

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

# DISSERTATION

## Prospektive In-vivo-Studie zum Einsatz der Raman-Spektroskopie für die Tumordiagnostik in der Dermatologie

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Patrycja Głuszczyńska,  
geborene Leśniewska

aus Stargard (Polen)

Datum der Promotion: 13.12.2019

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	1
Abkürzungsverzeichnis .....	4
Abstract .....	6
1 Einleitung .....	9
1.1 Motivation .....	9
1.2 Zielsetzung .....	9
1.3 Hautaufbau und Hautinhomogenität .....	10
1.4 Hauttumore .....	13
1.4.1 Basalzellkarzinom .....	13
1.4.2 Plattenepithelkarzinom .....	15
1.4.3 Malignes Melanom .....	16
1.5 Die Wechselwirkung von Licht und Gewebe .....	19
1.6 Der Raman-Effekt/Raman-Spektroskopie .....	21
1.7 Andere nichtinvasive Messmethoden zur Diagnostik von Hauttumoren .....	24
2 Methoden .....	26
2.1 Raman-spezifischer Messaufbau .....	26
2.2 Das Studiendesign .....	28
2.3 Messvorgang und Datenerhebung .....	29
2.4 Datenverarbeitung .....	31
2.4.1 Spektrenvorverarbeitung .....	32
2.4.2 Der gepaarte $t$ -Test .....	33
2.4.3 Hauptkomponentenanalyse .....	34
2.4.4 PLS-DA .....	35
2.4.5 Die Datenauswertung .....	36

2.5 Voruntersuchungen .....	38
2.5.1 Faserbiegung .....	38
2.5.2 Veränderung der Umlichtintensität .....	38
2.5.3 Veränderung des Anpressdrucks .....	39
2.5.4 Körperbehaarung .....	39
2.5.5 Sonnenexposition .....	40
2.5.6 Hautunterschiede an verschiedenen Körperstellen.....	40
2.5.7 Hautinhomogenität auf dem zellulären Niveau.....	41
2.5.8 Hautvorbehandlung .....	41
2.5.9 Wasserimmersion .....	42
2.6 Ergebnisse der Voruntersuchungen.....	42
3 Ergebnisse .....	44
3.1 Histologische Befunde .....	44
3.2 Vergleich der histologischen Befunde mit den statistischen Ergebnissen .....	49
3.2.1 Raman-Spektren in der RaDiag-Studie .....	49
3.2.2 Differenzierung des Malignen Melanoms.....	52
3.2.3 Differenzierung des Basalzellkarzinoms und des Plattenepithelkarzinoms.....	54
3.2.4 Die Differenzierungen aller Tumorgruppen untereinander.....	56
4 Diskussion .....	57
4.1 Beurteilung der SCC- und BCC-Ergebnisse .....	57
4.2 Beurteilung der MM-Ergebnisse .....	57
4.3 Einfluss der Spektrenanzahl auf das Ergebnis .....	58
4.4 Inhomogenität von Hauttumoren.....	59
4.5 Vergleich mit anderen Studien .....	59
4.5.1. <i>In-vitro</i> -Studien .....	60
4.5.2 <i>In-vivo</i> -Studien .....	64
4.5.3 Kombinierte Messverfahren .....	67

## Inhaltsverzeichnis

---

4.6 Die Störfaktoren bei dem Messvorgang und Fehleranalyse.....	71
4.7 Integration nichtinvasiver diagnostischer Methoden in den Praxisalltag.....	73
4.8 Die Stärken und Herausforderungen der Raman-Spektroskopie .....	74
5. Zusammenfassung .....	76
5.1 RaDiag-Studie .....	76
5.2 Der Ausblick in die Zukunft.....	77
6 Literaturverzeichnis.....	78
7 Abbildungsverzeichnis .....	85
8 Tabellenverzeichnis.....	86
9 Publikationen.....	87
10 Anteilserklärung an erfolgten Publikationen.....	88
11 Lebenslauf .....	89
12 Eidesstattliche Erklärung.....	90
13 Danksagung .....	91

## Abkürzungsverzeichnis

µm	Mikrometer
A.	Arteria
Abb.	Abbildung
AP	Alkalische Phosphatase
BAC	balanced accuracy
BB	Blutbild
BCC	Basalzellkarzinom
BSG	Blutsenkungsreaktion
Bsp.	Beispiel
bzw.	Beziehungsweise
ca.	circa
CCD	charge-coupled device
CCM	Charité Campus Mitte
Cm	Zentimeter
CT	Computertomographie
d. h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
et al.	et alii
ggf.	gegebenenfalls
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
in situ	ursprüngliche Position im Körper
in vitro	außerhalb des lebenden Organismus
in vivo	in einem lebenden Organismus
Kg	Kilogramm
LDH	Lactatdehydrogenase
LED	Leuchtdiode
m <sup>2</sup>	Quadratmeter
MM	Malignes Melanom
MRT	Magnetresonanztomographie

## Abkürzungsverzeichnis

---

mW	Milliwatt
PCA	Principal Component Analysis
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PLS-DA	Partial least squares discriminant analysis
RS	Raman-Spektroskopie
S	Sekunde
s.	siehe
SCC	Spinaliom
sog.	sogenannt
UV	Ultraviolett
z. B.	zum Beispiel

## Abstract

Angesichts der weltweit steigenden Inzidenz von malignen Hauttumoren ist es notwendig, die auffälligen Läsionen möglichst im Frühstadium zu identifizieren und zu behandeln sowie die Anzahl von unnötigen Exzisionen zu reduzieren. Das in der vorliegenden Studie verwendete Messgerät, dem die Raman-Spektroskopie als Detektionsmethode zugrunde liegt, stellt eine vielversprechende Unterstützung der klassischen Exzisionsbiopsie mit anschließender histologischer Befundung dar. Die Eignung der Raman-Spektroskopie für diagnostische Zwecke in der Humanmedizin wurde bereits in zahlreichen Studien unter Beweis gestellt. Die Detektion der Schwingungszustände der Moleküle im untersuchten Hautareal beinhaltet chemische Informationen über die Zusammensetzung des Gewebes, die eine Zuordnung ermöglicht, ob es sich um eine benigne oder maligne Läsion handelt. Dank der aufwendigen Entwicklung eines beweglichen fasergekoppelten Raman-Messkopfes im Vorfeld der Studie war es möglich, eine Messung nicht-invasiv und direkt am Patienten durchzuführen. Um die Machbarkeit dieses Verfahrens in der klinischen Anwendung zu verifizieren, wurde in der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin am Campus Mitte eine prospektive *In-vivo*-Studie mit dem Titel „Prospektive In-vivo-Studie zum Einsatz der Ramanspektroskopie für die Tumordiagnostik in der Dermatologie“, kurz RaDiag Derma-Studie, nach dem Medizinproduktegesetz (MPG) durchgeführt. Hierfür wurden durch erfahrene Dermatologen im Rahmen der regulären Tumorsprechstunde Patienten mit Verdachtsdiagnosen Malignes Melanom (MM), Basalzellkarzinom (BCC) und Plattenepithelkarzinom (SCC) sorgfältig vorausgewählt und präoperativ freiwillig der Messung mit dem RaDiag-Messgerät unterzogen. Insgesamt haben an der Studie 113 Patienten teilgenommen. Davon wurden die Daten von 104 Patienten wie folgt ausgewertet: 33 Patienten mit Verdachtsdiagnose MM, 44 BCCs und 27 SCCs. Alle exzidierten Läsionen wurden histologisch befundet. Darüber hinaus wurden bei weiteren freiwilligen Probanden 67 pigmentierten Nävi gemessen, die nach einer ärztlichen visuellen Inspektion keiner Exzision bedurften. Die Verdachtsdiagnose wurde bei 23 MM-, 35 BCC- und 22 SCC-Patienten bestätigt. Die Messwerte wurden mittels chemometrischen Methoden (Partial least squares-discriminant analysis, kurz PLS-DA) klassifiziert. Die Auswertung der Ergebnisse der Raman-Methode bezog sich auf den histologischen Goldstandard. Demnach konnte MM mit Sensitivität von 87% und Spezifität von 94% bestimmt werden. Die höchsten Werte der Sensitivität und Spezifität von SCC betragen jeweils 86% und 87%, sowie für BCC 63% und

83%. Die Ergebnisse der RaDiag-Studie sind mit ähnlichen *In-vivo*-Studien vergleichbar. Die Raman-Spektroskopie scheint in absehbarer Zukunft eine aussichtsreiche nichtinvasive und schmerzfreie diagnostische Methode zu sein. Eine Kombination der Raman-Spektroskopie mit anderen nichtinvasiven Verfahren bietet einen sinnvollen Ansatz für die Erhöhung der diagnostischen Genauigkeit.



When considering the rising incidence of malignant skin tumours worldwide, it is necessary to identify the noticeable lesions preferably in the early stages, to be able to treat them as well as to reduce the number of unnecessary excisions. The detection method used in the present study, which is based on Raman spectroscopy, shows a promising supporting method to the standard clinical procedure, which consists of excision followed by histological findings. The application of Raman spectroscopy for diagnostic purposes in human medicine has already been successfully proven in numerous studies. The detection of the vibrational modes of the molecules in the examined skin area provides chemical information on the composition of the tissue to conclude whether the lesion is a benign or malignant. Due to the elaborate development of a portable fiber-coupled Raman handheld probe before the study, it was possible to carry out a real-time measurement directly on the patients. To verify the feasibility of this procedure within clinical application in the Department of Dermatology, Venereology and Allergology at the Charité University Campus Mitte in Berlin carried out a prospective study “*In vivo* study for the discrimination of cancerous and normal skin using fibre probe-based Raman spectroscopy” with compliance to German medicine product law. The patients with the suspected diagnosis malignant melanoma (MM), basal cell carcinoma (BCC) and squamous cell carcinoma (SCC) were preselected by experienced dermatologists during the tumour consultation hours and were preoperatively measured with the RaDiag Raman fiber probe. 113 patients participated in the study, the data of 104 patients was evaluated: 33 MMs, 44 BCCs, 27 SCCs. All suspicious lesions were histologically examined. In addition, 67 pigmented nevi from other volunteers were measured, but needed no excision. The suspected diagnoses were confirmed by 23 MMs, 35 BCCs and 22 SCCs patients. The measured data was classified employing Partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA). The interpretation of the results of the Raman-Method is based on the histological gold standard. Thus determined MM with sensitivity of 87% and specificity of 94%. The highest results for sensitivity and specificity for SCC were 86% and 87% and for BCC 63% and 83%. The results of the RaDiag study are comparable with similar *in-vivo* studies. The Raman spectroscopy seems to be a promising non-invasive and painless diagnostic method in the foreseeable future. Raman spectroscopy in combination with other non-invasive procedures offers a useful approach in allowing the increase of diagnostic accuracy.

# 1 Einleitung

## 1.1 Motivation

Diese Arbeit befasst sich mit der Anwendung und Überprüfung der Machbarkeit eines Raman-spektroskopischen Messsystems bei der nichtinvasiven Früherkennung der Hauttumore Malignes Melanom, Basalzellkarzinom und Plattenepithelkarzinom. Die Hauttumore gehören zur Gruppe der häufigsten Tumorerkrankungen beim Menschen. In Deutschland ist die Inzidenz des Malignen Melanoms seit den siebziger Jahren des letzten Jahrhunderts um das Fünffache gestiegen und betraf 2013 ca. 10.500 Frauen und 10.900 Männer. Seitdem das Haut-Screening 2008 in den Leistungskatalog der gesetzlichen Krankenversicherung aufgenommen wurde, konnte man einen weiteren Anstieg der Neuerkrankten beobachten; dabei wurden besonders viele der Frühformen des dunklen Hautkrebses diagnostiziert. Das MM verursacht ca. 1% der Krebstodesfälle in der Bundesrepublik. Viel höhere Inzidenzraten gelten für die nicht-melanozytären Hauttumore und betragen ca. 213.000 Krankheitsfälle, davon ca. 77% an Basaliom und ca. 22% an Plattenepithelkarzinom Erkrankten (Barnes et al., 2016). Bis jetzt fehlen die nichtinvasiven diagnostischen Methoden, die mit hoher Wahrscheinlichkeit maligne oder semimaligne Hauttumoren von benignen Läsionen und Nävi unterscheiden, was entscheidend für die weiteren Therapiemaßnahmen ist. Die Möglichkeit eines schnellen und nichtinvasiven Messvorgangs bietet ein Lasermessgerät auf der Basis der Raman-Spektroskopie (RS). Dieses hat gegenüber bisherigen Standardverfahren viele Vorteile wie eine Objektivität, die auf den gemessenen Raman-Spektren basiert; die Messungen und Auswertung passieren binnen weniger Minuten und dieser Vorgang kann von einer Person durchgeführt werden. Die Notwendigkeit der Probeexzisionen wird reduziert, wodurch künftig das Zuschalten eines pathologischen Labors zwecks der diagnostischen Verfahren seltener benötigt wird, was auch aus ökonomischer Sicht ein wesentlicher Faktor ist.

## 1.2 Zielsetzung

Um die Machbarkeit und Anwendbarkeit dieses Verfahrens klinisch zu überprüfen, wurde eine prospektive *In-vivo*-Studie nach dem Medizinproduktegesetz (MPG) zum Einsatz der Raman-Spektroskopie für die Hauttumordiagnostik (Kurztitel der Studie: RaDiag Derma) in der

Zusammenarbeit der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie Charité - Universitätsmedizin Berlin Campus Mitte mit der Laser- und Medizin-Technologie GmbH Berlin durchgeführt. Es wurden bereits zahlreiche Studien durchgeführt, in denen die Ramanspektroskopie in vielen medizinischen Bereichen angewendet wurde und sich als vielversprechende nichtinvasive diagnostische Methode erwiesen hat, z. B. bei Arteriosklerose (Silveira et al., 2002, Marzec et al., 2015), Brustkrebs (Haka et al., 2006), im Urogenitalbereich (Stone et al., 2007, Shaikh et al., 2016), im Magen-Darm-Trakt (Ouyang et al., 2015, Huang et al., 2010) oder im Mundhöhlenbereich (Xue et al., 2013, Singh et al., 2012). Auch an der Charité in der Abteilung für Gynäkologie am Campus Benjamin Franklin wurden in einer *Ex-vivo*-Studie mit einem ähnlichem Messsystem, das in der RaDiag Derma-Studie verwendet wurde, die Sensitivität von 91% und die Spezifität von 81% bei der Messung der Cervix-Präkanzerosen (Reble et al., 2014) erzielt.

Seit den neunziger Jahren des 20. Jhdts. wird über die RS im dermatologischen Bereich geforscht (Gniadecka, 1997). In der Literatur wurden bereits viele Studien sowohl mit der *In-vitro*- als auch *In-situ*-Anwendung beschrieben (Zeng et al., 2008, Keller et al., 2008, Lieber et al., 2008b, Nijssen et al., 2007, Gniadecka et al., 2004, Nijssen et al., 2002, Hata et al., 2000).

### **1.3 Hautaufbau und Hautinhomogenität**

Die Haut stellt mit einer Gesamtfläche von ca. 1,5 bis 2 m<sup>2</sup> und einem Gewicht von 3,5 bis 10 kg eines der größten Organe des menschlichen Körpers dar (Moll, 2010). Eine intakte Haut schützt den Körper vor Austrocknung, gewährt Schutz vor Umwelteinflüssen, z. B. vor mechanischen und chemischen Einwirkungen und Sonnenstrahlen. Sie stellt eine Barriere gegen Pathogene und Allergene dar, kann Wirkstoffe resorbieren und übernimmt die Funktion der Thermoregulation, indem das Zusammenspiel von Schweißdrüsen und Vasokonstriktion oder Vasodilatation die konstante Körpertemperatur gewährleistet; sie ist auch an der Sinneswahrnehmung beteiligt (Sterry, 2011).

Die Haut besteht von außen nach innen aus den folgenden Schichten: Epidermis, Dermis und Subkutis, die miteinander fest verbunden sind. Zu der Haut gehören auch Hautanhangsgebilde (sog. Adnexe), die in Epidermis und Dermis gebildet werden. Die Epidermis besteht aus einem

mehrschichtigen, verhornten Plattenepithel, wo neben Melanozyten, Langerhans-Zellen, Merkel-Zellen und Lymphozyten die Keratinozyten mit über 90% die häufigste Zellart bilden. Histologisch kann man von innen nach außen folgende Strukturen der Epidermis unterscheiden:

- Das **Stratum basale** besteht aus kubischen Basalzellen, die an die Basalmembran angrenzen. In dieser Schicht befinden sich die Stammzellen, die eine entscheidende Rolle bei der terminalen epidermalen Differenzierung spielen.
- Im **Stratum spinosum** befinden sich die großen polygonalen Keratinozyten, die mehrschichtig auftreten und durch viele stachelartige Interzellularbrücken, sog. Desmosomen, verbunden sind.
- Im **Stratum granulosum** bilden die abgeflachten Körnerzellen eine bis mehrere Schichten. Ihre Zellen enthalten wichtige Strukturproteine der Hornschicht, sog. basophile Keratohyalingranula.
- Die oberste Schicht, das **Stratum corneum**, besteht aus kernlosen, flachen Hornzellen. An den Fußsohlen und Handinnenflächen ist sie besonders stark ausgeprägt.

Die epidermale Basalmembran setzt sich aus Lamina lucida und Lamina densa zusammen, wobei letztere sich über Reteleisten und Verankerungsfibrillen mit der Dermis verzahnt. Dieser Verbund wird als dermoepidermale Junctionszone bezeichnet. Die Dermis besteht aus:

- Einem zahlreichen **Stratum papillare**, das mit Kollagenfasern und elastischen Fasern durchflochten ist. Hier sind auch viele Kapillaren und Lymphgefäße vorzufinden.
- Einem **Stratum reticulare**, in dem die Haare, Talg- und Schweißdrüsen in einem Netz aus elastischen und Kollagenfasern eingebettet sind.

Die unterste, subkutische Schicht besteht aus Fett- und Bindegewebszellen und grenzt an Muskelgewebe (Moll, 2010, Sterry, 2011).

Die Epidermisdicke variiert von 30 bis 500 µm, an Handinnenseiten oder Fußsohlen kann sie sogar mehrere mm betragen. Krackowizer and Brenner (2008) haben bei ihrer Studienpopulation definierte Messpunkte am ganzen Körper verteilt und die Epidermisdicke mittels Ultraschallmessung bestimmt; die höchsten Epidermiswerte wurden am Thorax

gemessen, dünner ist die Epidermisdicke bei den Extremitäten ausgefallen; die dünnsten Stellen wurden an Hand- und Fußaußenflächen gemessen (Gesicht war ausgenommen). Erwartungsgemäß ergaben sich signifikante Werteunterschiede zwischen erwachsenen Frauen und Männern. Die Epidermisdicke wies bei den Männern höhere Werte auf. Unterschiedliche Hautdickemessungen an verschiedenen Körperstellen haben auch Sandby-Møller et al. (Sandby-Møller et al., 2003) beobachtet. Der Tabakkonsum trägt zur verfrühten Hautalterung, verschiedenen Dermatosen und Ulzera bei (Ortiz and Grando, 2012). Die Epidermisdicke kann sowohl von physiologischen als auch von pathologischen Ereignissen im Körper sowie durch Medikamenteneinnahme beeinflusst werden. Während des Menstruationszyklus nimmt die Epidermis aufgrund des steigenden Östrogenspiegels zu (Raghunath et al., 2015). Ältere Patienten haben grundsätzlich dünnere Haut als junge Erwachsene (Sator et al., 2001, Tuohimaa, 2009). Sowohl bei oraler als auch inhalativer Glucocorticoideinnahme tritt die Hautatrophie aufgrund der Hemmung der Proliferation von Epithelzellen als Nebenwirkung auf (Sterry, 2011); diese ist auch bei Störungen des endokrinen Systems, z. B. bei Cushing-Syndrom und Diabetes mellitus, eine Begleiterscheinung. Atrophische Hautkrankheiten sind ebenfalls durch verminderte Hautdicke charakterisiert (Sterry, 2011).

Die Haarfollikel sind in der Epidermis, der Dermis und der obersten Subkutisschicht lokalisiert. Mit Ausnahme von Palmae, Plantae, Schleimhäuten und Mamillen sind die sog. Vellushaare über den ganzen Körper verteilt. Während der Pubertät verwandeln sich die Vellushaare an vielen Körperstellen durch den hormonellen Einfluss in stark pigmentierte, dickere und längere Terminalhaare (Sterry, 2011). Da Haarfollikel im Detektionsbereich der Raman-spektroskopischen Messung liegen und möglicherweise eine Messstörung verursachen können, ist die Information über ihre Verteilung am Körper von Bedeutung. Otberg et al. (2004) haben die Verteilung von Haarfollikeln an verschiedenen Körperstellen untersucht und festgestellt, dass die seitliche Stirnregion die höchste Follikeldichte aufweist. Mit deutlich weniger Dichte schnitten Rücken, Thorax, und Extremitäten ab. Die Verteilung der Follikeldichte explizit im Gesicht liegt in der Nasenregion am höchsten: die meisten wurden in den Nasenflügeln und der Nasenspitze gezählt, gefolgt von präauriculärer Region und seitlicher Stirn (Pagnoni et al., 1994).

