichtbaren Messspot im Videoübersichtsbild und dadurch genauerer Zuordnung aufgenommener Spektren zu den histologischen Befunden. Die Charakterisierung und klinische Eignung dieser beiden Sonden erfolgte durch Messungen an Hautphantomen. Es sollte eine Sonde ausgewählt werden, bei der alle relevanten Störfaktoren durch Umgebungsbedingungen und individuelle Handhabung ermittelt werden. Diese Sonde wurde dann in einer klinischen Studie nach Medizinproduktegesetz (MPG) an 111 Patienten eingesetzt.

Methodik

Experimenteller Aufbau

Zur Anregung wurde in beiden Sonden ein fasergekoppelter 40 mW, 785 nm Diodenlaser verwendet (Eagleyard Photonics, Berlin). Die optische Leistung auf der Hautoberfläche betrug 17 mW. Als Detektionseinheit wurde ein iHR 320 Monochromator mit einem Transmissionsgitter mit 600 Linien/mm und einem 200 μm Eingangsspalt sowie einer auf $-70\text{ }^\circ\text{C}$ gekühlten rückseitig beleuchteten Synapse CCD-Kamera (Horiba JobinYvon, Edison, NJ, USA) verwendet. Das Raman-gestreute Licht im Fingerprint-Bereich organischer Moleküle von $300\text{-}1730\text{ cm}^{-1}$ wurde mit einer spektralen Auflösung von $\nu \leq 11\text{ cm}^{-1}$ bei einer Belichtungszeit von 10 s detektiert. Im kollimierten Strahlenbereich vor dem Eingangsspalt befand sich ein RazorEdge LP02-785RS-25 (Semrock, Inc., Rochester, NY, USA) sowie ein OD 2 Langpassfilter, um das Rayleigh-gestreute Licht abzuschwächen. Zur Steuerung und Datenaufnahme wurde Software unter Verwendung von Labview 8.6 (National Instruments, Austin, TX, USA) und Labspec 5 (Horiba JobinYvon, Edison, NJ, USA) eingesetzt.

Es wurden zwei verschiedene fasergekoppelte Sonden verwendet, die im Folgenden beschrieben werden und in Abbildung 1 und 2 dargestellt sind. Diesem Teil liegt Publikation 1 zugrunde [48]. Beide Sonden wurden im Betrieb mit einer $\varnothing 0,5$ Zoll GP-KS822 CCD-Videokamera (Panasonic System Networks Co., Ltd, Tokyo, Japan) mit einem 7 mm Einzellinsenobjektiv zur Aufnahme eines Übersichtsbildes der Hautläsionen ausgerüstet, um die Messposition mit den histopathologischen Befunden vergleichen zu können. Der vollständige Messaufbau wurde nach EN 60825-1 als Laserklasse 1M eingeordnet.

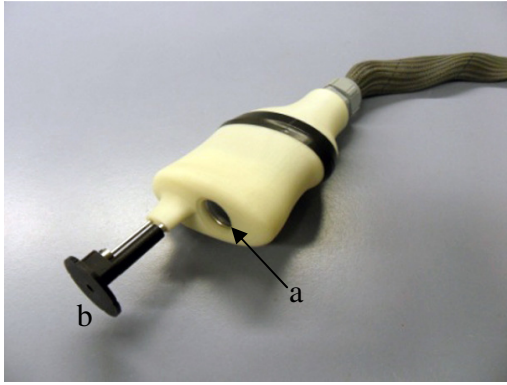


Abbildung 1: Raman Fiber Probe (RFP) mit Videokamera (a) und Umgebungslichtabschattung (b).

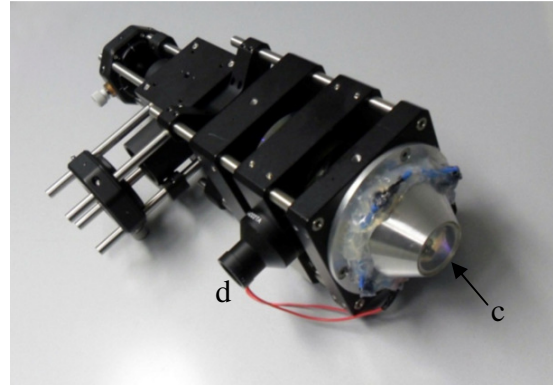


Abbildung 2: Image Guided Raman Probe (IGRP) mit CaF₂-Messfenster (c), Videokameraeinkopplung (d)

Raman Fiber Probe RFP

Die \varnothing 4,1 mm Raman Fiber Probe (RFP) wurde entsprechend der Design-Vorgaben konstruiert und gefertigt (Emvision, LLC, FL, USA) und in einem Gehäuse mit der Videokamera und einem Sicherheitsschalter zur Shuttersteuerung montiert (Abbildung 1). Zusätzlich ist eine \varnothing 30 mm Raumlichtabschattung aus schwarzem Acrylnitril-Butadien-Styrol (ABS) am distalen Ende angebracht. Da die Kamera seitlich versetzt ist und der Messspot durch das Aufsetzen der Sonde selbst verdeckt ist, ist dieser im Videoübersichtsbild nicht sichtbar. Die Strahlführung wird mittels Gradienten-index (GRIN) Linsen ermöglicht, die bei Sonden mit geringem Durchmesser den Spotüberlapp erhöhen, ohne dichroitische Strahlteilerspiegel zu verwenden. Am distalen Ende befindet sich eine Saphirlinse, die beim Aufsetzen in direktem Kontakt mit der Haut steht. Eine 100 μ m-Faser wird zur Anregung verwendet, drei 400 μ m-Fasern leiten das detektierte Licht zum Eingangsspalt des Spektrometers. Da die Anregungs- und Detektionsstrahlengänge die GRIN-Linse nicht zentral passieren, liegen ihre Fokusse auf der Sondenoberfläche zwar übereinander, divergieren aber mit zunehmendem Abstand abgewinkelt auseinander. Im kollimierten Bereich des Detektionsstrahlenganges befindet sich ein angepasster Rayleigh-Langpassfilter BLP01-785R-25, um die Laserstrahlung und damit das Entstehen von Fluoreszenz- und Raman-Streuung des Fasermaterials zu unterdrücken. Entsprechend steht im kollimierten Bereich des Anregungsstrahls ein zugeschnittener Laser-clean-up-Filter LL01-785-12.5 (alle Filter Semrock, Inc., Rochester, NY, USA), um die breitbandige spontane Emission des Diodenlasers, sowie ein Fluoreszenz- und Raman-Untergrundsignal des Anregungskanals zu

unterdrücken. Die Sonde hat Abmessungen von $192 \times 74 \times 38 \text{ mm}^3$ und wiegt 250 g, was eine handgehaltene Bedienung bequem ermöglicht.

Image Guided Raman Probe IGRP

Die Image Guided Raman Probe (IGRP) wurde aus kommerziell erhältlichen Teilen selbst designed und zusammengesetzt (Abbildung 2). Da Anregungs-, Detektions- und bildgebender Strahlengang gemeinsam durch eine gewebeseitige asphärische Linse geleitet werden, ist in dieser Variante der Anregungsspot im Videoübersichtsbild sichtbar, was eine genaue Zuordnung der Messposition ermöglicht. Die Sonde misst $70 \times 150 \times 270 \text{ mm}^3$ und wiegt $\approx 2 \text{ kg}$. Durch die größeren Abmessungen ist die Handhabung eingeschränkt. Eine Aufhängung an einem Stativ, vergleichbar mit dem Aufbau von Patil *et al* [49] könnte den klinischen Einsatz erleichtern. Die Sonde hat ein $\varnothing 23 \text{ mm}$ CaF_2 -Messfenster in direktem Kontakt mit der Haut, das aufgrund seines geringen Fluoreszenzuntergrundes und wenig störender Ramanbanden ausgewählt wurde [50]. Zur Anregung wird eine $600 \mu\text{m}$ -Faser verwendet; der Detektionskanal verwendet ein Bündel aus $31 \times 100 \mu\text{m}$ -Fasern, die auf der Seite des Spektrometer-Eingangsspalt zur Erhöhung des Lichtdurchsatzes linear angeordnet sind. Der Anregungskanal wurde mittels eines dichroitischen Strahlteilers F78-780 in den Detektionskanal eingespiegelt. Im kollimierten Bereich des Anregungsstrahlengangs wurde ein Bandpassfilter LL01-785-25 zur Unterdrückung der breitbandigen spontanen Emission des Lasers und des in der Anregungsfaser entstandenen Fluoreszenz- und Raman-Anteils positioniert. Ein Langpassfilter RazorEdge LP02-785RS-25 befand sich im kollimierten Teil des Detektionsstrahlenganges, um das Rayleigh gestreute Licht, und damit die Erzeugung eines zusätzlichen Fluoreszenz- und Raman-Signals der Detektionsfasern, zu unterdrücken (Alle Filter Semrock, Inc., Rochester, NY, USA).