## 1.4 Hauttumore

### 1.4.1 Basalzellkarzinom

Das Basalzellkarzinom (BCC), auch als Basaliom bezeichnet, ist ein lokal langsam infiltrierend und destruierend wachsender Tumor. Er leitet sich von einer epidermalen Stammzelle des Basalzellagers ab, die die Fähigkeit zur Bildung von Adnexstrukturen besitzt („primordiale“ Haarfollikelkeime). Da diese Tumorart nur selten metastasiert, wird sie als semimaligne bezeichnet. Das BCC ist der häufigste Hauttumor und sein Anteil bei nichtmelanozytären Tumoren beläuft sich auf 80%. Es entsteht zu 80% in der Kopf- und Halsregion und tritt nie auf Schleimhäuten auf. Die Häufigkeit des BCC unterscheidet sich weltweit unter hellhäutiger Bevölkerung - von ca. 50 im nord- und mitteleuropäischen Raum bis 2.000 pro 100.000 Personen im Jahr in Australien. Das mittlere Erkrankungsalter liegt zwischen dem 65. und 69. Lebensjahr und es gilt für beide Geschlechter. Das Auftreten vor dem 40. Lebensjahr ist selten. Die Risikofaktoren für die Entstehung des BCC sind: genetische Prädisposition (z. B. Gorlin-Goltz-Syndrom und Xeroderma pigmentosum), die kumulative UV-Exposition durch natürliche und künstliche Strahlung sowie häufige ionisierende Strahlen mit niedriger Einzeldosis. Karzinogene Substanzen wie Arsen, das früher zur Psoriasisbehandlung verwendet wurde, können die Bildung von BCC fördern. Medikamentös immunsupprimierte Patienten nach Organtransplantation entwickeln nachweislich häufiger Basalzellkarzinom (Breitbart et al., 2004, Fritsch, 2004, Moll, 2010).

Eine wichtige Primäreffloreszenz des BCC bilden sog. Basaliomknötchen, d. h. eins bis mehrere Millimeter große halbkugelige, derbe, grauweiße Papeln mit perlmuttartigem Glanz, die von Teleangiektasien umgeben sind. Die Oberfläche weist keine Verhornung auf. Gelegentlich sind in einem BCC Pigmentpünktchen zu erkennen. Aufgrund einer mechanischen Manipulation formt sich manchmal eine hämorrhagische Kruste. Ein über die Jahre persistierendes BCC verwandelt sich in eine ulzelierende Form, die eine tiefe Gewebszerstörung hervorrufen und bei der Arrosion der lebensnotwendigen Strukturen (z. B. A. carotis) letal enden kann. Histopathologisch ist eine atrophe Epidermis zu erkennen und die Tumorzellen erinnern durch die großen ovalen Kerne an normale Epithelzellen des Basallagers. Charakteristisch ist auch für das BCC eine typische palisadenartige Aufreihung der Tumorzellen im Randbereich.

Klinisch lassen sich folgende Typen des BCC unterscheiden:

- **Noduläres BCC:** tritt am häufigsten auf; der Tumor wächst langsam, ist derb, scharf begrenzt und sitzt breitbasig auf, hat eine wachsartige glasige Farbe und ist von Teleangiektasien durchzogen; später ist bei diesem BCC ein perlschnurartiger Randsaum mit zentraler Einsenkung oder Ulzeration zu erkennen.
- **Ulzeriertes BCC:** entweder als oberflächlicher „nagender“ *Ulcus rodens* oder in die Tiefe wachsender „bohrender“ *Ulcus terebrans*.
- **Pigmentiertes BCC:** wie das noduläre BCC, aber mit einer bräunlichen bis schwarzen Pigmentierung.
- **Sklerodermiformes BCC:** tritt selten auf; die Herde sind flach und narbig, einzelne Teleangiektasien sind sichtbar und manchmal können Basaliomknötchen vereinzelt erkennbar sein. Dieser Typ ist am schwierigsten zu erkennen.
- **Zystisches BCC:** ist transluzent, durchschimmernd und von Teleangiektasien durchzogen.
- **Superfizielles BCC:** scharfe aber unregelmäßig begrenzte, rötliche und leicht erhabene Plaque; die Schuppen oder Krusten kommen gelegentlich vereinzelt vor.

Die Diagnostik des BCC erfolgt durch die typischen klinischen Tumormerkmale. Sie muss immer durch einen pathologischen Befund gesichert werden; bei Verdacht auf eine Infiltration des Tumors in tiefe Strukturen ist die Ausbreitungsdiagnostik mit CT oder MRT durchzuführen. Bei der Therapie ist die Exzision des BCC mit einem von der Größe abhängigen Sicherheitsabstand (von 3 mm bei kleinen bis 15 mm bei infiltrativen BCC) das Mittel der Wahl. Da im Gesicht ein großer Sicherheitsabstand oft durch wichtige Strukturen limitiert ist, wird dieser knapp bemessen (2-4 mm) und anschließend eine systematische Randschnittkontrolle mittels histographischer oder mikrographischer Chirurgie durchgeführt. Bei kleinen und oberflächlichen Tumoren besteht die Möglichkeit einer Kürettage, Kryotherapie, Elektrodissikation, Laserablation, photodynamischen Therapie oder einer topischen Anwendung des Immunmodulator Imiqimod 5% oder des Zytostatikums 5-Fluorouracil. Die Rezidivrate ist gering, dennoch sind Nachsorgeuntersuchungen einmal jährlich über drei Jahre nach der Operation obligat. Immunsupprimierte Patienten oder diejenigen mit lokal rezidivierenden oder nicht *in toto* exzidierten Tumoren sollen noch engmaschiger bestellt werden (Hauschild et al., 2012).

### 1.4.2 Plattenepithelkarzinom

Das Plattenepithelkarzinom (SCC, Synonym: Spinaliom) ist ein Tumor epithelialen Ursprungs. Er wächst über Jahre langsam infiltrierend bis destruierend. Das Metastasierungsrisiko beträgt ca. 5% und die 5-Jahresüberlebensrate bei Metastasierung beträgt 25-50%. Das SCC ist mit ca. 19% der zweithäufigste Hauttumor unter den nichtmelanozytären Krebsarten. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei Männern zwischen 70 und 74 und bei Frauen zwischen 75 und 79 Jahren, wobei Männer häufiger betroffen sind (Breitbart et al., 2004). Bei der hellhäutigen Bevölkerung liegt die Inzidenz in Mitteleuropa zwischen 25-30 Fällen pro 100.000 im Jahr und steigt jährlich um 3-6%. Die Hauptlokalisation des SCC ist die Gesichts- und Halsregion (Fritsch, 2004, Moll, 2010). Die wichtigen ätiologischen Faktoren sind die kumulative UV-Exposition, besonders bei den Hauttypen I und II, vorhandene aktinische Keratosen, das Alter, chemische Substanzen wie Arsen und Kohlenwasserstoffe und Röntgenstrahlen. Das SCC entwickelt sich in der Regel aus Präkanzerosen, möglich sind auch maligne Transformationen aus Wunden und chronischen Entzündungen, Verbrennungen, Narben und bullösen Dermatosen. *De novo*-Tumore sind eher selten (Breuninger et al., 2011, Fritsch, 2004). Immunsupprimierte Patienten, z. B. nach einer Organtransplantation, oder HIV-Infizierte haben ebenfalls ein erhöhtes Erkrankungsrisiko.

Klinisch erkennt man warzige, unscharf begrenzte, hyperkeratotische hautfarbene bis rötliche Knoten, die peripher und vertikal langsam anwachsen. Während des invasiven Wachstums kommt es zur Verdickung des Herdes und einem fingerförmigen Einwachsen ins Gewebe, oft mit einem entzündlichen Randsaum. Man unterscheidet klinisch flächige, knotig-exophytische, flach diffus infiltrierende und oberflächlich oder tief exulzierende Verlaufsformen, die ineinander fließend übergehen können. Histologisch sind atypische epitheliale Tumorzellnester mit Zell- und Zellkernatypien zu erkennen. Die Tumorzellformationen können verhornen. Bei herdförmigen Atypien in der Epidermis wird der Befund als aktinische Keratose oder Cheilitis eingestuft, während man bei Veränderungen in der gesamten Epidermis von Morbus Bowen spricht. Beim SCC reichen die Tumorzellnester bis in die Dermis (Breuninger et al., 2011).

Die Tumordiagnostik erfolgt durch klinische Inspektion und wird histologisch durch Probebiopsie oder therapeutische Exzision gesichert. Bei einer Tumordicke von 2 mm und mehr muss darüber hinaus eine Ausbreitungsdiagnostik betrieben werden. Eventuelle



Lymphknotenmetastasen werden sonographisch untersucht und bei infiltrierend und destruierend wachsenden Tumoren kommen noch weitere diagnostische Methoden wie CT und MRT hinzu. Beim Verdacht auf Fernmetastasen sind weitere organspezifische Untersuchungen, z. B. Röntgen-Thorax-Aufnahmen notwendig.

Die Therapie richtet sich nach der Ausbreitung des Tumors. Die vollständige Exzision mit Schrittrandkontrolle ist die Methode der Wahl. Sollte der Tumor bereits die Knochen-, Knorpel- und Muskelstrukturen infiltriert haben, wird der Tumor reseziert und anschließend kommt es zu rekonstruktiven und ggf. epithetischen Maßnahmen. Ist eine vollständige Tumorsektion nicht möglich, kann Strahlentherapie, auch in Verbindung mit Chemo- oder Immuntherapie, angeordnet werden.

Die Nachsorge von Tumoren mit niedrigem Metastasierungsrisiko beinhaltet halbjährliche Untersuchungen bis zum fünften postoperativen Jahr. Bei Tumoren mit hohem Metastasierungsgrad und Risikopatienten, d. h. nach Organtransplantation, bei Immunsuppression und bei multiplen Tumoren, müssen in den ersten zwei postoperativen Jahren Kontrolluntersuchungen ggf. mit Lymphknotenultraschall mit dreimonatigen Abständen erfolgen und bis zum fünften postoperativen Jahr halbjährliche Kontrollen. Die Patienten sollen darüber hinaus zur Selbstbeobachtung animiert werden.

### **1.4.3 Malignes Melanom**

Das Maligne Melanom (MM) ist ein maligner Tumor melanozytären Ursprungs. Er verursacht die häufigsten Todesfälle (ca. 90%) unter den Hauterkrankungen. Die Inzidenzrate steigt weltweit seit ca. 50 Jahren; dabei werden neue Krankheitsfälle in den Industriestaaten und bei hellhäutiger Bevölkerung weitaus häufiger als bei Afrikanern und Asiaten registriert. In den USA, Australien, Neuseeland, Kanada, Israel und Norwegen hingegen stagnieren die Neuerkrankungen aufgrund intensiver präventiver Aufklärungskampagnen. Bei der Altersgruppe ab dem 56. Lebensjahr werden die höchsten Inzidenzraten sowohl bei Frauen als auch bei Männern beobachtet (Erdmann et al., 2012). Zu den Risikofaktoren für die Entstehung des MM gehört vor allem die UV-Strahlung, insbesondere bei den häufigen, auch in der Kindheit durchlaufenen, schweren Sonnenbränden. Das Risiko steigt auch bei genetischer Veranlagung oder gestörtem DNA-Repair (z. B. Xeroderma Pigmentosum). Die

Vorläuferläsionen, wie atypische, kongenitale Nävuszellnävi oder multiple Nävi, können die Krankheit begünstigen, wobei die meisten MM *de novo* entstehen. Immunsuppression oder positive HIV-Anamnese gehören ebenfalls zu ätiologischen Faktoren. Frauen und Männer sind etwa gleichermaßen betroffen, wobei das MM bei den Frauen häufig an der unteren Extremität und bei den Männern meist am Stamm zu beobachten ist (Fritsch, 2004, Moll, 2010).

Es gibt mehrere Melanomtypen, aber sehr häufig vereinen sie bestimmte gemeinsame Charakteristika: sie sind meistens größer als 5 mm, ihre Kontur ist teilweise scharf, teilweise unscharf begrenzt, das Tumorwachstum ist nicht überall gleichmäßig, die Farbe ist inhomogen mit schwarzen, braunen, rötlichen und blaugrauen Arealen, sie sind erhaben, können aber teilweise atrophe Stellen aufweisen. Klinisch und histologisch unterscheidet man 4 Melanomtypen:

- **Superfiziell-spreitendes Melanom (SSM):** ist die häufigste Variante. Charakteristisch für diese Entität sind flache bis erhabene dunkelbraune bis schwarze Makula mit roten, grauen und weißlichen Arealen, polyzyklisch bis unregelmäßig begrenzt. Das horizontale Tumorwachstum erfolgt relativ schnell (Monate bis Jahre).
- **Noduläres Melanom (NMM):** ist der aggressivste Melanomtyp. Es ist durch sofortiges vertikales Wachstum gekennzeichnet. Man erkennt exophytische, meist schwarzbraune Knoten manchmal mit einer Pigmentierung versetzt. Es neigt zu Blutungen, ist weich, oft erosiv oder exulzeriert.
- **Lentigo-maligna-Melanom (LMM):** ist ein Melanom in situ, d. h. es wächst horizontal und bleibt in der Epithelschicht. Es befindet sich an den sonnenexponierten Körperstellen, wie dem Gesicht, Handrücken oder an den Unterarmen. Typisches klinisches Bild ist eine mehrere mm bis cm große Macula mit einer gemischt bräunlichen bis schwarzen Pigmentierung. Die Läsionsränder sind inhomogen.
- **Akrolentiginöses Melanom (ALM):** ist an den Akren, auch am Nagelapparat, lokalisiert. Klinisch sind die Maculae unscharf begrenzt, polyzyklisch, dunkelbraun bis schwarz. Auf diesen bilden sich mit der Zeit Knoten, die ulzerieren.

Wichtige Anhaltspunkte bei der histologischen Beurteilung sind: atypische Melanozyten in Epidermis und Dermis, beim SSM große und zytoplasmareiche „pagetoide Melanomzellen“, Kernatypien und Mitosen, tumorreaktives Infiltrat und fehlende Reifung der Zellen zur Tiefe hin (Fritsch, 2004).

Die Erstdiagnostik erfolgt durch die klinische Inspektion und Dermatoskopie mithilfe der ABCDE-Regel. Die Buchstaben stehen für folgende Tumormerkmale: A-Asymmetrie, B-Begrenzung, C-Colour, D-Durchmesser, E-Erhabenheit (Sterry, 2011). Das Malignitätsrisiko steigt mit einer asymmetrischen Form, unregelmäßigen Begrenzungen, unterschiedlichen Farbtönen, einem Durchmesser von mehr als 5 mm und Erhabenheit. Dermatoskopisch lassen sich ein irreguläres Pigmentnetz mit radiären Ausläufern und punktförmigen Pigmentverdichtungen beobachten. Da eine Probebiopsie aufgrund der Gefahr einer Streuung der Tumorzellen auf dem hämatogenen Weg kontraindiziert ist, wird das MM *in toto* exziiert.

Das weitere Vorgehen richtet sich nach der histologisch bestimmbaren Tumordicke nach Breslow und dem Invasionslevel nach Clark; das Vorhandensein von Ulzerationen verschlechtert die Therapieprognose. Die Tumordicke nach Breslow wird in mm angegeben, während die Level nach Clark die Invasion der infiltrierten Hautschichten beschreiben: Level I – intraepithelial, II – bis ins Stratum papillare, III – das gesamte Stratum papillare und IV – bis ins subkutane Fettgewebe. Nach der Primärexzision sollte zeitnah, jedoch nicht später als nach vier Wochen eine Nachexzision erfolgen, wobei der Sicherheitsabstand je nach Tumordicke variiert: In-Situ-Melanome bis 0,5 mm werden mit einem Abstand von 0,5 cm, MM mit einer Tumordicke von weniger als 2 mm mit Abstand von 1,0 cm und MM mit einer Tumordicke von mehr als 2 mm mit einem Abstand von 2,0 cm exziiert. Bei anatomischen Limitationen, z. B. im Gesicht, am Ohr, an Fingern oder Zehen, können die Sicherheitsabstände mit Hilfe einer 3-D-Histologie reduziert werden. Bei inoperablen beziehungsweise weit ausgedehnten Tumoren oder Patienten, bei denen eine Operation nicht möglich ist, sollte die primäre Radiotherapie eingesetzt werden (Pflugfelder et al., 2013). Nach dem gesicherten histologischen Befund sollte eine Röntgen-Thorax-Aufnahme in zwei Ebenen und eine Abdomen-Sonographie durchgeführt werden. Ab einer Tumordicke von mehr als 1 mm, Clark-Level und Ulzeration müssen weitere diagnostische Maßnahmen durchgeführt werden: Lymphknotenultraschall der regionären Lymphknoten, Labordiagnostik mit BSG, BB, LDH, AP und Protein S100 und eine Biopsie des Wächterlymphknotens. Andere diagnostische Untersuchungen wie CT, MRT oder PET sind möglich. Die Therapie regionärer Metastasen umfasst eine radikale regionäre Lymphadenektomie, eine adjuvante Chemotherapie und bei Bedarf eine Radio- und Immuntherapie. Bei Fernmetastasen kommen weitere chirurgische Eingriffe und bei Inoperabilität eine palliative Medizin infrage.

Die Nachsorgeintervalle werden je nach Tumorstadium und -dicke festgelegt und bis zehn Jahre postoperativ durchgeführt; in den ersten drei Jahren sind die Kontrollen intensiver und finden in 3- bis 6-monatigen Abständen statt. Sie umfassen die Untersuchungen von Pigment- und Lymphknotenstatus und je nach Risikogruppe zusätzlich Laborbestimmung von Protein S100. Die Patienten sollen darüber hinaus zu den Selbstkontrollen animiert werden. Die 10-Jahresüberlebensrate im Gesamtkollektiv beträgt zwischen 75 und 80% und richtet sich vor allem nach der Tumordicke nach Breslow, dem Clark-Level und dem Vorhandensein von Ulzerationen im Tumor.

### 1.5 Die Wechselwirkung von Licht und Gewebe

Das Licht kann über ein Wellen- und Teilchenmodell beschrieben werden. Folgende Gleichung kann das Modell der geometrischen Optik und das Photonenmodell in einer Abhängigkeit beschreiben:

$$E = h \cdot \nu = \frac{h \cdot c}{\lambda}$$

(E-Teilchenenergie, h-Plancksches Wirkungsquantum  $6,6261 \cdot 10^{-34}$  Js,  $\nu$ -Frequenz, c-Lichtgeschwindigkeit,  $\lambda$ -Wellenlänge).

Wenn ein Lichtstrahl auf ein Hautareal trifft, kommt es zu verschiedenen Effekten: ein Teil des Lichts wird von der Oberfläche zurückreflektiert, teilweise wird das Licht vom Gewebe absorbiert und gestreut (Landthaler and Hohenleutner, 2006).

Die Luft und die Haut weisen andere Brechungsindizes auf. Die beiden Werte bestimmen den sogenannten Reflexionsgrad, d. h. beschreiben, wie viel Prozent des senkrecht auf die Haut gerichteten Lichts wieder zurückreflektiert wird:

$$R = \frac{(n_{Luft} - n_{Haut})^2}{(n_{Luft} + n_{Haut})^2}$$

(R-Reflexionsgrad,  $n_{Luft}$ -Brechungsindex der Luft,  $n_{Haut}$ -Brechungsindex der Haut).

Bei der senkrechten Ausrichtung des Lichtstrahls wird nur ca. 4% zurückreflektiert. Der Reflexionsgrad  $R$  steigt bei jeder Veränderung des Strahlwinkels (Landthaler and Hohenleutner, 2006).

Eine weitere Wechselwirkung des Lichts mit der Haut stellt die Lichtabsorption dar. Während der Durchdringung der Haut mit dem Licht kommt es zu einer Abnahme von Lichtintensität, weil die Photonen von Molekülen absorbiert werden. Die Absorption ist wellenlängenabhängig und wird durch den sogenannten Absorptionskoeffizienten  $\mu_a$  beschrieben. Diese Zahl beschreibt den Energieverlust pro Längeneinheit ( $cm^{-1}$ ). Zu den typischen Hautchromophoren gehören Hämoglobin, Melanin und Wasser (Landthaler and Hohenleutner, 2006, Michel and Holcomb, 2007).

Eine einfache oder mehrfache Streuung kommt zustande, wenn bei dem Lichtstrahl die Photonen auf verschiedene Streuzentren im Gewebe treffen und abgelenkt werden. Dadurch kann die Lichtintensität geschwächt oder sogar verstärkt werden. Die Hautzellen, Pigment, Kollagen oder die Gefäße können solche Streuobjekte darstellen. Die Streuung ist ebenfalls von der verwendeten Wellenlänge des Lasers abhängig. Ist das Streuzentrum um Faktor 10 kleiner als die Laserwellenlänge (z. B.  $\lambda = 500$  nm und das Streuobjekt nicht größer als 50 nm), wird die Streuung umgekehrt proportional zur vierten Potenz. Eine solche Streuung wird als Rayleigh-Streuung bezeichnet und wird durch folgende Abhängigkeit charakterisiert:

$$\mu_s \sim \frac{1}{N\lambda^4}$$

( $\mu_s$ -Rayleighscher Streukoeffizient,  $N$ -Anzahl der Streuzentren,  $\lambda$ -Wellenlänge).

Die beschriebene Streuungsart ist elastisch, d. h. die Lichtfrequenz wird beim Streuungsvorgang nicht verändert und tritt viel häufiger als die sogenannte unelastische Streuung auf ( $\approx 1:10^6$ ). Die Absorption und Streuung des Lichts in der Haut treten gleichzeitig auf. Die Lichtausbreitung im Gewebe findet diffus statt und kann mittels komplexer mathematischer Modelle beschrieben (z. B. Monte Carlo Simulation, Finite Elemente) (Michel and Holcomb, 2007).