Raman Messungen

Es wurden Messungen an Silikonphantomen [51] mit vergleichbarer Absorption und Streuung zu menschlicher Haut [52], durchgeführt. Durch die erhöhte Homogenität sind Messungen an Phantomen reproduzierbarer als Messungen an der Haut und damit der Vergleich der Sonden verbessert. Die Phantome bestanden aus Silikon (BLUESIL ESA 7250 A&B, Bluestar Silicones, Lyon; Frankreich) mit TiO_2 (Degussa-Hüls, Hanau) als Streumedium und Silopren LSR (GE Bayer Silicones, Erkrath) als Absorber. Weiterhin wurden *Ex-vivo*-Messungen an unbehandelten Schweineohren, die als geeignetes Modell für menschliche Haut nachgewiesen sind [53], durchgeführt. Diese wurden einen Tag nach der Schlachtung durchgeführt, wobei

die ungebrühten Schweineohren in der Zwischenzeit bei 4 °C gekühlt wurden. Die Nutzung der Proben wurden durch das Amt für Verbraucherschutz und Landwirtschaft, Dahme Spreewald, Brandenburg genehmigt. Im Rahmen der klinischen Erprobung wurden schließlich *In-vivo*-Messungen mit einer Sonde an der menschlichen Haut durchgeführt. Alle Messungen wurden mit einer Belichtungszeit von 10 s durchgeführt.

Nach der Datenaufnahme wurden die Spektren einer Vorverarbeitung unterzogen. Diese beinhaltete eine Wellenlängenkalibration, Entfernung kosmischer Peaks, Savitsky-Golay-Glättung [54], Untergrundabzug, standard-normal-variate (SNV) Normalisierung und Kompensation der instrumentenbedingten spektralen Empfindlichkeitscharakteristik. Die einzelnen Schritte und ihre Auswirkungen werden ausführlich in den Zusatzinformationen zu Publikation 3 beschrieben [55].

Charakterisierung Messköpfe

Zur Charakterisierung der Messköpfe wurden Spotgrößen durch Knife Edge Messungen [56] bestimmt. Signalintensität, Fluoreszenzuntergrund, Unterdrückung des Rayleighpeaks sowie des Umgebungslichteinflusses und die Handhabung wurden untersucht. Die Tiefensensitivität wurde anhand von Messungen mit dünnen Silikon-Schichtphantomen bestimmt. Für eine Messreihe wurde eine 80 µm dicke Polyethylen (PE) Folie nach und nach von der Oberfläche in die Tiefe der Schichtphantome bewegt. Die Tiefensensitivität ergab sich aus dem 1/e-Abfall der integrierten Intensität einer PE-Bande um 1295 cm⁻¹ in Abhängigkeit der Tiefe der PE-Folie. Diesem Abschnitt liegt Publikation 1 zugrunde [48]

Störeinflüsse

Die klinische Erprobung wurde mit der RFP durchgeführt. Zuvor wurden Messungen zur Bestimmung der Störfaktoren, unter identischen Messbedingungen wie bei der klinischen Erprobung, durchgeführt. Zur Auswertung wurden Mittelwertsabweichungen (Mittelwert aller Standardabweichungen an jeder Stützstelle eines Spektrums) und eine Prinzipalkomponentenanalyse (PCA) berechnet. Um die Mittelwerte und Verteilungen von zwei Klassen von Spektren unter Einfluss verschiedener Störfaktoren zu vergleichen, wurden anhand dieser Daten schließlich *T*- bzw. *F*-Tests mit Signifikanzlevel $\alpha=0.05$ durchgeführt. Im Falle von Mehrfachtests wurde die Bonferoni-Korrektur angewendet, um signifikante Zufallsergebnisse (Typ-I-Fehler) zu vermeiden. Für multiples Testen von einer größeren Anzahl von Klassen wurde eine einfache Analysis-of-Variance (ANOVA) durchgeführt. Der Bestimmung der Störfaktoren liegt Publikation 2 zugrunde [57].

Klinische Erprobung

Die Klinische Erprobung fand zwischen 04.09.2012 und 05.03.2014 in der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, Charité, Berlin statt. Dabei wurden, im Anschluss an eine dermatoskopische Untersuchung, Messungen an 111 Probanden mit verdächtigen Läsionen durchgeführt. Die Klassifizierung der Spektren erfolgte auf Basis des post-operativen histopathologischen Befundes. Für die Datenauswertung wurden Messungen von 104 Probanden, darunter 36 mit Verdacht auf malignes Melanom (*MM*), 39 mit Verdacht auf Basalzellkarzinom (*BCC*) und 29 mit Verdacht auf Plattenepithelkarzinom (*SCC*), herangezogen. Zudem wurden Messungen an 67 unverdächtigen pigmentierten Naevi (*PN*) von 33 Probanden mit Hauttyp I-IV durchgeführt. Alle gemessenen Läsionen waren frei von Haaren, Verletzungen oder bekannten Hauterkrankungen. Eine schriftliche Einwilligung aller Patienten lag vor. Es wurden keine Messungen an schwangeren oder stillenden Frauen, Minderjährigen oder bei bekannter Alkohol-, Drogen- oder Medikamentenabhängigkeit durchgeführt. Die klinische Erprobung nach Medizinproduktegesetz (MPG) wurde durch die Ethikkommission des Landesamtes für Gesundheit und Soziales, Berlin (LaGeSo) und das Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) genehmigt (Eudamed-Nr.: CIV-12-02-003981) und erfolgte in Übereinstimmung mit der Erklärung von Helsinki in der Fassung von 2008.

Es wurden 3 Spektren von jeder Läsion, sowie 6 Referenzspektren von umliegender normaler Haut (*nor*) im Abstand von ≈ 15 mm von der Läsion aufgenommen. Für die Klassifizierung wurden für jede Läsion die Mittelwerte der Referenzspektren sowie die Mittelwerte der Spektren von den Läsionen selbst herangezogen. Letztere wurden der maximalgradigen Diagnose der Histopathologie zugeordnet.

Als Klassifikationsverfahren wurde eine Partial-least-squares-Diskriminanzanalyse (PLS-DA) angewendet [58]. Zur Validierung des Klassifikationsverfahrens wurde die Leave-one-out-cross-validation genutzt, was die Bestimmung der Sensitivität und Spezifität, bzw. deren Mittelwert, der Balanced Accuracy, ermöglichte. Zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurden 95%-Konfidenzintervalle (CIs) bestimmt, die als $\pm 1.96 \times$ Standardabweichung 1σ festgelegt sind. Zur Abschätzung der 95%-CIs wurde ein Bootstrapping Verfahren angewendet [59]. Im Folgenden, wie auch in Publikation 3 [55], der die klinische Studie zugrunde liegt, werden histologisch bestätigte Läsionen als *MM1*, *BCC1* und *SCC1* bezeichnet. Läsionen, die histologisch als kein Hautkrebs identifiziert wurden, werden entsprechend als *MM0*, *BCC0* und *SCC0* bezeichnet.

Ergebnisse

Charakterisierung der Raman Sonden

Messgeometrie: Für die RFP konnte eine Anregungspotgröße von $104\ \mu\text{m}$ und damit eine Leistungsdichte von $2.0 \times 10^2\ \text{W}/\text{cm}^2$ festgestellt werden. Der asymmetrische Detektionsspot hatte eine Größe von $529\text{-}589\ \mu\text{m}$. Die IGRP hatte eine kreisförmige Detektionsspotgröße von $356\ \mu\text{m}$ und eine Anregungspotgröße von $362\ \mu\text{m}$, und damit die Leistungsdichte $1.7 \times 10^1\ \text{W}/\text{cm}^2$.

Untergrund: Bereits die Leerspektren der RFP zeigen einen deutlichen Peak um $1070\ \text{cm}^{-1}$. Da dieser bei Verschiebung der Anregungswellenlänge nicht mitverschoben wird wie die Raman-Banden, handelt es sich nicht um eine Raman-Bande, sondern vermutlich um schmalbandige Fluoreszenz, die in der optischen Anordnung der Sonde entsteht. In den Leermessungen der IGRP um $285,6\ \text{cm}^{-1}$ ist eine Raman-Bande des CaF_2 -Messfensters erkennbar.