## 1.6 Der Raman-Effekt/Raman-Spektroskopie

Beim Bestrahlen eines Stoffes mit Licht einer bestimmten Wellenlänge kann man drei verschiedene Streuprozesse von Photonen an Molekülen beobachten: beim ersten Fall führt das Photon mit einem Molekül einen elastischen Stoß aus, bei dem die Energie auf das Molekül nicht übertragen wird, die Frequenz des Streulichts bleibt auch konstant (Rayleigh-Streuung). Die zwei anderen Fälle stellen einen unelastischen Stoß, also den Raman-Effekt dar. Das Molekül nimmt die Schwingungsenergie des eingestrahnten Lichts auf, demzufolge hat das Streulicht eine niedrigere Frequenz und ist energieärmer als das eingestrahlte Licht (sog. Stokes-Raman-Streuung, s. *Abbildung 1*) oder, was noch viel seltener vorkommt, dass das bereits energetisch angeregte Molekül bei dem Stoß seine Energie an das Photon überträgt, weshalb das emittierte Licht höhere Energie und Frequenz besitzt (sog. Anti-Stokes-Raman-Streuung) (Dippel, 2017). Die Streuungsintensitäten sind äußerst gering:  $\frac{I_{\text{Rayleigh}}}{I_0} \sim 10^{-5}$ , während  $\frac{I_{\text{Raman-Stokes}}}{I_0} \sim 10^{-8}$  und  $\frac{I_{\text{Raman-Antistokes}}}{I_0} \sim 10^{-11}$  beträgt. Deshalb ist für die Anregung ein intensives monochromatisches Licht eines Lasers erforderlich (Hesse et al., 2011).

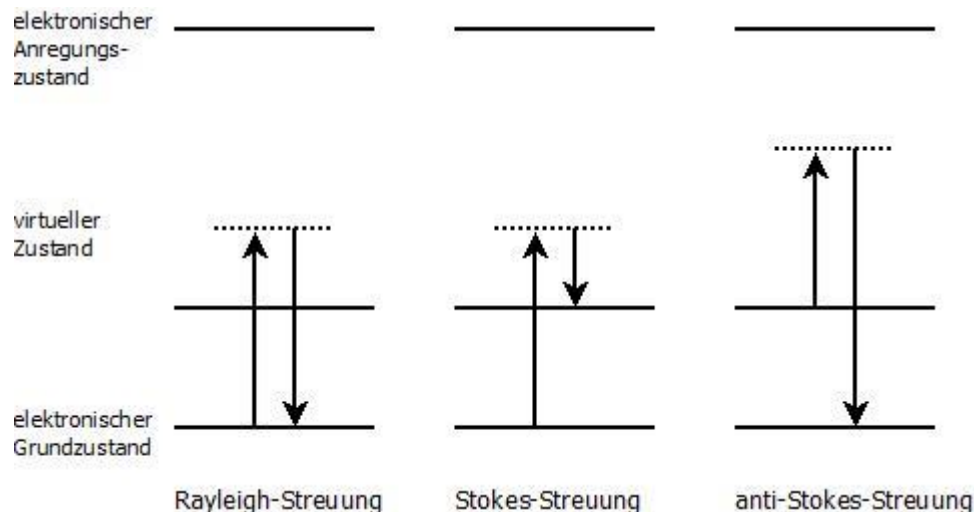


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Energiezustände.

Die Energieverschiebung bei unelastischen Stößen kann man messen. In der Raman-Spektroskopie sich die Angabe von Wellenzahlen  $\nu$ , dem Kehrwert von Wellenlängen, bei der Beschreibung von elektromagnetischen Wellen durchgesetzt:  $\text{Wellenzahl } \nu \text{ [cm}^{-1}\text{]} =$

$\frac{10^4}{\text{Wellenlänge } \lambda \text{ [}\mu\text{m]}}$  (Hesse et al., 2011). Bei der Stokes-Raman-Streuung besitzen die Spektrallinien eine höhere Wellenlänge (sind also zu geringeren Wellenzahlen verschoben). Hingegen haben die Anti-Stokes-Linien eine kürzere Wellenlänge (Wellenzahlen höher). Der Wellenlängenunterschied zwischen dem absorbierten und wieder emittierten Licht wird auch als eine Raman-Verschiebung oder ein Raman-Shift bezeichnet. Obwohl beide unelastische Stöße deutlich schwächer im Vergleich zur Rayleigh-Streuung sind, ist die Stokes-Verschiebung intensiver, und wird somit in der Regel für die spektrale Auswertung herangezogen (Dippel, 2017).

Die Moleküle führen stets Schwingungen aus. Der Raman-Effekt tritt auf, wenn die Molekülschwingungen ihre Polarisierbarkeit ändern, man spricht auch von sogenannten Raman-aktiven Schwingungen. Im Gegensatz dazu gibt es Infrarot (IR)-aktive Schwingungen, bei denen sich das Dipolmoment ändert. Es gibt auch andere Auswahlregeln, mit derer Hilfe man bestimmte Schwingungen im Raman-Spektrum sehen kann, die im IR-Spektrum nicht sichtbar werden und umgekehrt. Die Raman- und IR-Spektren liefern somit den Informationsgehalt komplementär (Hesse et al., 2011), s. Abbildung 2.

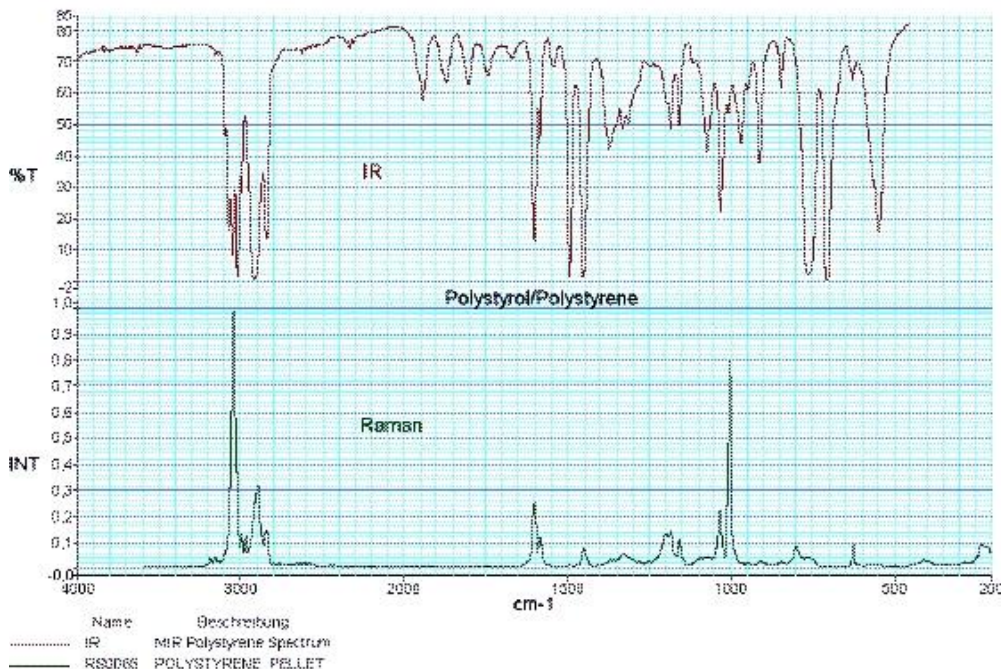


Abbildung 2: Vergleich des IR- und Raman-Spektrums für Polystyrol (Dippel, 2017).

Da die Raman-Verschiebung empfindlich gegenüber den Molekülschwingungen ist, erhält man mittels Raman-Spektroskopie die Informationen über die einzigartige molekulare Zusammensetzung und Bestandteile eines Stoffes oder Gewebes (Dippel, 2017). In den meisten Studien (z. B. RaDiag Derma-Studie (2015b), Lui et al. (2012), Lieber et al. (2008b)) werden die Banden aus dem sogenannten „Fingerprint-Bereich“, also die Peaks im Bereich von ca. 500 bis  $1600\text{ cm}^{-1}$  untersucht und verglichen, weil sie hier besonders zahlreich auftreten. Dort lassen sich Deformationsschwingungen, Valenzschwingungen von Gruppen mit schweren Atomen, sowie Gerüstschwingungen beobachten. Manche Forschungsgruppen befassen sich darüber hinaus mit den Valenzschwingungen in den höheren Wellenzahlen von 1500 bis  $3700\text{ cm}^{-1}$  (Salzer et al., 2016), z. B. Philipsen et al. (2013), Gniadecka et al. (2004). Die Tabelle 1 verschafft einen Überblick über die Zuordnung der Ramanbanden zu den Molekülbindungen.

Tabelle 1: Die Wellenzahlen und entsprechende chemische Verbindungen, die im Raman-Spektrum einer Zelle beobachtet wurden; Anregungswellenlänge beträgt  $785\text{nm}$  (Byrne et al., 2011).

Wellenzahlen ( $\text{cm}^{-1}$ )	Zuweisung auf der biochemischen Ebene	englische Bezeichnung
787	DNA/RNA: Ausdehnung und Kontraktion der Kohlenstoffatome	DNA/RNA: ring breathing C
809	RNA: O-P-O-Bindung	RNA: O-P-O
1003	Proteine: Ausdehnung und Kontraktion des Phenylalanin-Ringes	Prot: ring breathing Phe
1092	DNA/RNA: Streckschwingung der O-P-O-Bindung	DNA/RNA: O-P-O stretching
1264	Proteine: tertiäre Amide	Prot: Amide III
1451	Proteine: C-H Biegeschwingung	Prot: (C-H) bending
1486	DNA/RNA: Ringmodus (Guanin, Adenin)	DNA/RNA: ring mode (G, A)
1553	Proteine: c=C Streckschwingung des Tryptophans	Prot: c=C stretching (Trp)
1575	DNA/RNA: Ringmodus (Guanin, Adenin)	DNA/RNA: ring mode (G,A)
1660	Proteine: primäre Amide	Prot: Amide I



### 1.7 Andere nichtinvasive Messmethoden zur Diagnostik von Hauttumoren

Es gibt auch andere spektroskopische Methoden in der Diagnostik von Hauttumoren, die nichtinvasiv und in Echtzeit angewendet werden können. Dazu zählen unter anderem Fluoreszenzspektroskopie, Konfokalmikroskopie, diffuse Reflexionsspektroskopie (DRS) und optische Kohärenztomographie (OCT).

Die Fluoreszenzspektroskopie basiert auf der Fähigkeit mancher Hautkomponenten, wie aromatischen Aminosäuren (Phenylalanin und Tryptophan) oder Strukturproteinen (Kollagen und Elastin), zu fluoreszieren. Dabei absorbieren die Fluorophore bei der Lichtapplikation (normalerweise UV-Licht oder sichtbares Lichtspektrum) die Photonen und gehen in ein höheres energetisches Niveau über, um ihre Energie in Form von Licht mit einer höheren Wellenlänge als die Anregungswellenlänge abzugeben. Die Fluorophore liefern auf diese Art und Weise die biochemischen Informationen über die Zusammensetzung und pathologische Veränderungen von Gewebe (Calin et al., 2013). Eichhorn et al. (2009) haben die Melaninfluoreszenz mittels einer sog. Zwei-Photonen-Anregung in verdächtigen Nävi untersucht und konnten deutliche Unterschiede zwischen den Spektren von MMs, benignen, melanozytären sowie dysplastischen Nävi feststellen. In Studien, bei denen die BCCs untersucht wurden, konnten hingegen nur wenig verlässliche Ergebnisse erzielt werden.

Die Konfokalmikroskopie bietet ein optisches Verfahren mit einer hohen Ortsauflösung und einem höheren Kontrast als die konventionellen Techniken. Die Probe wird abgerastert, indem kleine Areale mehrfach mit einem Lichtstrahl in kurzen Zeitabständen beleuchtet werden. Zwischen der Probe und dem Mikroskopdetektor befindet sich eine Lochblende, die nur das scharfe zurückemittierte Licht zum Detektor durchlässt und die unscharfen Areale ausblendet. Alle beleuchteten Areale werden zu einem kontrastreichen Bild summiert. Durch die Fokusänderung oder Lageveränderung der Probe können 3-D-Bilder entstehen (Calin et al., 2013). Mit dieser Methode konnten zuverlässige Diagnosen von MM, benignen Nävi, BCC, seborrhoischen Keratosen sowie Differenzierung zwischen MM und nichtmelanozytären Nävi festgestellt werden (Guitera et al., 2010, Gerger et al., 2008). Die Diagnostik von SCC mit Konfokalmikroskopie ist ebenfalls vielversprechend (Amjadi et al., 2010). Ulrich et al. (2013) haben zwei nichtinvasive Methoden, Konfokalmikroskop im Reflexionsmodus (RLSM, *engl. reflectance confocal microscopy*) mit einem Multiphotonen-Tomographen (MPT) für die

Zwecke der BCC-Diagnostik verglichen. Beide Methoden eignen sich für die Bestimmung von charakteristischen Merkmalen dieses Hauttumors, insbesondere elongierte Zellen oder Palisadenstellung der Zellen. Mit dem erstgenannten Verfahren ist es möglich, schnell die BCC-Nester zu lokalisieren, während der MPD für die Visualisierung der Veränderungen in den Zellkernen oder im Zytoplasma erfolgreich angewendet werden kann.

Die diffuse Reflexionsspektroskopie (DRS) liefert Informationen über die Morphologie des physiologischen und veränderten Gewebes sowie darin enthaltene Chromophoren (z. B. Hämoglobin, Melanin, Bilirubin und Wasser) und Streuzentren unter der Hautoberfläche, indem sowohl breite Absorptions- als auch Streuspektren gemessen werden. Dabei wird ein Lichtstrahl auf die zu untersuchende Läsion appliziert; die zurückreflektierten Strahlen bilden um die Stelle eine diffuse „Hemisphäre“, die detektiert wird (Calin et al., 2013). Garcia-Urbe et al. (2011) konnten mit 90% Spezifität und Sensitivität die pigmentierte MM nachweisen und sehr gut die nichtpigmentierte BCC und SCC von anderen benignen Hauttumoren differenzieren. Eine Mischung aus DRS und Autofluoreszenztechnik zeigt ebenfalls sehr gute klinische Ergebnisse bei der Diagnostik von BCC und gute bei SCC und aktinischen Keratosen (Rajaram et al., 2010).

Die optische Kohärenztomographie (OCT) stellt eine tomographische Untersuchungstechnik dar, der die Bildentstehung in 2D und 3D aus dem vom Gewebe zurückreflektierten oder -gestreuten Licht mithilfe von Wellenüberlagerung, sog. Interferometrie, zugrunde liegt (Calin et al., 2013). Die meisten dermatologischen Studien, bei denen die OCT angewendet wurde, widmen sich der Diagnostik von BCC, SCC und aktinischen Keratosen. Ulrich et al. (2016) konnten mithilfe eines kommerziell erhältlichen, dynamischen OCT-Geräts die Verteilung und Morphologie der Blutgefäße innerhalb der Hauttumore BCC und SCC, sowohl oberflächlich als auch in der Tiefe, erfolgreich visualisieren und deutlich von normalen Hautarealen unterscheiden. Die Diskriminierung von AK gegen SCC ist ebenfalls aufgrund geringerer Hyperkeratose der erstgenannten Hautveränderung gelungen. Die OCT hat sich außerdem zuverlässiger im Vergleich zum Ultraschall in Bezug auf die Messung von Tumordicke erwiesen (Hinz et al., 2012) und die Diagnosen waren vergleichbar mit den histologischen Befunden (Olmedo et al., 2007).

## 2 Methoden

### 2.1 Raman-spezifischer Messaufbau

Das Raman-spektroskopische Messsystem stellt ein Prüfgerät dar, das nach dem aktuellen Stand der Technik für diagnostische Zwecke entwickelt wurde. Es entspricht den aktuellen Normen auf mechanische und elektrische Unbedenklichkeit sowie Lasersicherheit. Das RS-Messgerät ist auf der Abbildung 3 zu sehen. Im Messwagen befinden sich:

- Spektrometer iHR320 mit dem integrierten CCD-Detektor („synapse“ HORIBA Jobin Yvon, Longjumeau Cedex, France)
- Laser der Wellenlänge 785 nm mit Treiber (mit 40 mW, fest eingestellt im „continuous wave mode“, die aus dem Messkopf austretende Leistung beträgt weniger als 20 mW)
- Trenntrafo und Netzteile für alle Komponenten
- 2 Shutter mit Ansteuerplatine
- Lüfter
- integriertes Laptop für die Visualisierung der Spektren und Datenerhebung.

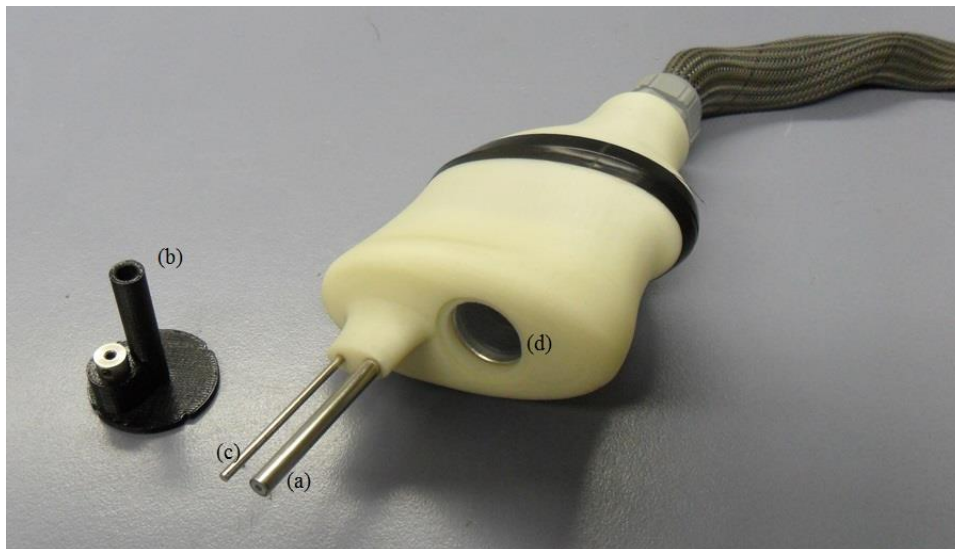


Abbildung 3: Foto des Raman-Messgerätes.

Der Messkopf ist mit dem Messgerät über ein Kabel verbunden, in dem sich eine Glasfaser befindet (Reble, 2012). In der RaDiag Derma-Studie wird ein Laser der Klasse 1M verwendet. Um die richtige Laserapplikation zu gewährleisten, ist ein immer zu der Haut senkrechter Halt des Laserkopfes anzustreben, sonst nimmt die Lichtreflexion zu (Landthaler and Hohenleutner, 2006). Das detektierte Licht wird über die Faser zum Filter geleitet, wo die Rayleigh-Streuung entfernt wird; das Spektrometer mit dem integrierten CCD-Detektor lässt die veränderten Frequenzen des Raman-gestreuten Lichtes in Form von Spektren detektieren. Die Rohspektren werden in dem hausintern entwickelten Programm „RaDiagDermSpec“ erfasst, das auf Software Labview 8.6 (National Instruments, Austin, TX, USA) und Labspec 5 (Horiba Jobin Yvon) basiert.

Der Messkopf besteht aus folgenden Komponenten (s. Abbildung 4):

- Raman-Fasersonde (von Fima EmVision)
- Umlichtabschattung (beherbergt die Raman-Fasersonde)
- Shutterkontakt-Anlenkung
- Videokamera



*Abbildung 4:* Messkopfbestandteile: a-Raman-Fasersonde, b- Umlichtabschattung, c- Shutterkontakt-Anlenkung, d- Videokamera.

Das Raman-Streulicht wird in der Fingerprintregion von 300 bis  $1730\text{ cm}^{-1}$  detektiert. Für die RaDiag Derma-Studie wurde ein definierter Durchmesser des Anregungssspots (100-150  $\mu\text{m}$ ) und des Detektionssspots (ca. 600  $\mu\text{m}$ ) für den Raman-Strahl gewählt, um einen Großteil des Signals aus der Messtiefe von bis zu ca. 100  $\mu\text{m}$  zu erreichen (Schleusener et al., 2015b). Diese Entscheidung beruht auf der Tatsache, dass die Basalmembran ungefähr 100  $\mu\text{m}$  unterhalb der Hautoberfläche lokalisiert ist. Da die pathologischen Veränderungen der zu untersuchenden Tumore im Frühstadium genau in dieser Region voranschreiten, ist ihre Detektion in dieser Tiefe anzustreben (Reble, 2012). Der Messkopf ist außerdem mit einer Farbkamera ausgestattet, die eine Videoaufnahme von der Läsionsregion ermöglicht. Diese Maßnahme hat insofern einen Vorteil, als die Raman-vermessene Stelle mit dem histologischen Befund einer inhomogenen Läsion verglichen werden kann (Schleusener et al., 2014).

## 2.2 Das Studiendesign

Bei der RaDiag Derma-Studie handelt es sich um eine offene, monozentrische, explorative Machbarkeitsstudie (engl. *Proof of Principle*). Vor dem Beginn der Studie stand kein belastbares Vorwissen bezüglich der Kennnisgrößen Sensitivität und Spezifität zur Verfügung. Aus diesem Grunde ist die Berechnung von den Fallzahlen entfallen. In der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie Charité Berlin werden jedes Jahr chirurgische Exzisionen von Hauttumoren bei ca. 780 Patienten durchgeführt. Diese Fallzahl sichert die benötigte Anzahl von Patienten, auch bei Berücksichtigung von den Einschluss- und Ausschlusskriterien.

Für die Studie sollten maximal 120 Patienten mit einer Verdachtsdiagnose auf einen Hauttumor, 40 je Tumorart MM, BCC oder SCC, im Rahmen des Screenings in der Tumorsprechstunde an der Hautklinik Charité CCM rekrutiert werden. Es standen folgende Einschlusskriterien an die Teilnehmer fest:

- die Untersuchungsstelle musste für die Messung zugänglich sein
- histologische Auswertung war vorgesehen
- es lag ein kaukasischer Hauttyp I-IV vor
- der Patient wurde ausreichend über die Ziele und das Vorgehen der Messung aufgeklärt
- der Patient hat anschließend schriftlich eingewilligt

Ein Patient wurde von der Studie ausgeschlossen, wenn:

- eine Verletzung des zu untersuchenden Hautareals vorlag
- er eine sonstige auffällige Hauterkrankung erlitt
- minderjährig oder nicht einwilligungsfähig war
- eine Schwangerschaft oder Stillzeit vorlag
- der Patient auf eine gerichtliche oder behördliche Anordnung hin in einer Anstalt untergebracht wurde (nach §20 MPG)
- ein Medikamenten-, Drogen- oder Alkoholabusus bekannt war

### 2.3 Messvorgang und Datenerhebung

Bevor ein Patient mit dem Raman-Messgerät untersucht wurde, fand eine Vorauswahl der verdächtigen Läsionen durch den behandelnden Arzt im Rahmen der Tumorsprechstunde in der Hautklinik der Charité Campus Mitte statt. Anhand der Einschlusskriterien wurde entschieden, ob der Patient für die Teilnahme an der Studie geeignet ist. Dem Patienten wurden die Ziele und der Studienablauf ausführlich erklärt. Eine Kopie der Einverständniserklärung sowie eine Patienteninformation über die Studie wurden jedem Patienten ausgehändigt und es wurde ausreichend Zeit für das genaue Durchlesen der Blätter und Fragen diesbezüglich eingeräumt. Der Patient musste eine schriftliche Einwilligung für die Teilnahme an der Studie abgeben, durfte sie aber jederzeit widerrufen. Im Untersuchungsraum wurde die Patientenanamnese erhoben sowie die zu untersuchende Stelle fotografiert. Auf den Studienunterlagen wurden die Studienteilnehmer zu keinem Zeitpunkt namentlich erwähnt, sondern bekamen eine Fallnummer. Die erhobenen Studiendaten jedes Patienten wurden pseudonymisiert in einen CRF-Bogen (*engl. case report form*) eingetragen. Diese beinhalteten: Studieneinschluss- und -ausschlusskriterien, Anamnese, Messverlauf, Erfassung von unerwünschten Ereignissen sowie nachträglich die Ergebnisse der Histologie. Eine Studienteilnehmerliste mit den dazugehörigen Fallnummern wurde getrennt von den Studienunterlagen geführt und der Studiensponsor hatte auf sie keinen Zugriff. Das zuvor angefertigte Bild wurde doppelt ausgedruckt. Auf den Bildern wurden gemessene Punkte in der Messreihenfolge sowie die Referenzpunkte auf normaler Haut mit einem Filzstift aufgetragen. Das erste Bild wurde in den CRF-Bogen des Patienten eingeklebt und das zweite in die Patientenakte der Hautklinik hinzugefügt.

Die Messaufnahme begann mit dem Start des Programms „RaDiagDermaSpec“ und dem Einschalten des Raman-Messgeräts. Ein Screenshot des benutzten Programms ist auf der Abbildung 5 ersichtlich. Vor jeder Messung einer Läsion erfolgte grundsätzlich eine Kalibrierung des Messsystems, um die optische Umgebung zum Zeitpunkt der Messung möglichst genau festhalten zu können und um die Lichtartefakte herauszufiltern.

Dies geschah in drei Schritten:

- Leermessung mit einer Dunkelkammer, um den aufbauspezifischen Spektrenhintergrund abzuziehen
- Weißstandardmessung mit einer Halogenlampe (mit unpolarisiertem Licht) für die Kalibrierung des CCD-Detektors
- Wellenlängenkali­bration mit Decklicht wurde aufgrund der beschränkten Reproduzierbarkeit des Gitterspektrometers und eines möglichen „Drifts“ von der ursprünglichen Anregungswellenlänge durchgeführt (Schleusener et al., 2015a)

Nach der erfolgreichen Vorbereitung des Messgeräts konnten die Patientenmessungen durchgeführt werden. Die Messsonde wurde senkrecht auf die Läsion aufgesetzt, mit moderatem Druck gehalten und der Messvorgang mit dem Fußschalter aktiviert. Die Messsonde durfte dabei zu keinem Zeitpunkt wackeln oder verrutschen, der gemessene Körperteil musste ebenfalls gestützt werden, um die Messergebnisse nicht zu verfälschen. Das veränderte Hautareal wurde an drei verschiedenen Punkten und die normale Haut in der Tumornähe an sechs Punkten gemessen. Jede Messung dauerte 10 Sekunden.

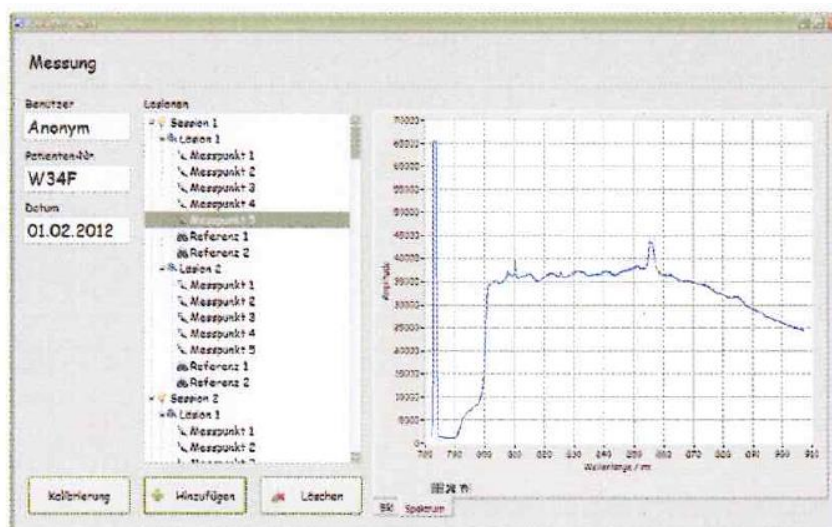


Abbildung 5: Screenshot der Software „RaDiagDermSpec“. Aus dem Handbuch des klinischen Prüfers.

Nach der vollendeten Messung wurden die aufgenommenen Spektren automatisch gespeichert. Die Messsonde wurde mit einer alkoholhaltigen Lösung gereinigt. Der Patient wurde entlassen.

## 2.4 Datenverarbeitung

Bei jeder Probenmessung erschienen in der Software Rohspektren. In dieser Form waren die Ramanbanden noch nicht oder nicht vollständig erkennbar, was eine Bewertung unmöglich machte. Mithilfe von statistischen und multivariaten Analysemethoden ließ sich die Vielzahl der darin enthaltenen Daten sortieren und einordnen. Das Ziel der Spektrenverarbeitung besteht darin, die Daten zu reduzieren, indem die Information von Nicht-Information (z.B. Rauschen) getrennt wird. Die Ausreißer werden erkannt und beseitigt, verrauschte Spektren geglättet. Dies erfolgte mittels Wellenlängenkorrektur, Signalglättung, Korrektur von Sensitivität des Geräts und Standard Normal Variate (SNV) Transformation. Mit einer bestimmten Anzahl an vorverarbeiteten Spektren konnte anschließend ein Regressionsmodell erstellt werden, das sowohl die bereits existierenden, als auch künftig hinzukommende Daten in einen Zusammenhang brachte (Kessler, 2007).

Für die vorverarbeiteten Spektren wurden verschiedene Klassifikationsverfahren angewendet. Um signifikante Unterschiede unter den Spektren zu erkennen, wurden zwei statistische Methoden angewendet: der gepaarte  $t$ -Test und PCA (Hauptkomponentenanalyse, engl.



*principal component analysis*). Die Diskriminanzanalyse zwischen Tumoren und Nicht-Tumoren war mit der Anwendung der PLS-DA (Diskriminanzanalyse mit kleinsten partiellen Quadraten, *engl. partial least squares discriminant analysis*) möglich.

### 2.4.1 Spektrenvorverarbeitung

In den Rohspektren sind außer den schwachen Raman-Signalen auch verschiedene Störfaktoren enthalten, die die zu untersuchende Wellenzahlenregionen beeinflussen oder gar überlagern und deshalb herausgefiltert werden müssen. Dazu gehören kosmische Peaks, die durch das Aufprallen der Hochenergiepartikeln auf den CCD-Sensor entstehen sowie die Basislinie des CCD-Sensors selbst, Fluoreszenz des untersuchten Hautareals und weißes Gaussches Rauschen (Bocklitz et al., 2011).

In einem ersten Schritt erfolgte eine Wellenlängenkalibration, um die beschränkte Gitterposition des Spektrometers zu kompensieren. Dazu wurde ein Spektrum der Fluoreszenz-Deckenbeleuchtung aufgenommen, das charakteristische Krypton Emissionslinien enthielt. Anhand der bekannten Emissionslinienposition konnte die Wellenlängenskalierung des Spektrometers kalibriert werden.

Der breitbandige Untergrund, der aufgenommenen Spektren ist sowohl auf Eigenfluoreszenz der Haut, als auch auf Fluoreszenz der optischen Komponenten des Messaufbaus zurückzuführen. Dieser Untergrund wurde durch eine Hintergrundfunktion abgezogen, die ein Polynom dritter Ordnung und das Spektrum einer zuvor aufgenommenen Leermessung enthielt. Kosmische Peaks wurden hingegen entfernt, indem die betroffenen Bereiche an die benachbarten Intensitätswerte angeglichen wurden (Kessler, 2007).

Da die Empfindlichkeit des Messsystems Wellenlängenabhängig ist, wurden die Spektren durch ein zuvor aufgenommenes Halogenspektrum geteilt, das im Detektionsbereich konstant verläuft.

Das Hintergrundrauschen, das hauptsächlich aus optischem Schrotrauschen besteht, konnte mit einem sogenannten Savitsky-Golay-Algorithmus geglättet werden (Bocklitz et al., 2011). Dabei werden die Daten mit einer Polynomfunktion angepasst. Zunächst wurde eine

Intervallgröße gewählt und anschließend die zentralen Spektrenwerte des Intervalls durch die des Polynoms ersetzt. Um die Spektrenstruktur zu erhalten, mussten die Glättungsintervalle klein gehalten werden, um die Gefahr des Überglättens (die Banden können „verschmelzen“) zu vermeiden (Kessler, 2007). Anschließend wurden die Spektren auf den  $300\text{--}1750\text{ cm}^{-1}$  Bereich beschnitten.

Eine Intensitätsnormierung wurde ebenfalls durchgeführt, da die Haut inhomogen ist und sich die Raman Intensitäten der einzelnen Messungen daher stark unterscheiden. Wie bereits erwähnt, hängt die Absorption und Streuung unter anderen von der Wellenlänge ab (s. 1.5 Die Wechselwirkung von Licht und Gewebe), wobei die Streuung mit zunehmender Laserwellenlänge abnimmt. Eine Standardisierung der Spektren erfolgte durch die Standard Normal Variate (SNV) Transformation. Hierfür wurde der Mittelwert jedes Spektrums vom Spektrum selbst abgezogen und durch die Standardabweichung der Spektren geteilt. Das ergibt für jedes Spektrum einen Mittelwert von null (Zentrierung) und eine Standardabweichung von eins (Kessler, 2007).

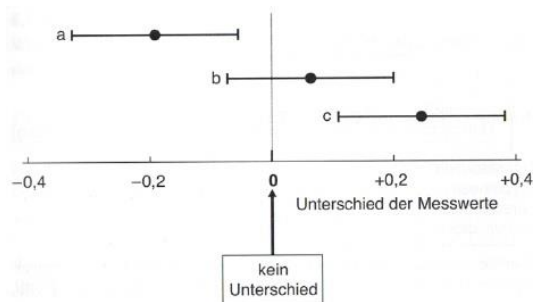
### 2.4.2 Der gepaarte *t*-Test

Bei einem *t*-Test handelt es sich um einen mathematischen Hypothesentest, der zwei voneinander abhängige Stichproben untersucht, ob sich die beiden Gruppen unterscheiden lassen und ob die Unterschiede auf den zufälligen Messfehlern basieren (Nullhypothese) oder signifikant unterschiedlich sind (Alternativhypothese). Stammen die Stichproben von mehreren Patienten mit etwa gleichen Merkmalen, sind sie voneinander abhängig. Für die Durchführung eines doppelten *t*-Tests berechnet man zunächst die Mittelwerte für jede Stichprobe und dann das 95%-Konfidenzintervall für die Differenz der beiden Mittelwerte. Bei einem gepaarten *t*-Test handelt man umgekehrt: zunächst werden die Änderungen zwischen den Messgruppen einzeln berechnet, um dann für den Mittelwert dieser Änderungen das 95%-Konfidenzintervall festzulegen. Dabei nimmt man an, dass die Messungen von beiden Gruppen normalverteilt sind und gleiche Standardabweichung haben. Die Faktoren, die einen Einfluss auf den doppelten *t*-Test haben, sind:

- Umfang der Stichproben: je mehr Messungen durchgeführt werden, umso schmaler das Konfidenzintervall und eine Signifikanz wahrscheinlicher

- Die Standardabweichung bzw. die Datenstreuung: je größer sie ist, umso unwahrscheinlicher ist die Signifikanz; die Datensätze können in ihrer Gesamtheit zwar stark streuen, aber die einzelnen Veränderungen streuen weniger
- Mittelwerte der „Hautveränderung“: je weiter die Mittelwerte von der Null entfernt liegen, desto wahrscheinlicher ist das signifikante Ergebnis

Das Konfidenzintervall wird nun überprüft: wenn es keine Null enthält, sind die Unterschiede der beiden Gruppen signifikant, was auf der Abbildung 6 zu erkennen ist (Rowe, 2012):



*Abbildung 6:* Interpretation der Ergebnisse: die Konfidenzintervalle a und c lassen sich als signifikant unterschiedlich interpretieren, im Konfidenzintervall b liegt die Null, ist also nicht signifikant (Rowe, 2012).

### 2.4.3 Hauptkomponentenanalyse

Die Hauptkomponentenanalyse (*engl. Principal Component Analysis, kurz PCA*) wurde in der RaDiag-Studie für die Bestimmung von Störfaktoren im Rahmen der Voruntersuchungen verwendet. Die PCA ist ein multivariantes Analyseverfahren, dessen Ziel ist es, aus einer multidimensionalen Datenmenge die Hauptkomponenten, auch Faktoren genannt, in einem orthogonalen System zu präsentieren und somit große Datensätze zu reduzieren. Die Mehrzahl von Variablen wird zunächst in einem multidimensionalen Koordinatensystem als Punktezahlen (*scores*) visualisiert, wobei jede Hauptkomponente (*engl. principal component*) eine eigene Koordinatenachse beansprucht. Dabei enthält PC1 die größte Varianz des Datensatzes, PC2 weniger und bei dem letzten PC dominiert das Rauschsignal. Bei dieser Methode ist die Zusammenstellung der Variablen so oft möglich, bis eine signifikante Hauptkomponente in Erscheinung tritt. Diese kumuliert die Punktezahlen zu einer „Wolke“.

Für jede Gruppe wird anschließend eine zu ihr orthogonale virtuelle Fläche konstruiert, die als die Grenze bei der Gruppenzuweisung dient (Krafft et al., 2009).

### 2.4.4 PLS-DA

Die Diskriminanzanalyse mit kleinsten partiellen Quadraten (*engl. partial least squares discriminant analysis*) ist ein statistisches Klassifikationsverfahren, das für die Unterscheidung zwischen bösartigen Hautveränderungen und der normalen Haut bzw. Alternativbefunden gewählt wurde. Im Vorfeld der RaDiag Derma-Studie wurde eine vergleichbare gynäkologische Studie (Zusammenarbeit der LMTB Berlin, Klinik für Gynäkologie Berlin Universitätsmedizin Berlin, Gyn-Zentrum Berlin und Technische Universität Berlin) durchgeführt, die ex vivo zervikale intraepitheliale Neoplasien Raman-spektroskopisch untersucht hat (Reble et al., 2014). In den Raman-spektroskopischen Messsystemen beider Studien wurden eine identische Anregungswellenlänge und dadurch vergleichbare epitheliale Eindringtiefe aber ein anderer experimenteller Aufbau angewendet. In der gynäkologischen Studie wurden fünf binäre Klassifikationsmethoden erprobt:

1. Hauptkomponentenanalyse (PCA) mit Logistischer Regression (LR)
2. PCA mit Nächste-Nachbarn-Klassifikation (KNN)
3. Wavelet-Transformation (WT) mit LR
4. WT mit KNN
5. Diskriminanzanalyse mit kleinsten partiellen Quadraten (PLS-DA)

Die Differenzierung der Spektren von dem histologisch bestätigten Tumorgewebe mit dem normalen Gewebe wurde, wie bei der RaDiag Derma-Studie, mit balanced accuracy (BAC)-Werten ausgedrückt. Die BAC-Werte wurden mithilfe von jedem oben aufgeführten Verfahren berechnet. Alle Klassifikationsverfahren wurden miteinander verglichen. Im Ergebnis gab es keine signifikanten Unterschiede, es hat sich kein Vorteil zugunsten eines bestimmten Verfahrens herausgestellt. Aus diesem Grunde fiel die Entscheidung, in der RaDiag Derma-Studie die PLS-DA anzuwenden, die eine etablierte Klassifikationsmethode darstellt.

Die PLS-DA beinhaltet eine Datenreduktionsmethode, die der PCA ähnelt. Diese wird oft in der Chemie, Pharmazie und Lebensmittelindustrie verwendet. Mittels PLS-DA lassen sich die Zusammenhänge zwischen den Variablen in beliebiger Anzahl erschließen (Schendera, 2014). Hierfür wird in einem Koordinatensystem eine Ausgleichskurve für die Daten bestimmt und

für jede Variable der vertikale Abstand von der Kurve berechnet. Die Abstandswerte der Variablen werden nun quadriert und addiert. Das Endergebnis stellt ein Maß für die Anpassungsgüte dar, wobei je kleiner die Zahl, desto klarer das Klassifikationsmodell der gesammelten Datensätze (Rowe, 2012).

### 2.4.5 Die Datenauswertung

Das wichtigste Ziel der RaDiag-Studie besteht in der Einschätzung der Zuverlässigkeit des angewendeten Verfahrens. Dies erfolgt durch die die Bestimmung von Spezifität und Sensitivität anhand des Vergleichs mit dem Goldstandard. Diese können mithilfe einer Wahrheitsmatrix in der Tabelle 2 dargestellt werden:

Tabelle 2: Wahrheitsmatrix für Die RaDiag-Studie.

	Wahrer Zustand (Goldstandard)	
	kein Hauttumor	Tumor
Raman-Messung Negativ	richtig negatives Ergebnis (RN)	falsch negatives Ergebnis (FN)
Raman-Messung Positiv	falsch positives Ergebnis (FP)	richtig positives Ergebnis (RP)

Die Werte der Sensitivität und Spezifität werden, wie folgt, berechnet:

- Spezifität beschreibt die Wahrscheinlichkeit einer korrekten Klassierung bei nicht erkrankten Patienten und in Bezug auf alle in der Studie gemessenen Patienten wird sie folgendermaßen berechnet:

$$\text{Spezifität} = \frac{\text{Anzahl richtig negativer Erg. (RN)}}{\text{Anzahl richtig negativer Erg. (RN)} + \text{Anzahl falsch positiver Erg. (FP)}} * 100\%$$

- Sensitivität beschreibt die Wahrscheinlichkeit einer korrekten Klassierung bei erkrankten Patienten und wird mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Sensitivität} = \frac{\text{Anzahl richtig positive Erg. (RP)}}{\text{Anzahl richtig positiver Erg. (RP)} + \text{Anzahl falsch negativer Erg. (FN)}} * 100\%$$

Im Falle, wenn sich die Gruppen der gesunden und kranken Patienten nicht vollständig trennen lassen, entsteht eine Überlappung:

- Falsch-negative Rate = 1-Sensitivität
- Falsch-positive Rate = 1- Spezifität

Ein Schwellenwert stellt dabei eine Grenze zwischen den kranken und gesunden Patienten. Ein niedriger Schwellenwert minimiert zwar die die Anzahl von falsch-negativen Patienten, aber das positive Ergebnis erhalten sowohl richtig-positive als auch viele falsch-positive Patienten, was eine niedrige Spezifität und ferner ein hoher Kostenfaktor für weitere diagnostische Tests bedeutet. Bei einem hohen Schwellenwert hingegen steigt die Wahrscheinlichkeit der falsch-negativen Patienten, die mit einer geringen Sensitivität einhergeht und ein Risiko für die Patienten darstellt.

Für die Bestimmung der Rate von richtig klassifizierten Tumoren und normaler Haut wird in der RaDiag-Studie eine balancierte Korrektklassifikationsrate (*balanced accuracy*, kurz: BAC) berechnet (Bergmeir et al., 2014):

$$BAC = 0,5 * \left( \frac{RN}{RN + FP} + \frac{RP}{RP + FN} \right)$$

(RP-richtig positiv, RN-richtig negativ, FP-falsch positiv, FN-falsch negativ).

## **2.5 Voruntersuchungen**

Vor Beginn der Studie wurde eine Reihe von Voruntersuchungen durchgeführt, um mögliche Störfaktoren zu erkennen, damit diese in der RaDiag-Studie vermieden oder minimiert werden können. Im Gegensatz zu einem stationären Raman-Spektrometer kann es bei einer beweglichen Messoptik häufiger zu einer fehlerhaften Messung aufgrund einiger externen Einflussfaktoren kommen. In einer Voruntersuchung wurden verschiedene Fehlerquellen simuliert (unterschiedliche Faserverbiegung, Einfluss von unterschiedlichen Umlichtintensitäten, Vorbehandlung der Haut, Veränderung von Anpressdruck, Wasserimmersion, Hautinhomogenität, Hautbehaarung sowie Haut nach einer intensiveren Sonnenexposition) und deren Einfluss auf die Qualität und Reproduzierbarkeit der Messungen untersucht (Schleusener et al., 2015a).