Die RFP zeigt in den Leerspektren bei gleicher Anregungsintensität einen >3000 -fach stärkeren Rayleighpeak und einen 6-fach stärkeren Fluoreszenzuntergrund als die IGRP, was auf reduzierte Qualität der Filtereigenschaften hindeutet. Obwohl in beiden Sonden vergleichbare Filter und Fasern verwendet werden, besteht bei der RFP eine größere Möglichkeit zum Kanalübersprechen zwischen Detektion und Anregung, da beide Strahlengänge parallel nebeneinander verlaufen. Ein Teil des Anregungslichtes kann auch an den Grenzflächen der optischen Elemente innerhalb der Sonde reflektiert werden und direkt in den Detektionskanal gelangen. Durch einen hohen Anteil des Anregungslichts im Detektionskanal kann zusätzliche Fluoreszenz in den Detektionsfasern erzeugt werden. Ein hoher Fluoreszenzanteil erschwert die Untergrundkorrektur bei der Vorverarbeitung und begünstigt Artefakte. Vorverarbeitete Raman-Spektren ohne SNV Normierung von Silikonphantomen zeigten bei der RFP verringerte Peakhöhen um $12 \pm 2\%$ im Vergleich zur IGRP. Das Rauschen eines ebenen Abschnittes der Spektren der IGRP ist um 16% geringer als bei der RFP.

Raumlichteinfluss: Bei Messungen an Silikonphantomen mit der IGRP unter Einfluss von Fluoreszenz-Raumlicht einer Leuchtstoffröhre wurde ein 20% iger Anstieg des breitbandigen Untergrundes festgestellt, mit der RFP trat kein Anstieg auf. Zudem sind die $811, 819, 830, 851, 878$ und $893\ \text{nm}$ Krypton-Emissionslinien des Raumlichtes in beiden Fällen deutlich erkennbar. Während ein breitbandiger erhöhter Untergrund durch den Untergrundabzug kompensiert werden kann, führen die Emissionslinien des Raumlichts und Absorptionslinien

des Tageslichtes zu Artefakten in den Spektren, weshalb der Einfluss des Raumlichtes für die Betrachtung der Störfaktoren genauer untersucht wurde. Für die RFP wird eine \varnothing 30 mm Raumlichtabschattung verwendet. Bei der IGRP wird ein \varnothing 23 mm CaF₂-Messfenster, das in einem Aluminiumhalter mit 2 mm Wandstärke ohne zusätzliche Raumlichtabschattung gehalten wird, verwendet. Bei der IGRP kann demnach ein größerer Anteil des Umgebungslichtes in den Detektionskanal gelangen, das durch die Haut unter der Wand des Aluminiumhalters hindurch in den Detektionskanal gelangt.

Tiefensensitivität: Für die Messungen der Tiefensensitivität der IGRP ergaben sich Eindringtiefen von 264-446 μm für hautähnliche Phantome mit Absorptionskoeffizienten $\mu_a=0.01 \text{ mm}^{-1}$ bzw. 236-394 μm für Phantome mit $\mu_a=0.1 \text{ mm}^{-1}$. Mit Zunahme vom reduzierten Streukoeffizienten μ_s' von 0,5 auf 4 mm^{-1} nahm die Eindringtiefe ab. Da die Spektren der RFP starke Variationen aufwiesen, wurden die Messreihen aller reduzierten Streukoeffizienten μ_s' gemittelt. Dabei ergaben sich Eindringtiefen von 180 μm bei Absorptionskoeffizienten $\mu_a=0.01 \text{ mm}^{-1}$ und 162 μm bei $\mu_a=0.1 \text{ mm}^{-1}$. Eine Erklärung für die größere Eindringtiefe der IGRP verglichen mit der RFP könnten die unterschiedlichen Spotgrößen sein, zudem laufen die Anregungs- und Detektionsstrahlengänge bei der RFP mit zunehmendem Abstand der Probe auseinander, wodurch der Überlapp beider Strahlengänge in tieferen Schichten abnimmt.

Schlussfolgerung: Da für die klinische Erprobung eine einfache Handhabung und die Erreichbarkeit einer möglichst großen Anzahl verdächtiger Läsionen gewährleistet sein müssen, wurde die klinische Erprobung, sowie die vorherige Bestimmung potentieller Störfaktoren, nur mit der RFP durchgeführt.

Bestimmung von Störfaktoren

Da die Reduzierung des Faserbiegeradius den Lichtdurchsatz verringert [60], kann eine Bewegung der Sonde zu Intensitätsschwankungen und Änderung der Modenverteilung führen. *Ex-vivo*-Messungen an Schweineohren zeigten eine lineare Intensitätsabnahme des Rayleighpeaks von 75 auf 37,5 mm Biegeradius um 10,2% ($p=0,022$) und eine vergleichbare Intensitätsabnahme des Untergrundes in den Rohspektren. Nach SNV Normierung der vorverarbeiteten Spektren konnten keine spektralen Abhängigkeiten, Zunahme des Rauschens oder Intensitätsschwankungen der Raman-Banden festgestellt werden.

Trotz der \varnothing 30 mm Raumlichtabschattung der RFP wird das Umgebungslicht nicht vollständig unterdrückt. Es wurden *Ex-vivo*-Messungen an Schweineohren bei Dunkelheit, LED-Weißlicht-Beleuchtung, sowie Tages- und Fluoreszenz-Raumlicht durchgeführt. Die

Krypton-Emissionslinien des Raumlichts und Absorptionslinien des Sonnenlichts hinterlassen deutliche Strukturen in den vorverarbeiteten Spektren. Messungen bei Raum- und Tageslicht zeigten signifikante Unterschiede in der Mittelwertsabweichung und in den Mittelwerten, sowie der Verteilung der ersten beiden Prinzipalkomponenten (*PC1* und *PC2*) einer PCA im Vergleich zu Messungen in Dunkelheit. Messungen bei LED-Weißlicht-Beleuchtung, die nicht im detektierten Wellenlängenbereich emittierte, zeigten keine signifikanten Unterschiede.

Wasser kann bei unzureichendem Kontakt der Sonde zur Haut als Immersionsflüssigkeit eingesetzt werden, was die Reproduzierbarkeit der Messungen erhöhen kann. Durch Verwendung der Immersion wurde die Mittelwertsabweichung um 20% reduziert, die Mittelwerte von *PC1* für Messungen mit und ohne Immersion waren jedoch signifikant unterschiedlich. Die charakteristische H₂O-Raman-Bande um 1650 cm⁻¹ [61], konnte nicht identifiziert werden.

Bei *In-vivo*-Messungen kann die Vorbehandlung von Läsionen nicht ausgeschlossen werden. Es wurden *Ex-vivo*-Messungen an Schweineohren durchgeführt, die zuvor mit Markern (chirurgische Verwendung zur Kennzeichnung der Resektionsgrenzen), Desinfektionsmittel (Anwendung vor der Messung) und Haut- und Sonnenschutzcreme (unbemerkte Anwendung durch Patient) behandelt wurden. Im Vergleich zu Referenzmessungen ohne Vorbehandlung ergaben sich die stärksten Abweichungen für Läsionen mit Markern und geringere Abweichungen bei Sonnenschutzcreme. In diesen Fällen traten signifikante Unterschiede der Mittelwerte der ersten 3 Prinzipalkomponenten auf.

Mit Verwendung der Raumlichtabschattung wurden 3 Messreihen mit leichter (1.6±0.05 N), mittlerer (6.9±0.5 N) und starker (16±1 N) Anpresskraft auf einer Fläche von ≈7 cm² durchgeführt, wobei die Mittlere der gewöhnlichen Handhabung entspricht. Die Mittelwertsabweichung nahm für mittleren und starken Anpressdruck im Vergleich zum leichten Anpressdruck signifikant um 18.8% ab. Leichter Anpressdruck erhöht demnach die Möglichkeit unzureichenden Kontaktes von der Sonde zur Haut.

Zur Beurteilung, ob Haare die Messungen beeinflussen, wurden Messungen *in vivo* an der Wange eines Probanden vor und nach dem Rasieren von 5 mm langen Barthaaren durchgeführt. Die Mittelwertsspektren der unrasierten Wange zeigen signifikant höhere Intensitäten und Standardabweichungen zwischen 1500-1600 cm⁻¹. Melanin ist ein Hauptbestandteil der Haare und hat eine charakteristische Raman-Bande um 1572 cm⁻¹ [62], die in diesem Bereich liegt. Messungen an einem Büschel Haaren zeigten eine breite Raman-Bande zwischen 1480-1620 cm⁻¹. Die Mittelwertsabweichung der unrasierten Wange war um

163.6% höher. Die Varianz der Spektren der unrasierten Wange war für *PC1* um 813.7% und für *PC2* um 153.3% höher. Die Ergebnisse zeigen eine höhere Reproduzierbarkeit für Messungen an haarfreier Haut.