### **2.5.1 Faserbiegung**

Eine Verformung der Glasfaser könnte eine Verschlechterung des Auflösungsvermögens oder eine Vergrößerung des Kerndurchmessers der Faser zur Folge haben. Das Kabel, in dem die Glasfaser verläuft, wurde in verschiedenen Biegegraden verformt, um die Datentransmission der Glasfaser zu untersuchen: die Halbkreise mit verschiedenen Durchmessern von 75 bis 37 mm wurden geformt und die Spektren bei den Messungen untersucht. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass kein signifikanter Transmissionsverlust vorliegt und die Abweichungen der Einzelmessungen im Zuge der Vorverarbeitung der Rohspektren korrigiert werden konnten und somit vernachlässigbar sind. Damit kann eine kalkulierbare Biegung in einer klinischen Anwendung gewährleistet werden (Schleusener et al., 2015a).

### **2.5.2 Veränderung der Umlichtintensität**

Obwohl eine Umlichtabschattung an die Raman-Sonde angebracht ist, können nicht alle Lichtstrahlen aus der Messumgebung abgefangen werden. Das nicht abgeschattete Licht trägt zur Überlagerung der schwachen Raman-Banden bei. Für die Probemessungen wurden verschiedene Lichtbedingungen vorbereitet: dunkler Raum, starkes Deckenlicht, schwaches Deckenlicht, starkes Sonnenlicht im Raum, schwaches Sonnenlicht im Raum und eine LED-Beleuchtung. Die Messungen zeigen, dass sowohl das starke Deckenlicht als auch Tageslicht

viel stärkere spektrale Effekte als die untersuchte Haut verursacht, die nicht herausgefiltert werden können. Die deutlichste Variabilität zwischen den Lichtquellen ist in der Region  $1350\text{ cm}^{-1}$  und  $1540\text{ cm}^{-1}$  zu erkennen, die der Krypton-Emission entspricht; die Absorptionslinie in den Wellenlängenregionen  $1200\text{ cm}^{-1}$  und  $1630\text{ cm}^{-1}$  bei Tageslicht wurden ebenfalls beobachtet. Das Außenlicht verändert sich je nach Tageszeit und verursacht Schatteneffekte, was zu den Veränderungen in der detektierten Lichtintensität führt. Aus diesem Grunde werden die Patientmessungen in der Studie in einem Raum mit möglichst schwachen Sonnenlicht und einer LED-Raumbelichtung ohne Emission im Detektionsbereich durchgeführt (Schleusener et al., 2015a). Ein versehentliches Betreten des Untersuchungsraums während einer Messung soll ebenfalls vermieden werden. Um dies zu gewährleisten, ist ein Warnschild an die Tür anzubringen.

### **2.5.3 Veränderung des Anpressdrucks**

Die richtige Applikation der Raman-Sonde auf die Haut ist eine wichtige Voraussetzung für die Informationsgewinnung aus dem zu untersuchenden Hautfragment. Es wurden drei verschiedene Anpressdrücke untersucht: ein schwacher, moderater und starker. Eine zu starke Applikation kann die Blutzirkulation beeinträchtigen; außerdem könnte sich für den Diagnostiker der zur Haut senkrechte Halt von stabilem und konstantem starkem Anpressdruck mit dem Messkopf als schwierig erweisen und für den Patienten unkomfortabel sein. Die mechanischen Schäden oder sogar Verletzungen von verkrusteten oder pathologisch veränderten Gewebe sollen auch nicht in Kauf genommen werden. Auf der anderen Seite könnte ein zu schwacher Haut-Sonde-Kontakt ein Nichtauslösen des Lasers zur Folge haben; bei der Auslösung, aber einem ungenügenden Kontakt der Abschattung zur Haut, wird das Licht große Schwankungen bei den Messungen verursachen. Daher wurde in der Studie ein moderater, senkrecht zur Hautoberfläche ausgerichteter, stabiler Anpressdruck angewendet.

### **2.5.4 Körperbehaarung**

Die Körperbehaarung könnte die Messungen stark beeinflussen. Das in den Haaren enthaltene Melanin tritt ebenfalls in der Haut auf und daraus könnte man falsche Rückschlüsse über die Haut ziehen. Während die Körperbehaarung bei einer Frau mit dem Hauttyp I bis IV in der Regel helle, wenig bis moderat pigmentierungsintensive und weiche Haare aufweist, sind bei



den Männern dickere und längere Behaarung sowie die Bartbehaarung im Gesicht zu beobachten. Die Messung von Letzteren könnte sich aus zwei Gründen als besonders schwierig erweisen: zum Einen stellt die Kopfhaut die meist UV-exponierte Körperregion dar (d. h. die Messungen am Kopf sind am häufigsten) und zum Anderen kann eine kräftige Behaarung die Distanz zwischen der Hautoberfläche und der Raman-Sonde vergrößern, was eine Signaldetektion aus der Nähe von der Basalmembran verhindern würde. Aus diesen Gründen empfiehlt es sich, vor der Messung die Haare vorsichtig mit der Schere oder einem Rasierer zu entfernen.

### **2.5.5 Sonnenexposition**

Die sonnenexponierten Hautpartien haben einen höheren Melaningehalt im Vergleich zu den mit Kleidung bedeckten Arealen. Das könnte möglicherweise falsch-positive Hinweise auf pathologische Veränderungen liefern. In den Voruntersuchungen hat man die Haut am gebräunten Nacken und die Referenzstelle knapp unter dem Kragen untersucht. Die Unterschiede in den Melanin-Raman-banden waren zwar sichtbar, jedoch in der Standardabweichung von der sonnengeschützten Haut (Schleusener et al., 2015a). Die sonnenexponierte Haut ist von einer dauerhaften Hautexposition, der Hyperkeratose, abzugrenzen. Diese weist eine erhöhte Anzahl an neuen Fluorophoren auf, die einen Störungsfaktor darstellen (Kollias et al., 1988). Damit die Hautpigmentierungsunterschiede an demselben Patienten die Messungen nicht beeinflussen, wurde in der Studie als Referenz normale Haut aus unmittelbarer Tumornähe gemessen, um Differenzspektren aus Läsion und normaler Haut zu berechnen (Schleusener et al., 2015a).

### **2.5.6 Hautunterschiede an verschiedenen Körperstellen**

Wie bereits beschrieben (s. [Kapitel 1.3](#)), variiert die Hautdicke je nach Körperstelle und Grad der Sonnenexposition; auch exogene Faktoren oder Erkrankungen verändern sie auf dem biochemischen Niveau. In der Voruntersuchungsgruppe hat man drei verschiedene Stellen (Rücken oben, Bein und Wange) an elf Probanden gemessen und dabei große Unterschiede bei den Spektren bemerkt. Um die Ergebnisse der *In-vivo*-Studie möglichst genau beurteilen zu können, ist es wichtig, die Referenzmessungen aus dem Radius von wenigen Zentimetern um die zu untersuchende Läsion zu erfassen (Schleusener et al., 2015a). In einigen Fällen, z. B. im

Gesicht, am Ohr oder durch hyperkeratotisch veränderte Haut, ist es nicht möglich, in der Tumornähe ausreichende Fläche an gesundem Hautareal als Referenz zu messen. In solchen Fällen hat sich in der Studie die Messung dergleichen Stelle auf der anderen Körperhälfte bewährt.

### 2.5.7 Hautinhomogenität auf dem zellulären Niveau

Die Spektrenunterschiede können sich auch dann ergeben, wenn dasselbe Hautareal gemessen wird. Dies gilt insbesondere dann, wenn kleine Spotgrößen für die Messsonde gewählt werden; einzelne Zellen können als Ausreißer in der sonst homogenen Zellmenge zu den Spektrenabweichungen führen (Short et al., 2006). In vielen Studien hat man sich zwar für einen Messspot von einigen Mikrometern entschieden (Nijssen et al., 2007, Lieber et al., 2008b, Keller et al., 2008), aber durch die gewählte Messspotgröße von ca. 100  $\mu\text{m}$  zum Einem die Überhitzung von Haut vermieden und zum anderen das Signal über eine größere Menge von Zellen integriert. Dadurch konnten die „Ausreißereffekte“ eliminiert werden. Diese Spotgröße war allerdings zu klein, um sichtbare Inhomogenitäten, wie Haarfollikel, superfizielle Blutgefäße, zu vernachlässigen (Schleusener et al., 2015a).

### 2.5.8 Hautvorbehandlung

Das Eincremen der Haut mit diversen Pflegemitteln oder Make-up sowie das Auftragen von Salben oder topischen Medikamenten vor der Messung stellt sich als sehr problematisch dar, weil zum Einen die Berücksichtigung der Zusammensetzung von diesen Mitteln zu großen Aufwand bei der Studie bedeuten würde und zum Anderen die aufgetragene Menge nicht kontrollierbar ist. Außerdem verändern die Medikamente die biochemische Hautstruktur, demzufolge ist so vorbehandelte Haut nicht für eine Referenzmessung geeignet. Die Haut wird in der Dermatologie allerdings oft mit Filzstiften markiert, um z. B. die Resektionsränder festzulegen. In den Voruntersuchungen wurden der rote und schwarze Marker, Hautcreme, Desinfektionsmittel und Sonnenschutz auf das Schweineohr *ex vivo* aufgetragen. Die größten Abweichungen von der unbehandelten Haut wurden bei den Markern ( $1360\text{ cm}^{-1}$ ), wo der Peak in der Region  $1660\text{ cm}^{-1}$ , der für primäre Amide charakteristisch ist, nicht sichtbar ist, sowie dem Sonnenschutz ( $1610\text{ cm}^{-1}$ ) beobachtet, hingegen waren die Unterschiede bei der Verwendung vom Desinfektionsmittel und Hautcreme nicht signifikant (Schleusener et al.,

2015a). Aufgrund der signifikanten Unterschiede, die sich aus der Hautvorbehandlung ergeben können, wurden die Messungen in der RaDiag Derma-Studie nur an den nicht vorbehandelten Hautpartien durchgeführt.

### **2.5.9 Wasserimmersion**

Das Wasser als Immersionsmedium zwischen Messsonde und Haut könnte theoretisch die Spektralabweichungen innerhalb der Untersuchung von demselben Hautareal minimieren, insbesondere wenn ein gleichmäßiger Kontakt zur Haut nicht möglich ist. Der Test auf einem Hautmodell hat ergeben, dass dank der Wasserimmersion die mittlere Abweichung um 20% reduziert wurde, was die Reproduzierbarkeit der Messungen und dadurch die gesamte Messqualität deutlich erhöht. Allerdings muss dabei bedacht werden, dass dann alle Messungen in der gesamten Studie auf dieselbe Art durchgeführt werden, weil die Messungen mit und ohne Wasserimmersion signifikante Unterschiede aufweisen (Schleusener et al., 2015a). Dies könnte sich bei den schwer zugänglichen Stellen im Gesicht, etwa im Nasenbereich oder am Ohr, als schwierig erweisen, weil dort eine Verrutschungsgefahr mit der Sonde während der Messung besteht. In der Studie wurde deshalb auf die Immersionsmittel verzichtet.

## **2.6 Ergebnisse der Voruntersuchungen**

Der Einfluss von Störungsfaktoren wurde in Abbildung 7 dargelegt. Der stärkste Einfluss wird durch die Lichtverhältnisse verursacht, gefolgt von der Anwendung der Filzstifte und der Hautvorbehandlung. Die Einwirkung von Wasserimmersion, Sonnenexposition, Hautinhomogenität und die Messung unterschiedlicher Körperstellen ist in etwa auf dem gleichen Niveau.

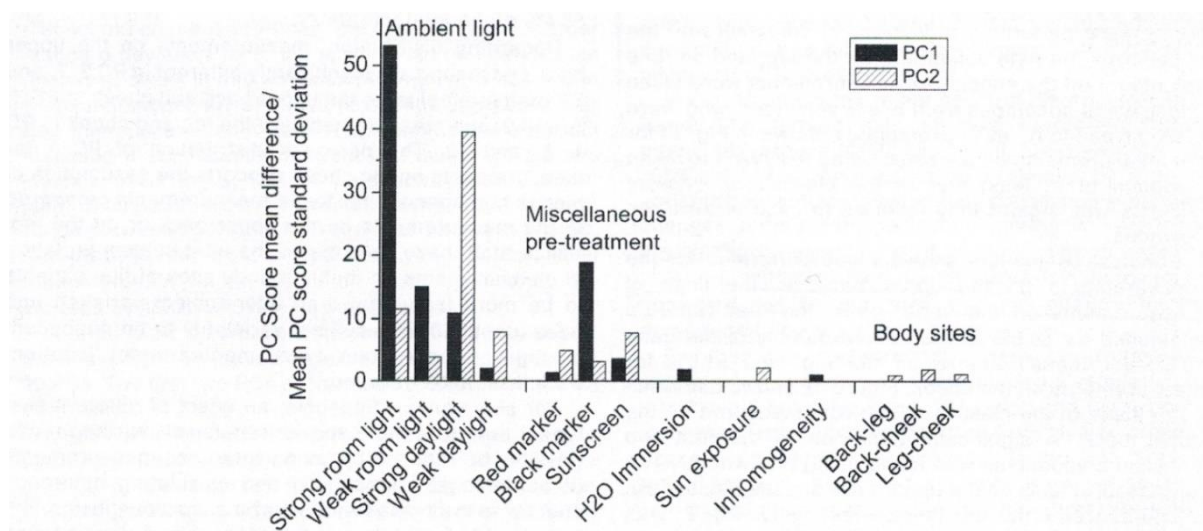


Abbildung 7: Signifikante mittlere Abweichungen der Prinzipalkomponenten (PC) 1 und 2 im Verhältnis zur Standardabweichung der individuellen Messungen (Schleusener et al., 2015a).

Die obig dargestellte Abbildung benennt von der linken Seite Faktoren, die einen signifikanten Einfluss auf die Messqualität haben. Dazu gehören vor allem die Lichtverhältnisse im Messraum. Die nächsten Faktoren in der Reihenfolge konnten entweder bereits vor der Patientenrekrutierung eliminiert werden (vorbehandelte Haut wurde nicht gemessen) oder wurden vermieden (Verzicht auf Wasserimmersion). Die richtige Einstellung der Lichtverhältnisse für die Studienuntersuchungen war insofern einschränkend, als das Messgerät, das obwohl für die Untersuchung in jedem beliebigen Raum im Krankenhaus transportfähig, in einem konkreten Raum aufgrund der Beleuchtung für die ganze Studienzeit platziert war. Der Messraum war abgedunkelt; für die Messzeit wurde das Decklicht aus- und das LED-Licht (mit einer Wellenlänge, die nicht stört) eingeschaltet. Die Faktoren von der rechten Seite der Abbildung haben einen geringen Einfluss auf die Messabweichungen, wie etwa Hautinhomogenität, Messungen an verschiedenen Körperstellen, variabler Anpressdruck oder Faserverbiegung. Ferner konnten konstante Umgebungsbedingungen sowie die gleiche Systematik bei der Ausführung des Messvorgangs den Anspruch auf die hohe Genauigkeit der Klassifizierung der Messungen positiv beeinflussen.

### 3 Ergebnisse

Alle Patientenmessungen fanden in der Zeit von 04.09.2012 bis 03.03.2014 in der Hautklinik der Charité Universitätsklinik Campus Mitte statt. An der Studie haben 113 Patienten teilgenommen, davon haben zwei Patienten nach der Aufklärung über das Vorgehen die Teilnahme noch vor der Messung widerrufen. Aus- und verwertbare Spektren stammen von 104 Patienten. Die Daten von sieben übrigen Patienten konnten nicht ausgewertet werden, weil:

- zwei Patienten nach der Messung nicht zur OP erschienen sind (und der histologische Befund fehlt)
- zwei Patienten vor der OP verstorben waren
- bei einem Patienten eine Verletzung der Läsion vorlag
- bei zwei Patienten nur zwei brauchbare Tumormessungen vorlagen

Es wurde nur eine verdächtige Läsion pro Patient gemessen. Bei mehreren Verdachtsdiagnosen hat der untersuchende Dermatologe jene zur Messung vorgeschlagen, bei der die charakteristischen Tumormerkmale am stärksten ausgeprägt waren und der positive Befund am wahrscheinlichsten auftritt. Als zusätzliche Referenzgruppe wurden außerdem die Messungen von 67 pigmentierten Nävi (PN-Gruppe) von 33 Probanden herangezogen.

#### 3.1 Histologische Befunde

Es wurden 36 Läsionen mit Verdacht auf MM gemessen, davon wurde der positive Befund bei 23 Fällen bestätigt. Bei weiteren Befunden dieser Gruppe wurden 3 BCCs diagnostiziert und somit in die BCC-Gruppe verschoben. Von 29 gemessenen SCC-verdächtigen Läsionen war der Befund bei 22 Fällen positiv; 2 weitere Läsionen wurden aufgrund des positiven BCC-Befund in die BCC-Gruppe verschoben. Von 39 gemessenen Läsionen mit Verdacht auf BCC waren 30 Fälle positiv und mit 5 zusätzlichen BCC-Befunden insgesamt 35 Fälle positiv. Die detaillierte Ansicht mit der Unterteilung auf Tumortypen befindet sich in der [Tabelle 3](#) sowie die Lageverteilung auf den [Abbildung 8](#) bis [Abbildung 10](#).

Tabelle 3: Die Übersicht über die Anzahl der positiven Befunde der untersuchten Tumorarten und ihrer Subtypen. Abkürzungen: VD-Verdachtsdiagnose,  $(\bar{y})$ -Medianwert, M.-Melanom, min-jüngste(-r) Patient(-in), max-älteste(-r) Patient(-in), CL-Clark Level, skleroderm.-sklerodermiform, oberfl.-oberflächlich, pigm.-pigmentiert. In der Spalte „VD“ wurde die ursprüngliche Anzahl der Patienten und nachträgliche Gruppenverschiebung vermerkt.

Tumortyp und die Subtypen	VD	Positiver Befund			Alter					
		Gesamt	Frauen	Männer	Frauen			Männer		
					min	max	$(\bar{y})$	min	max	$(\bar{y})$
<b>MM gesamt</b>	36-3	23	10	13	38	79	55,5	39	80	73
Superfiziell spreitendes M.		4	2	2	38	79	58,5	76	76	76
Noduläres M.		5	1	4	41	41	41	59	80	68,5
Lentigo-maligna M.		3	1	2	62	62	62	63	75	69
Akral-lentiginöses M.		1	0	1	0	0	-	77	77	77
keine Spezifizierung		10	6	4	39	72	55,5	39	78	64
<b>Tumordicke und CL</b>										
Melanoma in situ /CL I		3	1	2	58	58	58	39	63	51
≤7,5 mm, CL II		8	5	3	39	72	62	75	76	76
0,76-1,5 mm, CL III		4	1	3	79	79	79	63	80	78
1,51-3,0 mm, CL IV		5	3	2	38	53	41	65	77	71
>3mm, CL IV/V		3	0	3	0	0	-	59	73	64
<b>BCC gesamt</b>	39+5	35	21	14	45	92	69	45	87	71
knotiges BCC		6	2	4	65	73	69	45	76	68,5
Ulcus rodens		0	0	0	0	0	-	0	0	-
Ulcus terebrans		1	1	0	65	65	65	0	0	-

skleroderm. BCC		3	3	0	71	75	73	0	0	-
oberfl. BCC		7	4	3	51	82	74	66	78	68
pigm. BCC		2	1	1	54	54	54	60	60	60
keine Spezifizierung		16	10	6	45	92	58	68	87	79
<b>SCC</b>	29-2	22	6	16	57	79	69	51	89	80,5

Die Tabelle 3 umfasst alle in der Studie untersuchte Patienten, bei denen eine Verdachtsdiagnose bestätigt wurde. Die BCC-Gruppe verzeichnet die meisten positiven Befunde, wovon mehr Frauen (21) als Männer (14) betroffen waren. Das Medianalter bei den beiden Geschlechtern war ähnlich und betrug bei Männern 71 und bei Frauen 69. Ein knotiges (6-mal) und oberflächliches (7-mal) BCC waren die am häufigsten genannten Diagnosen in dieser Gruppe. Die MM-Gruppe ist die zweitgrößte Gruppe in der Studie, in der bei 10 Frauen und 13 Männern ein positiver Befund festgestellt wurde. Auffällig ist, dass sich das Medianalter von Frauen (55,5) und Männern (73) deutlich unterschied. Die Besonderheit bei der Untergliederung des MM besteht darin, dass sowohl die Typen dieser Tumorart als auch die Tumordicke erfasst wurden. Diese Unterteilung wurde bei der Diskriminanzanalyse allerdings nicht berücksichtigt, da zu wenige Fallzahlen zu jeweiliger Subgruppe vorlagen. Die Diagnose SCC wurde bei 6 Frauen und 16 Männern gestellt und das Medianalter lag entsprechend bei 69 und 80,5.

Da die Anzahl der positiven Befunde in jeweiligen Tumorguppen unterschiedlich ist, wurde die Verteilung aller gemessenen Hauttumoren zum Zweck der Objektivität sowohl mit absoluten Zahlen (Abbildung 9) als auch prozentuell (Abbildung 10) dargestellt.