UV-Exposition der Haut führt zu erhöhter Melaninproduktion der Melanosomen [63]. Neben der Raman-Aktivität des Melanins sind Änderungen der optischen Eigenschaften möglich, da für dunkle Hauttypen die Absorption unterhalb von 900 nm zunimmt [64]. Es wurden Messungen *in vivo* an einem Probanden oberhalb (gebräunt) und unterhalb (ungebräunt) des Kragens im Nacken durchgeführt. Die Messungen an gebräunter Haut zeigten eine Intensitätszunahme zwischen 1500 und 1600 cm^{-1} . Da der gebräunte Hautbereich regelmäßig UV-exponiert ist, kann der Einfluss auch nicht nur auf erhöhtes Melanin, sondern auch auf dauerhafte UV-Schädigung, wie z.B. Hyperkeratose, zurückzuführen sein [65].

Inter- und intra-individuelle Variationen der Raman-Spektren treten z.B. aufgrund unterschiedlicher Hauttypen [42], Alter, Geschlecht, Messposition, Dicke der Hautschichten und Hydratation [66] auf. Es wurden jeweils 6 Raman-Messungen *in vivo* an 11 Probanden am oberen Rücken, an 9 Probanden am Bein und an 9 Probanden an der Wange durchgeführt. Bei der Untersuchung der interindividuellen Varianz zeigte eine ANOVA für alle Messpositionen für die Messungen an mindestens einem Probanden signifikante Unterschiede der Mittelwertsabweichung und mindestens einer der ersten beiden *PCs*.

Da Störfaktoren wie die interindividuellen Variationen nicht vermieden werden können, wurde die Verwendung von Differenzspektren für die Klassifikation vorgeschlagen [23,37]. Dabei werden vorverarbeitete Referenzspektren normaler Haut von den vorverarbeiteten Spektren verdächtiger Läsionen abgezogen, was individuelle Einflüsse kompensieren könnte. Lui *et al* berichteten jedoch auch von geringerer Klassifikationsgenauigkeit [40].

Spektrenzuordnung

Die Spektren der RFP zeigen starke Oszillationen unterhalb von 1050 cm^{-1} , die durch die Interferenzfilter der Sonde erzeugt werden und trotz Korrektur mit der spektralen Empfindlichkeitscharakteristik und dem Abzug eines Leerspektrums nur unzureichend entfernt werden können, da die Signalstärke bei den Leerspektren geringer ist. Unzureichendes Entfernen einer schmalbandigen Fluoreszenz führt z.B. zu einem S-Schlag-Artefakt um 1030-1100 cm^{-1} .

Charakteristische Raman-Banden für die Haut sind im oberen Wellenzahlbereich identifizierbar. Die größte Bande um 1450 cm^{-1} entsteht durch $\delta(\text{CH}_2)(\text{CH}_3)$ Biegeschwingungen von Lipiden und Proteinen. Die Amid-I-Bande um 1655 cm^{-1} wird mit

C=O Streckschwingungen von Kollagen und Elastin in Verbindung gebracht, die Amid-III-Bande um 1270 cm^{-1} mit CN-Streck- und NH-Biegeschwingungen. Dieser Bereich ist durch eine $1300\text{-}1330\text{ cm}^{-1}$ -Bande überlagert, die durch CH-Deformationen von Adenin und Phenylalanin entsteht.

Die deutlichsten Unterschiede der Spektren unterschiedlicher Klassen bestehen zwischen Spektren pigmentierter Läsionen (*MMI*, *MMO* und *PN*) und allen Messungen an nicht pigmentierter Haut, was auf den erhöhten Melaningehalt pigmentierter Läsionen schließen lässt. Das Raman-Spektrum von Melanin zeigt 2 breite Banden zwischen $1360\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$ und $1570\text{-}1590\text{ cm}^{-1}$ [39,62]. Im $1360\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$ -Bereich ist nur eine geringfügige, im $1475\text{-}1640\text{ cm}^{-1}$ Bereich hingegen eine deutliche Intensitätszunahme für pigmentierte Läsionen festzustellen, was durch andere Veröffentlichungen bestätigt wurde [67]. Eine Intensitätsabnahme der 1650 cm^{-1} Amid-I-Bande ist deutlich erkennbar, was ebenfalls mit Literaturangaben übereinstimmt [8,10,20,38,67]. Ebenso wurde eine Intensitätsabnahme der 1450 cm^{-1} -Bande für *PN* festgestellt [62].

Inhomogenität kanzeröser Läsionen

Beispielsweise durch Tumor-Zellnester [49] nimmt die Inhomogenität von Läsionen zu und damit auch die Möglichkeit, dass die Messpositionen nicht mit der maximalen Diagnose der Histopathologie übereinstimmen. Zur Überprüfung wurde die Varianz der 3 Messungen der Läsionen mit der Varianz der 6 Referenzmessungen verglichen. Signifikante Unterschiede der Varianz konnten für *BCC* ($p=0.001$) und *SCC* ($p=0.004$) zu normaler Haut festgestellt werden, was ein Anzeichen für die Inhomogenität der Läsionen mit weißen Hautkrebs ist.

Klassifizierung Maligner Melanome MM

Die Trennung von *MMI* und *MMO* war mit einer Balanced Accuracy von 60% nicht erfolgreich. Die Begrenzung auf den $1100\text{-}1730\text{ cm}^{-1}$ Wellenzahlbereich ohne Oszillationen verbesserte die Ergebnisse nicht merklich (66%). Die Diskriminierung von *MMI* zu *PN* ergab eine Balanced Accuracy von 91% für den $300\text{-}1730\text{ cm}^{-1}$ - und den $1100\text{-}1730\text{ cm}^{-1}$ -Bereich, eine Beschränkung auf den $300\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$ -Bereich, in dem starke Oszillationen auftauchten und wo die Raman-Banden schwierig zu identifizieren sind, ergab dennoch eine Balanced Accuracy von 83%. Lui *et al* erzielten bei der Diskriminierung von *MM* und *PN* die besten Ergebnisse im $1055\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$ -Bereich [40]. Für alle Ergebnisse wurden 95%-CIs von 19,6% berechnet, was beispielsweise bei der Trennung von *MMI* zu *MMO* einer Balanced Accuracy von 50,2-69,8% entspricht.

Klassifizierung von weißem Hautkrebs BCC und SCC

Mit einer Balanced Accuracy von 51%, war eine Diskriminierung von *BCC1* und *BCC0* nicht erfolgreich, wurde *BCC1* hingegen gegenüber normaler Haut (*nor*) diskriminiert, so ergab sich eine Balanced Accuracy von 73%, ohne Verbesserung bei Beschränkung auf 1100-1730 cm^{-1} . Auch für die PLS-DA von weißem Hautkrebs wurden 95%-CIs von 19.6% festgestellt. In anderen Studien wurden Abhängigkeiten der Klassifikationsgenauigkeit von den gemessenen Körperpositionen festgestellt [20,42,66]. Mit einer Balanced Accuracy von 68% für Messungen am Kopf und 70% für Messungen am Torso konnte dies nicht bestätigt werden.

Eine Diskriminierung von *SCC1* zu *SCC0* ergab nur eine Balanced Accuracy von 40% (32% für 1100-1730 cm^{-1}). Bei der Diskriminierung von *SCC1* zu *nor* konnte hingegen eine Balanced Accuracy von 85% (87% für 1100-1730 cm^{-1}) festgestellt werden, was in der Größenordnung vergleichbarer Studien liegt [42]. Durch Verwendung von Differenzspektren wurde die Balanced Accuracy auf 73% reduziert.

Diskussion

Die beiden Sonden wurden hinsichtlich ihrer klinischen Eignung getestet. Die Vorteile der RFP sind leichtere Handhabung und Erreichbarkeit einer Vielzahl von Körperpositionen und stärkere Umgebungslichtabschirmung. Vorteile der IGRP sind genaue Zuordnung der Messposition im Übersichtsbild durch einen sichtbaren Messspot, stärkere Rayleigh-Unterdrückung, geringerer Fluoreszenzuntergrund und geringeres Rauschen. Die Messtiefe der RFP lag näher am Designziel von $\approx 100 \mu\text{m}$, was die epidermale Sensitivität erhöht. Beide Sonden sind für den klinischen Gebrauch geeignet. Da in der klinischen Erprobung eine Vielzahl von verdächtigen Läsionen erreicht werden sollten und die einfache Handhabung im Vordergrund stand, wurde die klinische Erprobung und Bestimmung der Störfaktoren ausschließlich mit der RFP durchgeführt.

Die untersuchten Störfaktoren müssen zudem unterschieden werden in externe Störfaktoren der Messbedingungen und interne Störfaktoren, die auf physiologischen Unterschieden beruhen. Externe Störfaktoren können durch erhöhten Messaufwand reduziert oder kontrolliert, die internen Störfaktoren können allenfalls in der Auswertung kompensiert werden. Von den externen Störfaktoren stellen die Umgebungslichteinflüsse die größte Beeinflussung dar, weshalb für die klinische Erprobung nur LED-Weißlicht-Beleuchtung verwendet wurde. Diese wurden gefolgt von Einflüssen durch Vorbehandlung und Immersion. Die Messungen wurden daher ohne bekannte Vorbehandlung und Immersion an

haarfreien Läsionen mit gleichmäßigem Anpressdruck durchgeführt. Die weiteren Störfaktoren konnten durch die Messbedingungen nicht verhindert werden. In der Datenauswertung wurden daher zusätzlich auch Differenzspektren für die Klassifikation herangezogen, um zu überprüfen ob dadurch individuelle Einflüsse verhindert werden konnten.

Eine Diskriminierung von histopathologisch bestätigten Läsionen zu verdächtigen Läsionen, die als Nicht-Tumor identifiziert wurden, und damit die Raman-spektroskopische Vorhersage, war nicht möglich. Dies bedeutet, dass die histopathologische Befundung nicht besser als bei der Dermatoskopie vorhergesagt werden konnte. Die Diskriminierung von weißem Hautkrebs gegenüber normaler Haut und *MM* gegenüber normalen pigmentierten Naevi erzielte Ergebnisse in der Größenordnung der Dermatoskopie [1-6,10], jedoch ist der Vergleich der Ergebnisse gegenüber der Dermatoskopie schwierig, da die gemessenen Läsionen entsprechend dem Studiendesign anhand des dermatoskopischen Verdachtes vorausgewählt wurden. Die Ergebnisse liegen im Bereich vergleichbarer Raman-Studien der Haut, wobei sich die Zusammensetzung der Studienpopulationen unterscheiden. Philipsen *et al* trennten *BCC*, *MM* und *PN* von *nor* [20], Lui *et al* benutzen eine gemeinsame Klasse aus *MM*, *BCC* und *SCC* gegen benigne Läsionen einschließlich *PN* und *nor* und trennten *MM* von *PN* [40]. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch bei der Verwendung der Fluoreszenzspektroskopie [68,69] in der Erkennung von weißem Hautkrebs [70] und *MM* [71] erzielt. RS reagiert im Vergleich zur Fluoreszenzspektroskopie spezifischer in Bezug auf die funktionellen Gruppen der Gewebemoleküle. Beide Methoden ergänzen sich jedoch aufgrund der Spezifität zu unterschiedlichen Bestandteilen der Haut [35]. Die Fluoreszenzspektroskopie ist z.B. sensitiv gegenüber den endogenen Fluorophoren Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD), reduziertem Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NADH), Kollagen, Elastin, Tryptophan und Porphyrinen [72-74]. Insgesamt scheint RS als Ergänzung zur Dermatoskopie oder der Einsatz zur intraoperativen Resektionslinienbestimmung sinnvoll.

Das Ignorieren des $300-1100\text{ cm}^{-1}$ -Bereiches, in dem die Banden schwierig zu interpretieren sind [75,76] und der in den vorliegenden Spektren durch starke Oszillationen dominiert wird, führte entgegen den Ergebnissen von Lui *et al* [40] nicht zu einer Verbesserung der Balanced Accuracy. Bei Verwendung von Differenzspektren wurde auch keine Verbesserung festgestellt, was durch die höhere Varianz von Differenzspektren erklärt werden kann.

Die *PN*-bzw. *nor*-Klassen dieser Studie bestanden aus wesentlich mehr Messungen im Vergleich zu den Klassen verdächtiger Läsionen. Zur Überprüfung, ob dies eine Auswirkung auf die Klassifikation hatte, wären höhere Fallzahlen der verdächtigen Läsionen notwendig,

was auch die 95%-CIs von 19.6% reduzieren würde. Obwohl die Studie von Lui *et al* mit 518 Probanden die größte *In-vivo*-Raman-Studie darstellte, wurden dennoch auch dort 95%-CIs von bis zu 18% angegeben [40].

Verbesserungspotential der vorliegenden Studie besteht in der direkten Zuordnung der Messpositionen zu den histopathologischen Befunden. Da die Messposition nicht direkt identifiziert werden konnte, wurden die 3 Spektren der verdächtigen Läsionen gemittelt und der histopathologischen Maximaldiagnose zugeordnet. Die Identifizierung der Messposition wäre bei Verwendung der IGRP erleichtert, auch wenn die Kolokalisation von Histopathologie und makroskopischen Hautbild schwierig ist. Die vorliegenden Ergebnisse haben jedoch die Inhomogenität der verdächtigen Läsionen gezeigt, was die Übereinstimmung der 3 Messungen mit der Maximaldiagnose für einzelne Messungen in Frage stellen kann.

Für das Hautkrebsscreening könnte dies durch eine bildgebende Modifizierung des Verfahrens optimiert werden. Rastermessungen mit einem Raman-Scanner haben sich z.B. in der Bestimmung von Gebärmutterhalskrebs *ex vivo* als geeignet erwiesen, die lange Messzeit machte dies jedoch für *In-vivo*-Messungen bislang untauglich [77,78]. Ein *in vivo* tauglicher Scanner wurde für intrinsische Fluoreszenz- und diffuse Reflexions Spektroskopie entwickelt, der Einsatz mittels Raman-Spektroskopie wurde jedoch noch nicht gezeigt [79]. Bildgebende Multiplex-RS könnte die Messzeiten signifikant verkürzen [80].

Literatur

1 Blum A, Rassner G, Garbe C. Modified ABC-point list of dermoscopy: A simplified and highly accurate dermoscopic algorithm for the diagnosis of cutaneous melanocytic lesions. *J Am Acad Dermatol* 2003;48:672-8.

2 Argenziano G, Soyer HP, Chimenti S, Talamini R, Corona R, Sera F, Binder M, Cerroni L, De Rosa G, Ferrara G, Hofmann-Wellenhof R, Landthaler M, Menzies SW, Pehamberger H, Piccolo D, Rabinovitz HS, Schiffner R, Staibano S, Stolz W, Bartenjev I, Blum A, Braun R, Cabo H, Carli P, De Giorgi V, Fleming MG, Grichnik JM. Dermoscopy of pigmented skin lesions: results of a consensus meeting via the Internet. *J Am Acad Dermatol* 2003;48:679-93.

3 Mogensen M, Jemec GBE. Diagnosis of nonmelanoma skin cancer/keratinocyte carcinoma: a review of diagnostic accuracy of nonmelanoma skin cancer diagnostic tests and technologies. *Dermatol Surg* 2007;33:1158-74.

4 Vestergaard ME, Macaskill P, Holt PE, Menzies SW. Dermoscopy compared with naked eye examination for the diagnosis of primary melanoma: a meta-analysis of studies performed in a clinical setting. *Br J Dermatol* 2008;159:669-76.

5 Rosendahl C, Cameron A, Argenziano G, Zalaudek I, Tschandl P, Kittler H. Dermoscopy of squamous cell carcinoma and keratoacanthoma. *Arch Dermatol* 2012;148:1386-92.

6 Kardynal A, Olszewska M. Modern non-invasive diagnostic techniques in the

detection of early cutaneous melanoma. *J Dermatol Case Rep* 2014;8:1-8.

7 Kittler H, Pehamberger H, Wolff K, Binder M. Diagnostic accuracy of dermoscopy. *Lancet Oncol* 2002;3:159-65.

8 Gniadecka M, Philipsen PA, Sigurdsson S, Wessel S, Nielsen OF, Christensen DH, Hercogova J, Rossen K, Thomsen HK, Gniadecki R, Hansen LK, Wulf HC. Melanoma diagnosis by Raman spectroscopy and neural networks: structure alterations in proteins and lipids in intact cancer tissue. *J Invest Dermatol* 2004;122:443-9.

9 Freedberg IM. *Fitzpatrick's dermatology in general medicine*. 6. ed. New York: McGraw-Hill, 2003:XXXIII, 1357, I-139.

10 Gniadecka M, Wulf HC, Nielsen OF, Christensen DH, Hercogova J. Distinctive molecular abnormalities in benign and malignant skin lesions: studies by Raman spectroscopy. *Photochem Photobiol* 1997;66:418-23.

11 Schleusener J, Reble C, Meinke MC, Helfmann J. Raman spectroscopy for the discrimination of cancerous and normal skin. *Photon Lasers Med* 2015;4:151-167.

12 Krafft C, Sergo V. Biomedical applications of Raman and infrared spectroscopy to diagnose tissues. *Spectroscopy* 2006;20:195-218.

13 Byrne H, Sockalingum G, Stone N. Raman Microscopy: Complement or Competitor. In: Moss D, ed. *Biomedical Applications of Synchrotron Infrared Microspectroscopy*. London: Royal Society of Chemistry, 2011:105-142.