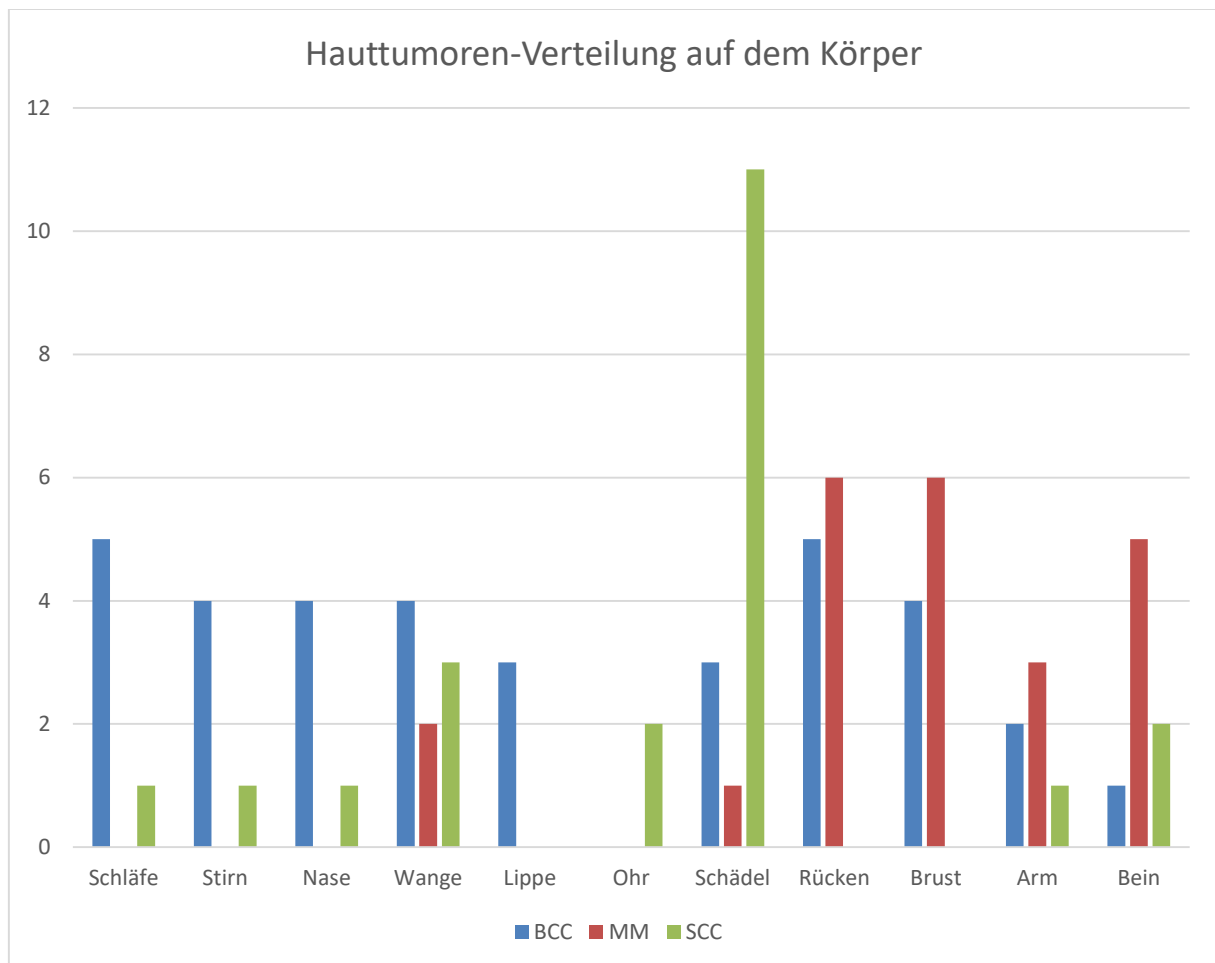


Abbildung 8: Die Verteilung der Hauttumoren auf dem Körper.



### 3 Ergebnisse

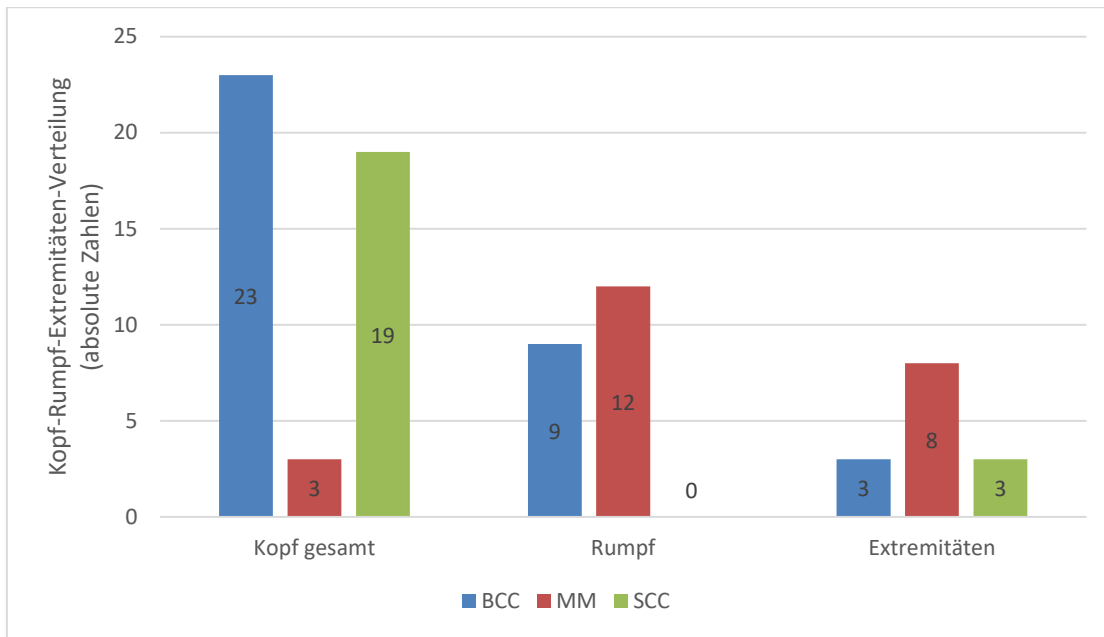


Abbildung 9: Verteilung der Hauttumoren - Verhältnis von Kopf, Rumpf und Extremitäten.

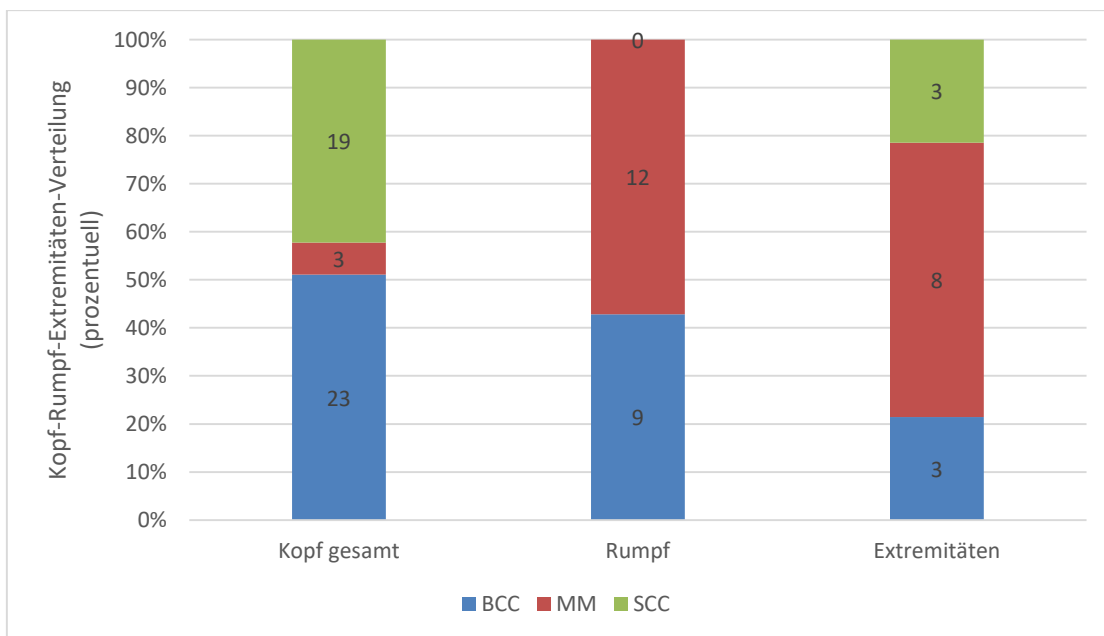


Abbildung 10: Verteilung der Hauttumoren - prozentuelles Verhältnis von Kopf, Rumpf und Extremitäten inklusive absoluter Zahlen.

Es wurden folgende Alternativbefunde histologisch bestimmt:

- viermal: Morbus Bowen
- dreimal: tumorfreie Nachexzisionen
- dreimal: dysplastische Nävuszellnävi
- zweimal: Verrucae seborrhoicae
- jeweils einmal: lentiginöses epidermoidales Nävuszellnävus, Lipom, Talgdrüsenadenom, Talgdrüsenhyperplasie, Lentigos solaris, Lentigo senilis, Lentigo simplex, dermaler Nävuszellnävus, kongenitaler Nävuszellnävus, Zyste, verruciformes Akanthom und Keratoakanthom

## 3.2 Vergleich der histologischen Befunde mit den statistischen Ergebnissen

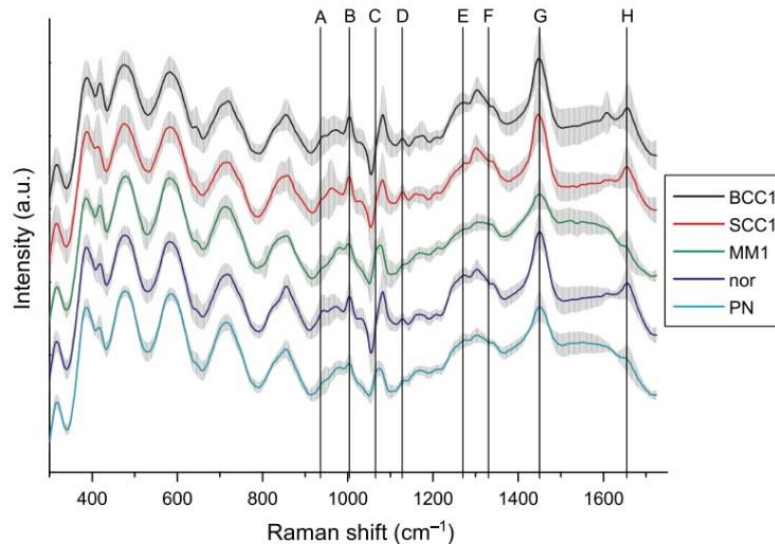
### 3.2.1 Raman-Spektren in der RaDiag-Studie

Die Studienergebnisse sind bereits in dem Artikel „In vivo study for the discrimination of cancerous and normal skin using fibre probe-based Raman spectroscopy“ (Schleusener et al., 2015b) veröffentlicht worden. Die Spektren wurden in folgende Gruppen unterteilt:

- BCC1 – histologisch bestätigte BCC-Befunde
- BCC0 – histologisch bestätigte Alternativbefunde bei Verdacht auf BCC
- MM1 – histologisch bestätigte MM-Befunde
- MM0 – histologisch bestätigte Alternativbefunde bei Verdacht auf MM
- SCC1 – histologisch bestätigte SCC-Befunde
- SCC0 – histologisch bestätigte Alternativbefunde bei Verdacht auf SCC
- NOR – normale Haut in der Tumornähe (keine histologische Bestätigung)
- PN – pigmentierte Nävi (keine histologische Bestätigung)

Die gemittelten Hauptspektren der Fingerprint-Region der Gruppen MM1, SCC1, BCC1, NOR sowie PN sind in der Abbildung 11 zu erkennen. Acht Schnittstellen der Mittelwertspektren der genannten Gruppen sind mit Buchstaben A bis H gekennzeichnet und stellen die auffälligen

Peaks dar, die miteinander verglichen wurden, um einen Intensitätsanstieg oder -abfall in jeweiliger Gruppe zu analysieren. Das biochemische Verhalten der Moleküle der ausgewählten Peaks wurde in der Tabelle 4 beschrieben. Anhand der Intensitätsveränderungen in einem bestimmten Wellenzahlbereich (sogenannte Peaks) lässt sich auf bestimmte pathologische Vorgänge im untersuchten Gewebe schließen.



*Abbildung 11:* Der Spektrenverlauf der untersuchten Tumorgruppen, als Referenzgruppen dienen gesunde Haut aus der Tumornähe sowie eine Nävi-Kontrollgruppe. Die Hauptspektren und die Standardabweichung  $1 \sigma$  der bestätigten Läsionen der BCC1 (n=105), SCC1 (n=66) und MM1 (n=69), sowie die Hauptspektren normaler Haut (nor, n=1026) und pigmentierter Nävi (PN, n=201). Charakteristische Raman-Banden konnten identifiziert werden: A: C-C-Streckschwingung bei Prolinen und Valinen, B: C-C-Streckschwingung und Ausdehnung/Kontraktion des Phenylalaninrings, C: Artefakte, D: Symmetrische C-C Streckschwingungen von Lipiden, E: C=N-Streckschwingungen und N-H- Deformationsschwingungen der tertiären Amide, F: C-H-Deformationsschwingungen von Adenin und Phenylalanin, G:  $\delta(CH_2)(CH_3)$  Deformations-

schwingungen von Lipiden und Proteinen, H: C=O-Streckschwingungen der primären Amide (Schleusener et al., 2015b).

Tabelle 4: Die identifizierten charakteristischen Raman-Banden in der RaDiag-Studie.

Wellenzahl ( $cm^{-1}$ )	Schwingungsart/beobachtete Erscheinung
1655	C=O-Streckschwingungen der primären Amide (H)
1450	Deformationsschwingungen von Lipiden und Proteinen (G)
1300-1330	C-H-Deformationsschwingungen von Adenin und Phenylalanin (F)
1270	C=N-Streckschwingungen und N-H- Deformationsschwingungen der tertiären Amide (E)
1030-1100	Artefakt aufgrund ungenügender Behebung des Rauschsignals (C)
1004	C-C-Streckschwingung und Ausdehnung/Kontraktion des Phenylalaninrings (B)
1128	Symmetrische C-C Streckschwingungen von Lipiden (D)
936	C-C-Streckschwingung bei Prolinen, Valinen und Peptidbindungen sowie backbone-Kette im Kollagen (A)

Es war nicht möglich, eine konkrete Peaks-Sequenz für eine bestimmte Tumorart zu extrahieren (so auch *Lui et al.2012*). Die stärkste Ramanbande ist in Region  $1450\text{ cm}^{-1}$  sichtbar, die mit Lipiden und Proteinen verbunden ist, wobei die Peakintensität am prominentesten bei SCC, BCC aber auch normaler Haut zu verzeichnen ist, gefolgt von Streckschwingungen von Kollagen und Elastin ( $1655\text{ cm}^{-1}$ ), die Streck- und Deformationsschwingungen tertiärer Amide ( $1270\text{ cm}^{-1}$ ) und den Biomolekülen Adenin und Phenylalanin ( $1300\text{-}1330\text{ cm}^{-1}$ ). Schwächere

Peaks konnten den Aminosäuren ( $1004\text{ cm}^{-1}$ ,  $936\text{ cm}^{-1}$ ) und Lipiden ( $1128\text{ cm}^{-1}$ ) zugeordnet werden (Schleusener et al., 2015b).

Die Veränderungen bei den primären und tertiären Amidien ( $1655$  und  $1270\text{ cm}^{-1}$ ) könnte ein Hinweis auf Proliferation von Tumorzellen geben, was sich durch Raman-aktive Schwingungen in Proteinen der malignen Hautläsionen erkennbar macht. Außerdem wird die Lipidkonzentration ( $1450\text{ cm}^{-1}$ ,  $1128\text{ cm}^{-1}$ ) und ein Anstieg der Nukleinsäureproduktion (in der RaDiag Derma-Studie Adenin) beobachtet, woraus man Rückschlüsse auf eine vermehrte Zellproliferation ziehen könnte (Kourkoumelis et al., 2015).

Deutliche Peak-Unterschiede sind zu erkennen, wenn man die MM-Gruppe mit der PN-Gruppe bzw. MM- mit BBC1+SCC1-Gruppe vergleicht. Dies ist auf die Tatsache zurückzuführen, dass das Melanin charakteristische Banden hervorhebt, die in den nicht pigmentierten Tumoren nicht vermehrt vorkommen:  $1360\text{-}1400$  sowie  $1570\text{-}1590\text{ cm}^{-1}$  (Zeng et al., 2008, Schleusener et al., 2015b). In der RaDiag-Studie konnte man einen kleinen Intensitätsanstieg in der erstgenannten und einen großen in der zweitgenannten Bandbreite beobachten. Die Differenzierung zwischen der MM1- und PN-Gruppe wird durch den Intensitätsverlust in Region  $1450\text{ cm}^{-1}$  bei dem PN-Spektrum deutlich und wurde auch von Huang et al. (2004) berichtet (Schleusener et al., 2015b).

#### **3.2.2 Differenzierung des Malignen Melanoms**

Signifikante Differenzierung zwischen MM1- und MM0-Gruppe konnte nicht erreicht werden, die *BAC* beträgt lediglich 60% (Schleusener et al., 2015b). Aufgrund der von der optischen Anordnung resultierenden Oszillationen in den Wellenzahlen unterhalb  $1100\text{ cm}^{-1}$  wurde die Datenanalyse teilweise auf den Wellenzahlenbereich  $1100\text{-}1730\text{ cm}^{-1}$  beschränkt.

Tabelle 5: Sensitivität, Spezifität und BAC für die Diskriminierung des MM von anderen Messgruppen (Schleusener et al., 2015b). Abkürzungen:  $\nu$ -Wellenzahlbereich, BAC-balanced accuracy, Sens-Sensitivität, Spez-Spezifität,  $>/<1$  mm- Tumordicke dicker/dünner als 1 mm, MM1-histologisch bestätigte Maligne Melanome, MM0-histologisch bestätigte Alternativbefunde in der gesamten Melanomgruppe, PN-pigmentierte Nävi (Schleusener et al., 2015b).

Untersuchte Gruppen	Sens (%)	Spez (%)	BAC	Spektrenanzahl	Anzahl der Läsionen
<b>MM0 vs. MM1</b>	52	67	60	30/69	10/23
$\nu > 1100 \text{ cm}^{-1}$	72	60	66	30/69	10/23
<b>PN vs. MM1</b>	87	94	91	201/69	33/23
$\nu > 1100 \text{ cm}^{-1}$	91	91	91	201/69	33/23
$\nu < 1100 \text{ cm}^{-1}$	81	84	83	201/69	33/23
$> 1 \text{ mm}$	85	97	91	201/27	33/9
$< 1 \text{ mm}$	77	89	83	201/30	33/10
<b>PN vs. MM0</b>	63	85	74	201/30	33/10
$\nu > 1100 \text{ cm}^{-1}$	60	89	75	201/30	33/10
$\nu < 1100 \text{ cm}^{-1}$	67	79	73	201/30	33/10

Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der MM1- und der MM0-Gruppe gemessen werden ( $P=0,15$ ). Den recht niedrigen Wert bei der Differenzierung zwischen MM1- und MM0-Gruppe kann teilweise dadurch erklärt werden, dass die Exzidate in der MM0-Gruppe große Befundbreite aufweisen (verschiedene NZN-Arten, Verruca seborrhoeica, tumorfreies Nachexzidat, verschiedene Lentigo-Typen) und die Anzahl der Probanden bzw. Spektren gering ist. Ihre biochemische Zusammensetzung variiert stark, was sich auch in der Heterogenität der Spektren widerspiegelt hat. Dadurch war die Differenzierung gegen die (homogene) MM1-Gruppe schwierig.

Bei Differenzierung der MM1- gegen die PN-Gruppe hingegen wurden sehr gute Resultate erzielt: BAC=91%. Für Maligne Melanome mit der Eindringtiefe von mehr als 1 mm wurde ebenfalls der gleiche BAC-Wert erreicht. Bei der Beurteilung des Spektrums in den Wellenzahlen unterhalb  $1100\text{ cm}^{-1}$  und weniger als 1 mm wurden die Werte von BAC=83% erreicht. Dies kann erneut durch die Beeinträchtigung der spezifischen Fingerprintsignale durch Oszillationen zustande, die nicht vollständig entfernt werden konnten. *Lui et al.* (2012) hat hingegen die besten Spezifitäts- und Sensitivitätswerte erreicht, indem für die Diskriminierung von MM1 oder MM-Vorstufen gegen alle gemessenen benignen Tumoren die gesamte spektrale Breite von 500 bis  $1800\text{ cm}^{-1}$  bewertet wurde. Die Differenzierung der MM0- gegen die PN-Gruppe ergab die BAC=74% in der gesamten spektralen Breite, bei Wellenzahlen oberhalb  $1100\text{ cm}^{-1}$  beträgt die BAC 75%. Die MM0-Gruppe war zwar wieder inhomogen, aber im Vergleich zur Differenzierung der MM1- gegen PN-Gruppe konnte ein höherer Wert erreicht werden. Dies ist auf die Tatsache zurückzuführen, dass die Anzahl von Spektren mehr als siebenfach höher im Vergleich zur MM0-Gruppe ist, s. Tabelle 5.

#### 3.2.3 Differenzierung des Basalzellkarzinoms und des Plattenepithelkarzinoms

Im Gegensatz zum Vergleich zwischen der MM1- und der MM0-Gruppe konnte ein signifikanter Unterschied zwischen der BCC1- und der BCC0-Gruppe ( $P=0,001$ ), sowie zwischen SCC1- und SCC0-Gruppe ( $P=0,004$ ) beobachtet werden. Die Diskriminierung der SCC1- gegen die SCC0- sowie die BCC1- gegen die BCC0-Gruppe war mit den BAC- Werten von 40% und 51% in der gesamten spektralen Breite nicht erfolgreich. Das kann erneut durch die Vielfalt der Befunde in den SCC0- und BCC0-Gruppen erklärt werden. Der BAC-Wert für die SCC-Gruppen ist noch schlechter ausgefallen, weil sich die Anzahl der Referenzgruppe (SCC0) auf nur 5 Läsionen beläuft, davon hat jede einen anderen histologischen Befund: 2-mal M. Bowen, Lentigo solaris, verruciformes Akanthom sowie Keratoakanthom. Die Differenzierung der BCC1- und SCC1-Gruppen gegen normale Haut ergab hingegen höhere Werte und beträgt entsprechend BAC= 73% für BCC und sogar 85% für SCC in der gesamten spektralen Breite; für die höheren Wellenzahlen ab  $1100\text{ cm}^{-1}$  wurde für BCC BAC=72% und für SCC BAC=87% berechnet. Da histologische Befunde gezeigt haben, dass sich die Verdachtsdiagnose SCC durchaus als BCC entpuppen kann, ist es sinnvoll BCC1- und SCC1-Gruppen als Gesamtgruppe zu betrachten und sie gegen normale Haut aus der Tumorumgebung zu differenzieren: die BAC beträgt 78% (Schleusener et al., 2015b). Die BAC-Werte für die

Differenzierung normaler tumornaher Haut gegen die nicht-melanozytären Hauttumoren im Kopfbereich waren im Vergleich zur Differenzierung gegen Tumoren am ganzen Körper bei den BCCs niedriger (68% vs. 73%) und bei den SCCs höher (87% vs. 85%), s. Tabelle 6. Da die Messungen im Kopfbereich aufgrund vieler knöchernen Strukturen besonders anspruchsvoll waren, lässt sich daraus nicht schließen, ob diese Messungen das Ergebnis der gesamten Tumorgruppe negativ beeinflusst haben.

Tabelle 6: *Sensitivität, Spezifität und BAC für die Diskriminierung der BCC und SCC von anderen Messgruppen (Schleusener et al., 2015b). Abkürzungen: Sens-Sensitivität, Spez-Spezifität, BAC- balanced accuracy,  $v$ -Wellenzahlbereich, diff-Spektrentrenunterschiede zwischen Messungen an der Läsion und normaler Haut aus der Läsionsnähe wurden für die Diskriminierung genutzt, BCC1-histologisch bestätigte BCC-Befunde, BCC0-histologisch bestätigte Alternativbefunde in der gesamten BCC-Gruppe, SCC1-histologisch bestätigte SCC-Befunde, SCC0-histologisch bestätigte Alternativbefunde in der gesamten SCC-Gruppe, nor- normale Haut in der Tumornähe (Schleusener et al., 2015b).*

Untersuchte Gruppen	Sens (%)	Spez (%)	BAC	Spektrenanzahl	Anzahl der Läsionen
<b>BCC0 vs. BCC1</b>	54	48	51	27/105	9/35
<b>nor vs. BCC1</b>	63	83	73	624/105	104/35
<b><math>v &gt; 1100 \text{ cm}^{-1}</math></b>	71	72	72	624/105	104/35
nur Kopf	67	68	68	360/69	120/23
nur Rumpf	56	84	70	174/27	29/9
<b>SCC0 vs. SCC1</b>	52	27	40	15/66	5/22
<b><math>v &gt; 1100 \text{ cm}^{-1}</math></b>	44	20	32	15/66	5/22
<b>nor vs. SCC1</b>	80	89	85	624/66	104/22
<b><math>v &gt; 1100 \text{ cm}^{-1}</math></b>	82	91	87	624/66	104/22
<b><math>v &lt; 1100 \text{ cm}^{-1}</math></b>	73	88	81	624/66	104/22
nur Kopf	86	87	87	336/66	56/19
<b>nor diff vs. SCC1 diff</b>	74	71	73	312/66	104/22
<b>nor vs BCC1 + SCC1</b>	74	82	78	624/171	104/57



<b>BCC0 + SCC0 vs. BCC1 + SCC1</b>	53	29	41	42/171	14/57
--	----	----	----	--------	-------

### 3.2.4 Die Differenzierungen aller Tumorgruppen untereinander

Diese Differenzierungsart könnte bei einem jährlichen dermatologischen body-check angewendet werden, wenn sich der Facharzt der Verdachtsdiagnose nicht sicher ist: die verdächtige Läsion wird gemessen und mit Spektrendatenbanken von mehreren Tumorarten verglichen. Dies wurde in der RaDiag-Studie simuliert und ergab folgende Werte: bei BCC1- gegen SCC1-Gruppe beträgt BAC 70%, bei BCC- gegen MM1-Gruppe BAC= 77% und bei SCC1 gegen MM1 BAC=85%, s. Tabelle 7 (Schleusener et al., 2015b).

Tabelle 7: *Sensitivität, Spezifität und BAC für die Diskriminierung aller Tumorgruppen gegenseitig. Abkürzungen: Sens-Sensitivität, Spez-Spezifität, BCC1-histologisch bestätigte BCC-Befunde, SCC1-histologisch bestätigte SCC-Befunde, MM1-histologisch bestätigte MM-Befunde* (Schleusener et al., 2015b).

<b>Untersuchte Gruppen</b>	<b>Sens (%)</b>	<b>Spez (%)</b>	<b>BAC</b>	<b>Spektrenanzahl</b>	<b>Anzahl der Läsionen</b>
<b>BCC1 vs. SCC1</b>	74	66	70	105/66	35/22
<b>BCC1 vs. MM1</b>	80	79	77	105/69	35/23
<b>SCC1 vs. MM1</b>	83	86	85	66/69	22/23

## 4 Diskussion

### 4.1 Beurteilung der SCC- und BCC-Ergebnisse

Die Differenzierung der histologisch bestätigten BCC- und SCC-Gruppen gegen die angrenzende normale Haut war erfolgreich, wobei bei den BCCs die Beurteilung der gesamten spektralen Weite das beste Ergebnis brachte, während für die SCCs die höheren Wellenzahlen ausschlaggebend waren. *Lui et al.* (2012) haben mit der Beurteilung der gesamten spektralen Länge für die Differenzierung aller malignen Hauttumoren gegen Nicht-Tumore für die besten Resultate gesorgt, während bei anderen Studien (z. B. Shim et al., 2000, Molckovsky et al., 2003) der Wellenzahlbereich unterhalb  $1100\text{ cm}^{-1}$  nicht bewertet wurde (Schleusener et al., 2015b).

### 4.2 Beurteilung der MM-Ergebnisse

Die Diskriminierung der malignen Melanome gegen PN bei Beurteilung des höheren Wellenzahlbereichs war mit BAC=91% das beste Studienergebnis und ergab höhere Sensitivität als beim niedrigen Wellenzahlbereich oder bei Beurteilung der gesamten spektralen Breite. Zu derselben Schlussfolgerung kamen auch *Lui et al.* (2012). Die Unterschiede bei der Unterscheidung aufgrund verschiedener Invasionstiefen (weniger oder mehr als 1 mm) könnten dadurch erklärt werden, dass nicht alle Tumoreale gleichmäßig betroffen waren und die Messstellen einer geringeren malignen Veränderung darstellen konnten. Dies kann allerdings nicht verifiziert werden. Der hohe Differenzierungsgrad lässt sich zum Teil mit einer großen Anzahl von Messungen der PN erklären, die außerdem eine homogenere Gruppe darstellen als die Nicht-Tumorgruppe bei MM. Allerdings basieren die PN-Verdachtsdiagnosen lediglich auf klinischer Untersuchung; histologische Befunde dazu fehlen, was eine Limitation dieser Diskriminierung darstellt.

Bei der MM-Diagnostik soll darüber hinaus noch ein weiterer Aspekt erwähnt werden: die sonnenexponierten melanozytären Nävi könnten in den Sommermonaten ihre maligne Veränderung „vortäuschen“. *Welsch et al.* (2012) haben die dysplastischen Nävi untersucht, wobei die Verdachtsdiagnose entweder im Januar bei der ersten Gruppe oder August bei der

zweiten Gruppe gestellt wurde. Es wurde mit Hilfe von immunhistologischer Färbungen festgestellt, dass die Läsionen aus der ersten Gruppe mehr atypische Eigenschaften aufwiesen als die im Winter entfernten Läsionen; außerdem wurde beobachtet, dass die junktionale Komponente wahrscheinlicher und eine höhere Proliferationsrate in den Nävi gegeben war. Auch Fink et al. (2001) berichten, dass die Läsionen mit der junktionalen Komponente vermehrt in den Sommermonaten exzidiert werden. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde jedoch kein Unterschied in der Beurteilung des Dysplasiegrades in den Läsionen beobachtet. Inwieweit diese Erscheinungen die RaDiag-Untersuchungen beeinflusst haben könnten, lässt sich nicht abschließend feststellen. In der Tat wurde die Studie in allen Jahreszeiten durchgehend durchgeführt, wobei die MM-Verdachtsdiagnosen vermehrt in Sommermonaten stattfanden. Dennoch ist die Ganzjahr-Diagnostik vorzuziehen, da im Zweifel eine falsch-positive Verdachtsdiagnose als ein Übersehen eines beginnenden Hauttumors in Kauf genommen werden kann.

### 4.3 Einfluss der Spektrenanzahl auf das Ergebnis

Die größte Herausforderung bei der Entwicklung einer zuverlässigen nichtinvasiven RS-gestützten Methode besteht in der Gewinnung von möglichst vielen Spektren von sowohl malignen als auch benignen Hauttumoren. Lui et al. (2012) haben bei seiner *In-vivo*-Langzeit-Studie 453 Patienten untersucht. Bei der Diskriminierung von MM gegen benigne pigmentierte Läsionen die Sensitivität von 99% und die Spezifität von 15% erreicht. Die genannten Werte enthalten allerdings eine hohe Rate von falsch-positiven Ergebnissen. Bei Reduzierung der Sensitivität auf 90% wurde die Spezifität von 68% gemessen. In der RaDiag-Studie wurde hingegen trotz geringerer Fallzahlen bei der Diskriminierung der MM- gegen PN-Gruppen im Wellenzahlenbereich ab  $1100\text{ cm}^{-1}$  die bei Sensitivität von 91% eine viel höhere Spezifität von ebenfalls 91% gemessen.

In der Lui-Studie wurden bis zu 10 Läsionen an einem Patienten Raman-spektroskopisch gemessen, was eine Ansammlung von diversen Hautveränderungen für die Datenbank erheblich vereinfacht. In der RaDiag Derma-Studie hingegen konnte bei multiplen verdächtigen Läsionen nur eine Hautveränderung ausgewählt werden. Die Gewinnung der Spektren von benignen Tumoren und ihre Klassifizierung ist von Bedeutung, weil, wie die RaDiag-Studie gezeigt hat, die Nicht-Tumorbefunde biochemisch keine einheitliche Gruppe bilden. Ein

Problem bei der Spektrensammlung könnte allerdings dadurch bestehen, dass die benignen Läsionen, die bei der dermatologischen Hautuntersuchung auch als solche erkannt, in der Regel nicht exzidiert werden; es wäre also mit einem hohen Kostenfaktor aufgrund der zusätzlichen OPs sowie einem eingeschränkten Patientenkomfort verbunden. Ein Lösungsansatz liegt aus diesem Grund im Studiendesign: eine größere Patientenzahl, wo mehrere verdächtige Läsionen gemessen werden, erzeugt automatisch mehr Spektren von Alternativbefunden, die entsprechend klassifiziert werden können.

### 4.4 Inhomogenität von Hauttumoren

Die Inhomogenität von Hauttumoren gehört ebenfalls zu den wichtigen Faktoren, die einen großen Einfluss auf die Reproduzierbarkeit der Erfassung von Messspektren haben. Da binnen einer Tumorstruktur verschiedene Tumorgrade oder gar verschiedene Tumortypen auftreten können, wird sich diese Vielfalt durch eine breite Standardabweichung äußern (s. das graue Feld im Verlauf der Spektrenzahlen in der *Abbildung 11*). Dieser Wert kann sich negativ auf die Suche nach signifikanten Unterschieden zwischen den Gruppen auswirken. In der RaDiag-Studie wurde ein signifikanter Unterschied zwischen der BCC1- und der BCC0-Gruppe ( $P=0,001$ ), sowie zwischen SCC1- und SCC0-Gruppe ( $P=0,004$ ) beobachtet. Im Gegensatz dazu konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der MM1- und der MM0-Gruppe gemessen werden ( $P=0,15$ ).

Die Schwierigkeit bei dem Messvorgang in der RaDiag Derma-Studie bestand darin, dass möglicherweise solche Messstellen ausgewählt wurden, die nicht oder nicht nur den höchsten Dysplasiegrad repräsentieren, der erst aus histologischer Untersuchung ersichtlich wird. Es besteht auch die Gefahr, dass trotz mehrerer Messungen innerhalb der Tumorgrenzen ein Areal ohne Tumorzellen erfasst wurde, was die Aussagekraft über einen Tumor erheblich beeinträchtigt. Hingegen bezieht sich der histologische Befund immer auf den höchsten Dysplasiegrad, auch wenn dieser nur einen kleinen Teil des gesamten Tumors ausmacht.

### 4.5 Vergleich mit anderen Studien

Trotz eines immensen Fortschritts in der Entwicklung der RS-Methode bei der Hauttumordiagnostik besteht nach wie vor eine Problematik bezüglich der Vergleichbarkeit der

Studien. Die meisten RS-Studien wurden bis jetzt *ex vivo* anhand der Biopsien durchgeführt. Die Studien unterscheiden sich in vielerlei Hinsicht: Studiendesign (z. B. Patientenzahl, die untersuchten Tumortypen und Anzahl der Gruppen), der individuellen Zusammenstellung von Messgeräten und deren Handhabung, der Anregungswellenlänge des Lasers, der Spotgröße des Lasers und dessen Leistung, der Integrationszeit oder der Auswertungsmethode. Die technischen Unterschiede in der Konstruktion des Messsystems können die spektralen Phänomene, z. B. Peak-Intensität, -anstieg oder, seine Abwesenheit stark beeinflussen, während mit steigender Anzahl der Messungen die Testpräzision erhöht werden kann.

Ein wichtiger technischer Unterschied in den RS-Studien besteht in der Wahl der Anregungswellenlänge des Lasers, weil damit die Intensität der Raman-Streuung und die Hintergrundfluoreszenz zusammenhängen. Die Intensität der Raman-Streuung, die sich aus der Formel  $\mu_s \sim \frac{1}{N\lambda^4}$  ergibt, ist bei niedrigen ultravioletten Wellenlängen entsprechend höher als im Infrarotbereich. Aus diesem Grund kann es durch die Anwendung von Lasern mit einer Anregungswellenlänge aus dem UV-Bereich am menschlichen Gewebe zu einer Gewebsschädigung kommen. Dabei muss man allerdings beachten, dass bei einer Anregungswellenlänge im ultravioletten Bereich die Eindringtiefe nur wenige Mikrometer beträgt, hingegen erreicht man mit infraroter Wellenlänge die Subkutisbereiche (Steiner, 2013). Außerdem ist die Autofluoreszenzrate des Gewebes bei einer niedrigen Wellenlänge höher als bei einer Wellenlänge aus dem nah-infraroten Bereich (z. B. 785 nm oder 830 nm). Bei der Wellenlänge im Bereich 1064 nm gibt es zwar ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis (*engl. signal to noise ratio*), aber es erfordert längere Bestrahlungszeiten und eine verlängerte Erfassungszeit von Spektren. Aus diesen Gründen sind die Wellenlängen aus dem nah-infraroten Bereich von 785 bzw 830 nm vorzuziehen (Devpura et al., 2014, Kourkoumelis et al., 2015).

### 4.5.1. *In-vitro*-Studien

Bei den *In-vitro*-Studien sind die Messungen an den histologischen Schnitten praktisch unbegrenzt möglich. Das Messgerät kann stationär platziert und die diagnostische Ausführung einer Studie patientenunabhängig (abgesehen von der Biopsieentnahme) gestaltet werden. Dadurch kann der Einfluss von externen Faktoren, wie Umlicht und Tageszeit der Messungen, optimal angepasst werden; die Messdauer, die Integrationszeit sowie die praktische Organisation der Studie beeinflussen weder den Tagesablauf der Krankenstation noch der

Dermatochirurgen. Diese Bedingungen bieten eine Möglichkeit, eine große Spektrendatenbank zu sammeln. Die Nutzung bereits vorhandener Datensätze aus einer *In-vitro*-Studie als Klassifikationsmodell in einer prospektiven Studie würde sich allerdings schwierig gestalten, denn das Hinzufügen der Spektren, die z. B. unter anderen äußeren Bedingungen gemessen wurden, würden das Diskriminanzmodell verändern und somit verfälschen (Bodanese et al., 2012). Anhand der ausgewählten *In-vitro*-Studien (s. Tabelle 8) werden die Vor- und Nachteile dieser Herangehensweise erörtert.

Tabelle 8: *Ausgewählte In-vitro-Studien, bei denen RS angewendet wurde. Abkürzungen: MRDF-maximum representation and discrimination fracture, SMLR-spacse multinomial logistic regression.*

Arbeitsgruppe	untersuchte Hautläsionen und deren (Spektr-) Anzahl	Methode	techn. Parameter (Wellenlänge, Spotgröße, Integr.-Zeit, optischer Leiter)	Klassifikationsmethode
Nijssen et al. (2007)	17 Läsionen und 9 Referenzstellen aus der gesunden Haut	RS	720 nm; 1 mm; 10 s und 60 s; Quarzglas	LDA (Linear Discriminant Analysis)
Bodanese et al. (2012)	4 MM, 29 BCC, 15 normale Haut	RS	830 nm; 2 mm <sup>2</sup> ; 20 s; Glasfaser	PCA (Principal Component Analysis)
Silveira et al. (2012)	Spektren: normale Haut (30), BCC (96), MM (19)	RS	830 nm, 2 s	Linear Last-Squares fitting model
Gniadecka et al. (2004)	MM (22), PN (41), BCC (48), SCC (23), normale Haut (89)	FT-RS	1064 nm; 0,1 mm; 1-2 s	Neuronale Netze
Lieber et al. (2008a)	Insges. 39 Präparate; 17 (normale Haut), 8 (BCC), 7 (SCC), 7 (MM)	Konfokale RS	825 nm; 0,1 mm; 30 s; multimodale optische Faser	MRDF und SMLR

Ein großer Nachteil der fasergekoppelten RS-Geräte, die die Spektren im Fingerprint-Bereich detektieren, ergibt sich nämlich durch ein starkes Fluoreszenz-Hintergrundsignal, das in der Glasfaseroptik erzeugt wird. Nijssen et al. (2007) haben die Diskriminierung von BCC gegen gesunde Haut entgegen des Trends, die Wellenzahlen Fingerprint-Bereich zu detektieren, im hohen Wellenzahlenbereich ( $2800-3125\text{ cm}^{-1}$ ) mithilfe einer an das Raman-Spektrometer

gekoppelten Quarzglasfaser untersucht und Sensitivität von 100% sowie Spezifität von 99% (Messdauer eines Spektrums: 60 s) erreicht. Der Vorteil dieser Vorgehensweise besteht darin, dass die Fluoreszenz bei einer synthetischen Quarzglasfaser praktisch nicht vorhanden ist. Aus diesem Grund ist ein relativ einfaches Design des optischen Leiters ohne weitere Filter möglich, in dem der Laserstrahl ins Gewebe geleitet und das gestreute Licht direkt zum Spektrometer zurückgeführt wird.

Gniadecka et al. (2004) haben die Spektren verschiedener Hautläsionen im sehr breiten Wellenzahlenbereich ( $200\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ ) untersucht und stellten fest, dass die prominenten Peaks im Spektrenverlauf die Veränderungen in Proteinen und Lipiden darstellen, was mit den Erkenntnissen der RaDiag-Studie übereinstimmt. Die Sensitivität und Spezifität wurde mit Hilfe von neuronalen Netzen bestimmt und beträgt  $96 \pm 3\%$  und  $94 \pm 3\%$  für normale Haut,  $78 \pm 6\%$  und  $97 \pm 2\%$  für PN,  $85 \pm 5\%$  und  $99 \pm 1\%$  für MM,  $98 \pm 2\%$  und  $98 \pm 2\%$  für BCC sowie  $96 \pm 3\%$  und  $100 \pm 0\%$  für SK. Beachtlich sind vor allem sehr hohe Sensitivitätswerte bei der Spezifität, die nie unter 91% liegen, was die Anzahl der falsch positiven Ergebnisse deutlich reduziert.

Bodanese et al. (2012) haben sich zum Ziel gesetzt, die Differenzierung von BCC und MM gegen normale Haut zu optimieren. Mit Hilfe der PCA-Methode konnten schon mit den 4 ersten Prinzipalkomponenten (*PCs*) über 95% aller Spektren zugeordnet werden, die vorwiegend Protein-, Lipid- und Melaninveränderungen charakterisieren. Die Sensitivität und die Spezifität von den zusammengeführten BCC- und MM-Spektren gegen die normale Haut liegt bei 99,1% und 93,3% und von BCC gegen MM bei 68,4% und 97,9%. In Übereinstimmung mit der Gniadecka-Forschungsgruppe stellten sie fest, dass die erhöhte Aktin-Intensität auf ihre Expression hindeutet, was eine Rolle bei der Organisation und Wachstum des BCC spielt. Erhöhte Aminbanden geben Hinweise auf die Matrix-Metalloproteinaseaktivität, die einen enzymatischen Abbau des Kollagens durch Zerstörung der Kollagenfaser und Verringerung der Extrazellulärmatrix auslöst (Bodanese et al., 2012). Der Kollagenabbau sowie die Aktinzunahme wurden auch bei Silveira et al. (2012) beobachtet. In dieser Studie wurden ebenfalls die BCC und MM im Vergleich zur normalen Haut untersucht. Ferner sollte ein Spektrenmuster für jede untersuchte Tumorgruppe und normale Haut bestimmt werden, das auf der durch die Raman-Spektroskopie geschätzten biochemischen Zusammensetzung des Gewebes (vor allem bestimmten Proteinen, Lipiden, Aminosäuren und Nukleinsäuren) basiert.