14 Notingher I, Verrier S, Romanska H, Bishop AE, Polak JM, Hench LL. In situ characterisation of living cells by Raman spectroscopy. *Spectroscopy* 2002;16:43-51.

15 Motz JT, Hunter M, Galindo LH, Gardecki JA, Kramer JR, Dasari RR, Feld MS. Optical fiber probe for biomedical Raman spectroscopy. *Appl Opt* 2004;43:542-554.

16 Nijssen A, Koljenovic S, Bakker Schut TC, Caspers PJ, Puppels GJ. Towards oncological application of Raman spectroscopy. *J Biophotonics* 2009;2:29-36.

17 Nijssen A, Bakker Schut TC, Heule F, Caspers PJ, Hayes DP, Neumann MHA, Puppels GJ. Discriminating basal cell carcinoma from its surrounding tissue by Raman spectroscopy. *J Invest Dermatol* 2002;119:64-9.

18 Nijssen A, Maquelin K, Santos LF, Caspers PJ, Bakker Schut TC, den Hollander JC, Neumann MHA, Puppels GJ. Discriminating basal cell carcinoma from perilesional skin using high wave-number Raman spectroscopy. *J Biomed Opt* 2007;12:034004.

19 Lieber CA, Majumder SK, Billheimer D, Ellis DL, Mahadevan-Jansen A. Raman microspectroscopy for skin cancer detection in vitro. *J Biomed Opt* 2008;13:024013.

20 Philipsen PA, Knudsen L, Gniadecka M, Ravnbak MH, Wulf HC. Diagnosis of malignant melanoma and basal cell carcinoma by in vivo NIR-FT Raman spectroscopy is independent of skin pigmentation. *Photochem Photobiol Sci* 2013;12:770-6.

21 Lieber C, Mahadevan-Jansen A. Development of a handheld Raman microspectrometer for clinical dermatologic applications. *Opt Express* 2007;15:11874-82.

22 Keller MD, Kanter EM, Lieber CA, Majumder SK, Hutchings J, Ellis DL, Beaven RB, Stone N, Mahadevan-Jansen A. Detecting temporal and spatial effects of epithelial cancers with Raman spectroscopy. *Dis Markers* 2008;25:323-37.

23 Lieber CA, Majumder SK, Ellis DL, Billheimer DD, Mahadevan-Jansen A. In vivo nonmelanoma skin cancer diagnosis using Raman microspectroscopy. *Lasers Surg Med* 2008;40:461-7.

24 Mahadevan-Jansen A, Mitchell MF, Ramanujam N, Utzinger U, Richards-Kortum R. Development of a fiber optic probe to measure NIR Raman spectra of cervical tissue in vivo. *Photochem Photobiol* 1998;68:427-31.

25 Shim MG, Wilson BC, Marple E, Wach M. Study of Fiber-Optic Probes for in Vivo Medical Raman Spectroscopy. *Appl Spectrosc* 1999;53:619-627.

26 Bakker Schut TC, Witjes MJ, Sterenborg HJ, Speelman OC, Roodenburg JL, Marple ET, Bruining HA, Puppels GJ. In vivo detection of dysplastic tissue by Raman spectroscopy.

Anal Chem 2000;72:6010-8.

27 Crow P, Molckovsky A, Stone N, Uff J, Wilson B, WongKeeSong L. Assessment of fiberoptic near-infrared raman spectroscopy for diagnosis of bladder and prostate cancer. *Urology* 2005;65:1126-1130.

28 Day JCC, Bennett R, Smith B, Kendall C, Hutchings J, Meaden GM, Born C, Yu S, Stone N. A miniature confocal Raman probe for endoscopic use. *Phys Med Biol* 2009;54:7077-87.

29 Katagiri T, Yamamoto YS, Ozaki Y, Matsuura Y, Sato H. High axial resolution Raman probe made of a single hollow optical fiber. *Appl Spectrosc* 2009;63:103-7.

30 Magee ND, Villaumie JS, Marple ET, Ennis M, Elborn JS, McGarvey JJ. Ex vivo diagnosis of lung cancer using a Raman miniprobe. *J Phys Chem B* 2009;113:8137-41.

31 Mo J, Zheng W, Huang Z. Fiber-optic Raman probe couples ball lens for depth-selected Raman measurements of epithelial tissue. *Biomed Opt Express* 2010;1:17-30.

32 Latka I, Dochow S, Krafft C, Dietzek B, Bartelt H, Popp J. Development of a fiber-based Raman probe for clinical diagnostics. *Clinical and Biomedical Spectroscopy and Imaging II. Proceedings of SPIE-OSA Biomedical Optics*, 2011:80872D.

33 Praveen BB, Ashok PC, Mazilu M, Riches A, Herrington S, Dholakia K. Fluorescence suppression using wavelength modulated Raman spectroscopy in fiber-probe-based tissue analysis. *J Biomed Opt* 2012;17:077006-1-077006-6.

34 Almond LM, Hutchings J, Lloyd GR, Francis-Jones J, Stone N, Barr H, Kendall C. Preclinical evaluation of a Raman spectroscopic probe for endoscopic classification of oesophageal pathologies. *Biomedical Vibrational Spectroscopy V: Advances in Research and Industry. SPIE*, 2012:82190L.

35 Sharma M, Marple E, Reichenberg J, Tunnell JW. Design and characterization of a novel multimodal fiber-optic probe and spectroscopy system for skin cancer applications. *Rev Sci Instrum* 2014;85:083101.

36 Larraona-Puy M, Ghita A, Zoladek A, Perkins W, Varma S, Leach IH, Koloydenko AA, Williams H, Notingher I. Development of Raman microspectroscopy for automated detection and imaging of basal cell carcinoma. *J Biomed Opt* 2009;14:054031.

37 Short MA, Lui H, McLean D, Zeng H, Alajlan A, Chen XK. Changes in nuclei and peritumoral collagen within nodular basal cell carcinomas via confocal micro-Raman spectroscopy. *J Biomed Opt* 2006;11:34004.

38 Eikje NS, Aizawa K, Ozaki Y. Vibrational spectroscopy for molecular characterisation and diagnosis of benign, premalignant and malignant skin tumours. In: El-Gewely MR, ed. *Biotechnology Annual Review*. Amsterdam: Elsevier, 2005:191-225.

39 Zeng H, Zhao J, Short M, McLean DI, Lam S, McWilliams A, Lui H. Raman Spectroscopy for in vivo tissue analysis and Diagnosis, from Instrument development to clinical applications. *J Innov Opt Health Sci* 2008;01:95-106.

40 Lui H, Zhao J, McLean D, Zeng H. Real-time Raman spectroscopy for in vivo skin cancer diagnosis. *Cancer Res* 2012;72:2491-500.

41 Hata TR, Scholz TA, Ermakov IV, McClane RW, Khachik F, Gellermann W, Pershing LK. Non-invasive raman spectroscopic detection of carotenoids in human skin. *J Invest Dermatol* 2000;115:441-8.

42 Zhao J, Lui H, McLean D, Zeng H. Real-Time Raman Spectroscopy for Noninvasive in vivo Skin Analysis and Diagnosis. In: Campolo D, ed. *New Developments in Biomedical Engineering*. New York, NY: InTech, 2010:455 - 474.

43 Dochow S, Bergner N, Matthäus C, Praveen BB, Ashok PC, Mazilu M, Krafft C, Dholakia K, Popp J. Etaloning, fluorescence and ambient light suppression by modulated wavelength Raman spectroscopy. *Biomed Spectrosc Imaging* 2012;1:383 - 389.

44 Tfayli A, Piot O, Durlach A, Bernard P, Manfait M. Discriminating nevus and melanoma on paraffin-embedded skin biopsies using FTIR microspectroscopy. *Biochim*

Biophys Acta 2005;1724:262-9.

45 Sandby-Moller J, Poulsen T, Wulf HC. Epidermal thickness at different body sites: relationship to age, gender, pigmentation, blood content, skin type and smoking habits. *Acta Derm Venereol* 2003;83:410-3.

46 Bashkatov AN, Genina EA, Kochubey VI, Tuchin VV. Optical properties of human skin subcutaneous and mucous tissues in the wavelength range from 400 to 2000 nm. *J Phys D Appl Phys* 2005;38:2543.

47 Reble C, Gersonde I, Lieber CA, Helfmann J. Influence of tissue absorption and scattering on the depth dependent sensitivity of Raman fiber probes investigated by Monte Carlo simulations. *Biomed Opt Express* 2011;2:520-33.

48 Schleusener J, Reble C, Helfmann J, Gersonde I, Cappius H, Glanert M, Fluhr JW, Meinke MC. Design and technical evaluation of fibre-coupled Raman probes for the image-guided discrimination of cancerous skin. *Meas Sci Technol* 2014;25:035701.

49 Patil CA, Kirshnamoorthi H, Ellis DL, van Leeuwen TG, Mahadevan-Jansen A. A clinical instrument for combined raman spectroscopy-optical coherence tomography of skin cancers. *Lasers Surg Med* 2011;43:143-51.

50 Bonnier F, Mehmood A, Knief P, Meade AD, Hornebeck W, Lambkin H, Flynn K, McDonagh V, Healy C, Lee TC, Lyng FM, Byrne HJ. In vitro analysis of immersed human tissues by Raman microspectroscopy. *J Raman Spectrosc* 2011;42:888-896.

51 Reble C, Gersonde I, Andree S, Eichler HJ, Helfmann J. Quantitative Raman spectroscopy in turbid media. *J Biomed Opt* 2010;15:037016.

52 Salomatina E, Jiang B, Novak J, Yaroslavsky AN. Optical properties of normal and cancerous human skin in the visible and near-infrared spectral range. *J Biomed Opt* 2006;11:064026.

53 Werncke W, Latka I, Sassning S, Dietzek B, Darvin ME, Meinke MC, Popp J, König K, Fluhr JW, Lademann J. Two-color Raman spectroscopy for the simultaneous detection of chemotherapeutics and antioxidative status of human skin. *Laser Phys Lett* 2011;8:895-900.

54 Savitzky A, Golay MJE. Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures. *Anal Chem* 1964;36:1627-1639.

55 Schleusener J, Gluszczyńska P, Reble C, Gersonde I, Helfmann J, Fluhr JW, Lademann J, Röwert-Huber J, Patzelt A, Meinke MC. In vivo study for the discrimination of cancerous and normal skin using fibre probe based Raman spectroscopy. *Exp Dermatol* 2015, doi: 10.1111/exd.12768. (*Advance online publication*)

56 O'Connell RM, Vogel RA. Abel inversion of knife-edge data from radially symmetric pulsed laser beams. *Appl Opt* 1987;26:2528-32.

57 Schleusener J, Gluszczyńska P, Reble C, Gersonde I, Helfmann J, Cappius H, Fluhr JW, Meinke MC. Perturbation Factors on Clinical Handling of a Fiber-Coupled Raman Probe for the cutaneous in vivo diagnostic Raman spectroscopy. *Appl Spectrosc* 2015;69:243-256.

58 Barker M, Rayens W. Partial least squares for discrimination. *J Chemom* 2003;17:166-173.

59 Wehrens R, Putter H, Buydens L. The bootstrap: a tutorial. *Chemometr Intell Lab Syst* 2000;54:35-52.

60 Boechat AAP, Su D, Hall DR, Jones JDC. Bend loss in large core multimode optical fiber beam delivery systems. *Appl Opt* 1991;30:321-327.

61 Schrader B. Raman/infrared atlas of organic compounds. 2nd ed. Weinheim: VCH, 1989:1 v.

62 Huang Z, Lui H, Chen XK, Alajlan A, McLean DI, Zeng H. Raman spectroscopy of in vivo cutaneous melanin. *J Biomed Opt* 2004;9:1198-205.

63 Tseng S, Bargo P, Durkin A, Kollias N. Chromophore concentrations, absorption and scattering properties of human skin in-vivo. *Opt Express* 2009;17:14599-617.

64 Tseng S, Grant A, Durkin AJ. In vivo determination of skin near-infrared optical

properties using diffuse optical spectroscopy. *J Biomed Opt* 2008;13:014016.

65 Kollias N, Gillies R, Moran M, Kochevar IE, Anderson RR. Endogenous skin fluorescence includes bands that may serve as quantitative markers of aging and photoaging. *J Invest Dermatol* 1998;111:776-80.

66 Pence IJ, Vargis E, Mahadevan-Jansen A. Assessing variability of in vivo tissue Raman spectra. *Appl Spectrosc* 2013;67:789-800.

67 Oliveira AFd, Santos IDdAO, Cartaxo SB, Bitar RA, Enokihara MMSes, Martinho HdS, Martin AA, Ferreira LM. Differential diagnosis in primary and metastatic cutaneous melanoma by FT-Raman spectroscopy. *Acta Cir Bras* 2010;25:434-9.

68 Sterenborg HJCM, Motamedi M, Wagner RF, Jr Duvic M, Thomsen S, Jacques SL. In vivo fluorescence spectroscopy and imaging of human skin tumours. 1994;9:191-201.

69 Brancalion L, Durkin AJ, Tu JH, Menaker G, Fallon JD, Kollias N. In vivo fluorescence spectroscopy of nonmelanoma skin cancer. *Photochem Photobiol* 2001;73:178-83.

70 Panjehpour M, Julius CE, Phan MN, Vo-Dinh T, Overholt S. Laser-induced fluorescence spectroscopy for in vivo diagnosis of non-melanoma skin cancers. *Lasers Surg Med* 2002;31:367-73.

71 Leupold D, Scholz M, Stankovic G, Reda J, Buder S, Eichhorn R, Wessler G, Stucker M, Hoffmann K, Bauer J, Garbe C. The stepwise two-photon excited melanin fluorescence is a unique diagnostic tool for the detection of malignant transformation in melanocytes. *Pigment Cell Melanoma Res* 2011;24:438-45.

72 Cicchi R, Cosci A, Rossari S, Kapsokalyvas D, Baria E, Maio V, Massi D, De Giorgi V, Pimpinelli N, Saverio Pavone F. Combined fluorescence-Raman spectroscopic setup for the diagnosis of melanocytic lesions. *J Biophotonics* 2013;7:86-95.

73 Wang S, Zhao J, Lui H, He Q, Zeng H. In vivo near-infrared autofluorescence imaging of pigmented skin lesions: methods, technical improvements and preliminary clinical results. *Skin Res Technol* 2013;19:20-6.

74 Calin MA, Parasca SV, Savastru R, Calin MR, Dontu S. Optical techniques for the noninvasive diagnosis of skin cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2013;139:1083-104.

75 Shim MG, Song LM, Marcon NE, Wilson BC. In vivo near-infrared Raman spectroscopy: demonstration of feasibility during clinical gastrointestinal endoscopy. *Photochem Photobiol* 2000;72:146-50.

76 Molckovsky A, Song LWK, Shim MG, Marcon NE, Wilson BC. Diagnostic potential of near-infrared Raman spectroscopy in the colon: differentiating adenomatous from hyperplastic polyps. *Gastrointest Endosc* 2003;57:396-402.

77 Reble C, Gersonde I, Dressler C, Helfmann J, Kühn W, Eichler HJ. Evaluation of Raman spectroscopic macro raster scans of native cervical cone biopsies using histopathological mapping. *J Biomed Opt* 2014;19:027007.

78 Dressler C, Reble C, Schleusener J, Gersonde I. Detection of Suspicious Tissue Lesions. *Optik & Photonik* 2014;9:30.

79 Yu C, Lau C, O'Donoghue G, Mirkovic J, McGee S, Galindo L, Elackattu A, Stier E, Grillone G, Badizadegan K, Dasari RR, Feld MS. Quantitative spectroscopic imaging for non-invasive early cancer detection. *Opt Express* 2008;16:16227-16239.

80 Schmäzlin E, Stolz M, Moralejo B, Adelhelm S, Roth MM. Bildgebende Ramanspektroskopie ohne schrittweises Abtasten der Probe. *BioPhotonik* 2014;2. (Accessed June 17, 2015, at <http://www.photonik.de/bildgebende-ramanspektroskopie-ohne-schrittweises-abtasten-der-probe/150/21380/274320>.)

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Johannes Schleusener, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Erstellung und Evaluation eines Raman-spektroskopischen Messkopfs zur Analyse von Hauttumoren und Auswertung von klinischen Studiendaten“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

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

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

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

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen

Johannes Schleusener hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1:

Schleusener J, Reble C, Helfmann J, Gersonde I, Cappius H-J, Glanert M, Fluhr JW, Meinke MC. Design and Technical Evaluation of Fibre-Coupled Raman Probes for the Image-Guided Discrimination of Cancerous Skin. *Meas Sci Technol* 2014;25:035701.

Eigenanteil: 80 Prozent

Beitrag im Einzelnen: Literaturrecherche, Konzeption, Entwicklung, Aufbau und Erprobung der experimentellen Versuchsanordnung, Datenerhebung, Datenauswertung, Interpretation, Entwurf und Revision des Manuskripts.

Publikation 2:

Schleusener J, Gluszczyńska P, Reble C, Gersonde I, Helfmann J, Cappius, H-J, Fluhr JW, Meinke MC. Perturbation Factors in the Clinical Handling of a Fiber-Coupled Raman Probe for Cutaneous In Vivo Diagnostic Raman Spectroscopy. *Appl Spectrosc* 2015;69:243-256.

Eigenanteil: 80 Prozent

Beitrag im Einzelnen: Literaturrecherche, Konzeption, Entwicklung, Aufbau und Erprobung der experimentellen Versuchsanordnung, Datenerhebung, Datenauswertung, Interpretation, Entwurf und Revision des Manuskripts.

Publikation 3:

Schleusener J, Gluszczyńska P, Reble C, Gersonde I, Helfmann J, Fluhr JW, Lademann J, Röwert-Huber J, Patzelt A, Meinke MC. *In vivo* study for the discrimination of cancerous and normal skin using fibre probe based Raman spectroscopy. *Exp Dermatol* 2015, doi: 10.1111/exd.12768. (*Advance online publication*)

Eigenanteil: 40 Prozent

Beitrag im Einzelnen: Literaturrecherche, Konzeption, Entwicklung, Aufbau und Erprobung der experimentellen Versuchsanordnung, Datenerhebung, Datenauswertung, Interpretation, Entwurf und Revision des Manuskripts.

Unterschrift, Datum und Stempel der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden

Publikationen

Um Veröffentlichungsrechte nicht zu verletzen, werden die der Promotion zugrundeliegenden Publikationen nicht im Volltext aufgeführt.

Publikation 1

Schleusener J, Reble C, Helfmann J, Gersonde I, Cappius H-J, Glanert M, Fluhr JW, Meinke MC. Design and Technical Evaluation of Fibre-Coupled Raman Probes for the Image-Guided Discrimination of Cancerous Skin. Meas Sci Technol 2014;25:035701.

<http://dx.doi.org/10.1088/0957-0233/25/3/035701>

Publikation 2

Schleusener J, Gluszczyńska P, Reble C, Gersonde I, Helfmann J, Cappius, H-J, Fluhr JW, Meinke MC. Perturbation Factors in the Clinical Handling of a Fiber-Coupled Raman Probe for Cutaneous In Vivo Diagnostic Raman Spectroscopy. *Appl Spectrosc* 2015;69:243-256.

<http://dx.doi.org/10.1366/14-07482>

Publikation 3

Schleusener J, Gluszczyńska P, Reble C, Gersonde I, Helfmann J, Fluhr JW, Lademann J, Röwert-Huber J, Patzelt A, Meinke MC. *In vivo* study for the discrimination of cancerous and normal skin using fibre probe based Raman spectroscopy. *Exp Dermatol* 2015, doi: 10.1111/exd.12768. (*Advance online publication*)

<http://dx.doi.org/10.1111/exd.12768>

Lebenslauf

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

Publikationsliste

Journals

1 Schleusener J, Gluszczyńska P, C Reble, Gersonde I, Helfmann J, Fluhr JW, Lademann J, Röwert-Huber J, Patzelt A, Meinke MC. *In vivo* study for the discrimination of cancerous and normal skin using fibre probe based Raman spectroscopy. *Exp Dermatol* 2015, doi: 10.1111/exd.12768. (*Advance online publication*)

2 Schleusener J, Reble C, Meinke MC, Helfmann J. Raman spectroscopy for the discrimination of cancerous and normal skin. *Photon Lasers Med* 2015;4: 151-167.

3 Schleusener J, Gluszczyńska P, Reble C, Gersonde I, Helfmann J, Cappius, H-J, Fluhr JW, Meinke MC. Perturbation Factors on Clinical Handling of a Fiber-Coupled Raman Probe for the cutaneous *in vivo* diagnostic Raman spectroscopy. *Appl Spectrosc* 2015;69:243-256.

4 Dressler C, Reble C, Schleusener J, Gersonde I. Detection of Suspicious Tissue Lesions - Raman spectroscopy (RS) provides the chance for future clinical see-and-treat approaches. *Optik & Photonik* 2014;9: 30-33.

5 Schleusener J, Reble C, Helfmann J, Gersonde I, Cappius H-J, Glanert M, Fluhr JW, Meinke MC. Design and Technical Evaluation of Fibre-Coupled Raman Probes for the Image-Guided Discrimination of Cancerous Skin. *Meas Sci Technol* 2014;25:035701.

6 Schleusener J, Helfmann J, Beckers I. Erstellung und Evaluation eines kompakten Ramanspektroskopischen Messkopfs zur Analyse von Präkanzerosen der menschlichen Haut. In: Gross M, von Klinski S, Joneleit H, eds. *ExzellenzTandem - Wissenstransfer im Dialog V*. Berlin: Beuth Hochschule für Technik Berlin, 2012:62-65.

Konferenzbeiträge

1 Schleusener J, Reble C, Gersonde I, Gluszczyńska P, Helfmann J, Meinke MC, Fluhr JW. Fiber coupled *in vivo* Raman spectroscopy for the Discrimination of Cancerous and normal Skin. In: SPEC "Shedding New Light on Disease. 2014. Krakau, Polen. O13.

2 Schleusener J, Reble C, Helfmann J, Gersonde I, Dressler C. Raman spectroscopy for Tumor diagnosis. In: International Conference on Laser Applications in Life Sciences (LALS). 2014. Ulm.

3 Schleusener J, Reble C, Helfmann J, Gersonde I, Glanert M, Cappius H-J, Fluhr JW, Meinke MC. Evaluation of fiber coupled Raman probes for the discrimination of cancerous and normal skin tissue in vivo. In: European Conferences on Biomedical Optics (ECBO). 2013. München. ETh3A.6.

4 Schleusener J, Reble C, Gersonde I, Helfmann J, Cappius H-J, Meinke MC, Fluhr JW. Evaluierung fasergekoppelter Raman-Sonden für die Diskriminierung von kanzerösen und normalem Hautgewebe: Erste klinische Ergebnisse. In: 27. Treffpunkt Medizintechnik - Minimal-invasive Medizin Technik und Methoden. 2013. Berlin.

5 Schleusener J, Reble C, Helfmann J, Gersonde I, Cappius H-J, Fluhr J, Meinke MC. Design and evaluation of fiber coupled Raman probes with integrated video imaging for the discrimination of cancerous and normal skin tissue. In: SPEC "Shedding New Light on Disease". 2012. Chiang Mai, Thailand. P61.

6 Rohlmann A, Zander T, Schleusener J, Dymke J, Graichen F, Bergmann G. Einfluss des Sitzmöbels auf die Belastung der Wirbelsäule. In: Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie. 2010. Berlin. PO17-569.

7 McGee DJ, Schleusener J, Saito Y, Gopalan P. Nonlinear Optical Characterization of Chromophore-functionalized POSS Nanoparticles in a Polymeric Host. In: Conference on Lasers and Electro-Optics, Optical Society of America (OSA). 2012. San Jose, USA. CF1A.5.

Danksagung

Ich möchte diese Gelegenheit nutzen und mich bei allen bedanken die mich im Laufe meiner Promotionsphase unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt allen Beteiligten des RaDiag-Derma-Projektes, sowohl auf Seiten der Laser- und Medizin-Technologie GmbH, Berlin, als auch auf Seiten der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Charité.

Ich danke meiner Promotionsbetreuerin PD Dr Martina C. Meinke, die mir während des Projektes stets mit hilfreichen Ratschlägen zur Seite stand und geholfen hat, den roten Faden nicht zu verlieren.

Des Weiteren danke ich Dr Carina Reble, Dr Jürgen Helfmann, Dr Ingo Gersonde und Hans-Joachim Cappius, die mich in weiten Teilen der Projektdurchführung unterstützt haben und geholfen haben einen unverzichtbaren Rahmen abzugrenzen. Mein Dank gilt Stefan Ey und Lutz Krebs, die für die Realisierung des Messaufbaus bemerkenswerten Einsatz gezeigt haben. Maresa Glanert danke ich für die Beisteuerung wichtiger Messdaten.

Für die Durchführung der klinischen Studie danke ich dem Prüfarzt PD Dr Joachim W. Fluhr, Dr Alexa Patzelt und Patrycja Gluszczyńska. Für die histopathologische Befundung danke ich Dr Joachim Röwert-Huber.

Des Weiteren möchte ich mich bei dem medizinischen- und beim Pflegepersonal der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Charité für die Unterstützung bedanken.

Mein besonderer Dank gilt allen Freiwilligen, die sich zur Teilnahme an der klinischen Erprobung bereit erklärt haben.

Ich danke weiterhin Prof Dr Ingeborg Beckers für die promotionsvorbereitende Unterstützung. Meine promotionsvorbereitenden Tätigkeiten wurden zu Teilen durch das ExzellenzTandem der Beuth Hochschule für Technik, Berlin aus Stipendiengeldern des Berliner Senats sowie der EU (ESF) ermöglicht. Hierfür möchte ich ausdrücklich danken.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei allen bedanken, die mich in meinem privaten Umfeld unterstützt haben.