Für die Diskriminanzanalyse wurde das lineare Regressionsverfahren gewählt. Die Spektren wurden im Wellenzahlenbereich  $400\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$  gemessen. Mit Hilfe der Spektrenmessungen wurden jeder untersuchten Gruppe die für sie charakteristischen Spektren zugeordnet. Bei normaler Haut waren das Aktin, Kollagen, Elastin, gesättigte und ungesättigte Fettsäuren und Phospholipide. Bei der BCC-Gruppe wiederholten sich die Substanzen, hatten allerdings unterschiedliche Intensitäten; außerdem konnte ein erhöhter Lipidgehalt festgestellt werden. Bei der MM-Gruppe wurde eine starke Melaninfluoreszenz beobachtet und die Spektren ähnelten denen der normalen Haut. Bei den MM-Biopsien wurde ein im Vergleich zu BCC erhöhter Kollagen- und Elastingehalt bemerkt; dies könnte auf die Tatsache zurückgeführt werden, dass die Veränderungen der Hautmelanome ursprünglich in der Basalmembran stattfinden, um später tiefer zu infiltrieren. Die für die MM charakteristische Bande, die auf den Melaningehalt zurückzuführen sind, treten in der RaDiag-Studie nicht auf (Schleusener et al., 2015b). Im zweiten Schritt wurde ein Klassifikationsmodell konzipiert, das die Diskriminanzanalyse der prägnantesten Substanzen in den untersuchten Gruppen in Form von einer Punktwolke ermöglicht. Zum Einen wurde das Aktin mit den Nukleinsäuren und zum Anderen Kollagen III mit Elastin und Melanin verglichen. Die Sensitivität und Spezifität beim ersten Fall betrug entsprechend 98,2% und 93,3% und beim zweiten Fall 98,2% und 96,6%, wobei die Diskriminanz für normale Haut gegen beide Tumorgruppen (MM+BCC) berechnet wurde (Silveira et al., 2012).

Ebenfalls haben sich Lieber et al. (2008a) mit der Diskriminierung von malignen Hauttumoren gegen normale Haut beschäftigt. Eine Besonderheit zeichnet diese Studie dadurch aus, dass hier alle Präparate auch in verschiedenen definierten Tiefen im  $20\text{ }\mu\text{m}$ -Intervall untersucht wurden, von der Oberfläche beginnend bis zur Tiefe von  $100\text{ }\mu\text{m}$  reichend. Es wurden die Spektren im Wellenzahlenbereich  $600\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$  miteinander verglichen. In der normalen Haut dominierten die Spektren des Kollagen, Elastin, Keratin und der Lipide. Die Spektren der MM-Gruppe ließen sich deutlich von den anderen Hauttumoren unterscheiden; die Unterschiede zwischen normaler Haut, BCC und SCC waren subtiler. Die Intensität der Bande, die dem Tryptophan, dem Phenylalanin und den tertiären Amidgruppen sowie den  $\text{CH}_2$ -Bindungen (in den Lipiden und Proteinen) zugewiesen sind, variiert je nach Tiefe und ist für maligne Tumoren und Haut unterschiedlich. Die Peaks der primären Amide (in Proteinen und Lipiden) und des Tryptophans in  $1650$  und  $1550\text{ cm}^{-1}$  war höher als im normalen Gewebe. Die Werte von Sensitivität und Spezifität der Spektren der Hautoberfläche liegen bei nahezu 100%; wobei nur



ein Spektrum falsch klassifiziert wurde. Allerdings je tiefer der Schnitt untersucht wurde, desto mehr Abweichungen von den histologischen Befunden wurden festgestellt. Diese Methode erlaubt somit einen Ausblick in die biochemischen Veränderungen in unterschiedlichen Tiefen des Hautgewebes. Während eine *In-vitro*-Untersuchung solche genauen Messungen ermöglicht, ist es direkt am Patienten bei einer längeren Integrationszeit nicht denkbar (Lieber et al., 2008a).

Die oben aufgeführten Studien zeigen deutlich, dass die Raman-Spektroskopie eine objektive diagnostische Methode, die weder eine Färbung noch spezielle Vorbehandlung der Präparate benötigt, für die schnelle Diskriminierung der Hauttumoren darstellt. Eine weitere Errungenschaft dieses Verfahrens besteht in seiner Objektivität, d. h. die Diskriminanzanalysen wurden ohne ärztliche Hilfe (außer histologische Befunde als Vergleich zum Goldstandard) erreicht; die Ergebnisse können mit den Vorhersagefähigkeiten eines erfahrenen Facharztes konkurrieren, der im Rahmen einer Ganzkörperuntersuchung die Verdachtsdiagnosen stellt (Cassileth et al., 1986, Chen et al., 2001). Für ein *In-vitro*-Verfahren, wie bei einer histologischen Diagnostik, ist eine zwar eine Biopsie, allerdings keine Färbung nötig, wodurch die Befunde schneller erhoben werden könnten. Dennoch ist das RS-Verfahren in dieser Form nicht innovativ genug und zu kostenintensiv dazu, deshalb wird es wahrscheinlich nicht im Klinikalltag etabliert.

### 4.5.2 *In-vivo* -Studien

Die *In-vivo*-Studien stellen eine große Chance dar, die Etablierung eines nichtinvasiven diagnostischen Verfahrens in Echtzeit in die dermatologische Praxis einzubringen. Da nicht jede verdächtig aussehende Läsion gleich einen Hauttumor bedeutet und auch nicht alle regulär aussehenden Hautveränderungen gutartig sind, bedarf es außer einem geübten Auge eines Facharztes einer objektiven, die Diagnosestellung unterstützenden Methode, die bei der ja- oder nein-Entscheidung für eine histologische Absicherung zur Verfügung steht.

Grundsätzlich ist für die Untersuchung der malignen Melanome eine Sensitivität von ca. 90% nötig, um gegenüber einem erfahrenen Dermatologen (mithilfe eines Dermatoskopen) zu bestehen (Vestergaard et al. 2008).

Ein solches Verfahren bietet eine Echtzeituntersuchung, bedarf keiner speziellen Vorbehandlung oder Färbung des Gewebes, wodurch der Patientenkomfort erhöht wird. Die Applikation des Laserstrahls wird bei den meisten *In-vivo*-Studien mit Hilfe eines biegsamen optischen Faserleiters gewährleistet, wodurch auch schwer zugängliche Körperstellen erreicht werden und außerdem beschränkt sich die Messdauer auf eine bis wenige Sekunden (Lieber et al., 2008b).

Bis jetzt haben sich nur wenige Forschungsgruppen mit der Anwendung von RS *in vivo* und in Echtzeit auseinandergesetzt. Die unten aufgelisteten Studien (s. Tabelle 9) verschaffen einen Überblick über die wichtigsten Aspekte dieser Untersuchungen und dienen als Vergleich zur RaDiag-Studie.

Tabelle 9: Ausgewählte *In-vivo*-Studien, bei denen RS angewendet wurde.

Arbeitsgruppe	untersuchte Hautläsionen und deren (Spektr-) Anzahl	Methode	techn. Parameter (Wellenlänge, Spotgröße, Integr.-Zeit, optischer Leiter)	Klassifikationsmethode
Lui et al. (2012)	MM (44), BCC (109), SCC (47), AK (32), SK (114), versch. Nävi (172)	RS	785 nm; 3,5mm; <1s; Glasfaseroptik	PC-GDA und PLS-DA
Lieber et al. (2008b)	BCC (9), SCC (4), entzündetes Narbengewebe (9), normale Haut (21)	Konfokale RS	825 nm; 400 µm; 30 s; Glasfaseroptik	SMLR ( <i>sparse multinomial logistic regression</i> )
Silveira et al. (2015)	Spektr: BCC (133), SCC (30), AK (57), benigne Läsionen (14) und normale Haut (250)	RS	830 nm; 170 µm; 20 s; Glasfaseroptik	PLS-DA und PCA-DA
Philipsen et al. (2013)	normale Haut (55), BCC (25), PN (41), MM (15)	FT-RS	1064 nm; 100 µm; optische Faser	<i>Binary Logistic Regression</i>

Eine bereits erwähnte kanadische Gruppe (Lui et al., 2012) hat eine Langzeitstudie für die Diagnostik von verschiedenen Hautkrebsarten und benignen Hautveränderungen durchgeführt. Die Diskriminierung von MM gegen pigmentierte Läsionen bzw. gegen seborrhoische Keratosen war hoch und ergab eine Sensitivität von 90% und eine Spezifität von 68%; die Unterscheidung aller Hauttumoren samt aktinischer Keratosen gegen benigne Läsionen erreichte die Spezifität von 64% bei einer Sensitivität von 90%. Die hohe Patientenzahl in der Studie hat u. a. ermöglicht, aktinische Keratose (Präkanzerose für den hellen Hautkrebs) in

die Diskriminanzanalyse miteinzubeziehen. Die MM-Diskriminierung, genauso wie bei der RaDiag-Studie, wurde bei der Auswertung der höheren Wellenzahlen ( $> 1100 \text{ cm}^{-1}$ ) erreicht.

Lieber et al. (2008b) haben im Zuge der weiteren Forschungen (vgl. 4.5.1. In-vitro-Studien) die Diskriminierung der Hauttumoren und möglichen Tumorrezidiven in der Exzisionsregion geprüft. Wie in der RaDiag-Studie wurde hierfür eine spezielle, mit der Hand bedienbare Messsonde entwickelt. Die Ergebnisse zeigten eine hundertprozentige korrekte Klassifizierung aller malignen Läsionen sowie der entzündlichen Hautareale bei einer Spezifität von 91%. Die Hauptspektren, die für die Diskriminanzanalyse verwendet wurden, stammten, wie bei vielen Studien (Schleusener et al., 2015b, Gniadecka et al., 2004, Silveira et al., 2012, Bodanese et al., 2012), von Proteinen und Lipiden. Außerdem stellten sie fest, dass sich das entzündliche Gewebe und BCC mit dem von ihnen angewendeten Diskriminanzmodell gut von anderen untersuchten Tumoren unterscheiden lassen, während SCC eine Ähnlichkeit mit normaler Haut aufweist.

Silveira et al. (2015) konnten die Spektrenunterschiede für Lipide, Proteine (Kollagen, Elastin, Aktin) und Nukleinsäuren erkennen. Sie verglichen benigne Nävi sowie normale Haut mit den Hauttumoren BCC, SCC und aktinischen Keratosen und haben dabei die Spezifität von 89,1% und Sensitivität von 91,1% erzielt.

Signifikante Unterschiede in den Wellenzahlen von Wasser, tertiären Amidien (Proteinen) sowie einem Protein-Lipid-Verhältnis hat eine andere Forschungsgruppe erkannt (Philipsen et al., 2013). Dabei ergab ihre Testgenauigkeit (keine Unterscheidung auf Sensitivität und Spezifität) bei der Diskriminierung von MM und normaler Haut 93,3%, bei BCC gegen normale Haut 88% und bei PN gegen normale Haut 84,2%. Darüber hinaus sind sie einen Schritt weitergegangen und haben die gesuchten Hautläsionen bei Probanden aus jeder Pigmentierungsgruppe nach Fitzpatrick (I-VI) gemessen. Dabei wurde eine klare Korrelation zwischen Hintergrundfluoreszenz und der Hautpigmentierung festgestellt, was die Befürchtung im Vorfeld der Untersuchungen für die RaDiag-Studie und letztendlich ein Ausschlussgrund war. Trotzdem wurden für jede Patientengruppe dieselben Peak-Unterschiede in Raman-Banden beobachtet.

Die Studienbeispiele zeigen deutlich, dass die Raman-Spektroskopie in der *In-vivo*-Diagnostik sehr gute Ergebnisse bei einem hohen Patientenzuspruch erzielt und somit ein vielversprechendes Anwendungspotential für die Zukunft darstellt. Allerdings muss eine wichtige Limitation dieses Verfahrens näher betrachtet werden. Einerseits sollen den Patienten die Wartezeit für die Befunde sowie die hohen Kosten für sehr häufige Exzisionen erspart bleiben, weil geschätzt wird, dass ca. 80% der Biopsieentnahmen, die mit der Verdachtsdiagnose „maligne“ eingestuft werden, sich histologisch als benigne entpuppen (Jones et al., 1996, Gniadecka et al., 2004). Andererseits darf es nicht zu einer Situation kommen, dass für ein Malignes Melanom, das durch ein schnelles und destruktives Wachstum, Metastasenbildung sowie niedrige Überlebensraten (s. 1.4.3 Malignes Melanom) charakterisiert wird, ein falsch-negatives Ergebnis angezeigt wird. Es ist zwar möglich, in den Diskriminanzmodellen eine nahezu hundertprozentige Sensitivität einzustellen, was aber wiederum zu den recht niedrigen Spezifitätswerten führt. In der oben erörterten kanadischen Studie (Lui et al., 2012) wurden die Spezifitätswerte für 99%tige Sensitivität berechnet und betragen je nach Diskriminierung 15-25%. Aufgrund hoher falsch-positiver Raten gibt es keinen großen Vorteil gegenüber dem histologischen Goldstandard.

Damit sind die in der RaDiag-Studie erreichten Sensitivitätswerte für maligne Melanome mit den aufgeführten *In-vivo*-Studien vergleichbar. Sie rangieren auf dem Niveau eines erfahrenen Dermatologen. Es ist auch anzunehmen, dass die Differenzierung von Basalzellkarzinomen sowie Plattenepithelkarzinomen durch Messung höherer Patientenzahl mit dieser Verdachtsdiagnose sowie Zufügen weiteren Spektrendaten von Alternativbefunden höhere BAC-Werte ergeben würde.

Obwohl die nichtinvasive RS-Methode ein vielversprechendes Verfahren mit großem Potential darstellt, können solche Geräte aus oben genannten Gründen nicht als autonome Diagnoseapparatur gesehen und angewendet werden und bedürfen weiterer intensiven Forschung.

### 4.5.3 Kombinierte Messverfahren

Wie im Kapitel 4.5.2 *In-vivo* -Studien bereits dargelegt, erzeugt die RS allein bis dato noch keine zufriedenstellende Sensitivität/Spezifität, was weiterhin eine zu hohe Anzahl von

Biopsien mit sich bringen würde. Das Potential der Raman-Spektroskopie könnte allerdings durch andere nichtinvasive spektroskopische (wie Rückstreuungsspektroskopie und Autofluoreszenz) oder optische Methoden (z. B. OCT) erhöht werden. In der Tabelle 10 wurden Studienbeispiele aufgeführt, in deren eine simultane Anwendung von RS mit anderen Methoden in Echtzeit geprüft wurde.

Tabelle 10: *Kombinierte RS-Verfahren.*

Arbeitsgruppe	untersuchte Hautläsionen	Methode	techn. Parameter (Wellenlänge, Spotgröße, Integr.-Zeit, optischer Leiter)	Probandenzahl/ Anzahl der Läsionen/ Spektrenanzahl
Huang et al. (2005)	Tumorgewebe und normale Haut	RS und Autofluoreszenz	785 nm; 200 µm; 5s; Glasfasersonde	32 Spektren (16 vom gesunden und 16 vom malignen Gewebe)
Zakharov et al. (2015)	MM, BCC, SCC, normales Gewebe	RS und Rückstreuverfahren	785 nm; 100 µm; 5s; Glasfasersonde	45 Proben (9 MM, 9 BCC, 1SCC, 27 gesunde Biopsien)
Kong et al. (2013)	BCC	RS und Autofluoreszenz	k.A., 100 µm; 2s; k.A.	22 Proben

Zakharov et al. (2015) haben für die Erkennung der Hauttumore eine multimodale Methode entwickelt, bei der mit Hilfe von Rückstreuungsspektrometrie (engl. backscattering, kurz: BS) die Tumorränder detektiert werden können; für die Darstellung der 3-D-Struktur eines Tumors wurde OCT angewendet und die Bestimmung der Tumorart erfolgte mit RS. Die Anwendung von OCT erlaubt zwar eine sehr detaillierte Inhomogenitätsanalyse auf der histologischen Ebene, aber einzelne Tumorarten lassen sich schwer unterscheiden; eine Ausnahme stellt BCC dar, da die charakteristischen „Zellnester“ gut differenzierbar sind, was in der Literatur bestätigt wird (Ulrich et al., 2016, Ulrich, 2016). Der Vorteil der multimodalen Methode besteht in der Durchlässigkeit der BS- und RS-Signale bei simultaner OCT-Anwendung. Die Spezifität bei der multimodalen Methode für MM betrug 93%, was geringfügig besser im Vergleich zur RaDiag-Studie ausgefallen ist, während die Sensitivität bei 89% lag, was bei der RaDiag-Studie für Wellenzahlen oberhalb  $1100\text{ cm}^{-1}$  etwas höher lag. Das kombinierte Verfahren hat bei der BCC-Diagnostik mit Sensitivitäts- und Spezifitätswerten von 100% und 96% ausgezeichnete Ergebnisse ergeben, die im Vergleich zur RaDiag-Studie deutlich höher sind (Zakharov et al., 2015).

Zwei andere Forschungsgruppen (Krackowizer P. and Brenner, 2008, Huang et al., 2005, Kong et al., 2013) haben sich mit einem Kombinationsverfahren befasst, bei dem RS und Autofluoreszenz simultan angewendet werden. Bei der ersteren Gruppe wurde ein murines Modell verwendet, indem den Mäusen unter die Haut Fibrosarkom-Zellen implantiert wurden. Das Ziel bestand in der Unterscheidung zwischen dem gesunden und Tumorgewebe. Die Untersuchung erfolgte für jedes Verfahren getrennt sowie in Kombination, wobei für das Letztere die Rohspektren ausgewertet wurden. Es hat sich gezeigt, dass das Kombinationsverfahren mit Spezifität und Sensitivität von 100% und 93,8% die besten Ergebnisse ergeben hat. Die Autofluoreszenz ist dank der Fluorophore, wie Porphyrin, Melanin oder Kollagen und Lipide, zwar für die Detektion von biochemischen und morphologischen Veränderungen im Gewebe gut geeignet, aber konkrete Vorgänge lassen sich anhand des Spektralverlaufs schwer festhalten - es ist eher ein Plateau als einzelne Peaks wie bei RS erkennbar (Huang et al., 2005). Die RS hingegen lässt konkrete biochemische Vorgänge mit charakteristischen Peaks erkennen; das RS-Signal ist allerdings sehr schwach. In den meisten Studien (auch der RaDiag-Studie), wird das Autofluoreszenz-Signal herausgefiltert, doch die beiden Methoden haben das Potential, um erfolgreich komplementär angewendet zu werden. Die britische Forschungsgruppe (Kong et al., 2013) ist einen Schritt weitergegangen und hat das Kombinationsverfahren RS und Autofluoreszenz während der mikrographisch kontrollierten Chirurgie (sog. Mohs-Chirurgie) von BCC genutzt. Dabei wird das Tumorgewebe eingefroren, mit HE-Färbelösung eingefärbt und Schicht für Schicht histologisch kontrolliert, um die exakten Tumorränder zu bestimmen und um minimale Verluste des umliegenden gesunden Gewebes zu gewährleisten. Allerdings ist die Mohs-Chirurgie in der Form sehr kostspielig und zeitaufwendig. Außerdem beruht die Diagnose auf der subjektiven Beurteilung der Tumordarstellung. Die Diagnosestellung während der Studie erfolgte anhand eines Klassifikationsmodells, das bereits in den Voruntersuchungen festgelegt wurde (Sensitivität 100%, Spezifität 92%). Die Auswertung der Vorgangsabläufe hat ergeben, dass die Versorgung eines Patienten bei einer Operation im Vergleich zu den klassischen Färbemethoden viel schneller erreicht werden konnte. Außerdem bedurfte es weder weiterer Gewebeaufbereitung noch Färbung der Resektate.

Die obigen Beispiele machen deutlich, dass die multimodalen Techniken eine sehr hohe Chance auf die klinische Routineanwendung haben. Eine wichtige Limitation des RS-Verfahrens, die

relativ niedrige Spezifität bei sehr hoher Sensitivität, konnte bei Zakharov et al. sowohl für MM als auch BCC bei dem Kombinationsverfahren im Vergleich zur alleinigen RS-Anwendung verbessert werden. Bei der unabhängigen Anwendung von OCT sowie Rückstreuung sind die Ergebnisse ebenfalls schlechter ausgefallen. Bei Kong et al. konnte die Dauer des spektralen Raster-scans optimiert werden, indem die Vorauswahl der charakteristischen Fluorophore mit dem Autofluoreszenzverfahren getroffen wird (Kong et al., 2013). Aus diesen Studien wird ersichtlich, dass die Möglichkeit, spektrale und bildgebende Verfahren in einer Vorrichtung zu vereinen, zu einer effizienteren Hauttumordiagnostik beiträgt.

## 4.6 Die Störfaktoren bei dem Messvorgang und Fehleranalyse

Die Resultate der RaDiag-Studie sind mit ähnlichen *In-vivo*-Studien vergleichbar, dennoch gab es Faktoren, die negativ den Messungsablauf und die Gewinnung von optimalen Sensitivitäts- und Spezifitätswerten beeinflusst haben könnten und in kommenden Studien berücksichtigt werden sollten.

Trotz der sorgfältigen Vorbereitung des Messablaufs und Messdurchführung könnten sich während einer Patientenuntersuchung folgende Fehler ergeben haben:

- Die Messsonde konnte nicht über 10 s Integrationszeit exakt in derselben Position und/oder dem Winkel von 90° zur Hautoberfläche bleiben.
- Die Messsonde konnte trotz der Trockenlegung des Messumfelds aufgrund der Hautfeuchtigkeit, des Schweißes oder Sebumaustritts (insbesondere in der Nasen-Stirn-, Kinn- und Wangenregion) ihre Ausgangsposition ändern.
- Eine ungewollte Patientenbewegung konnte den Sonde-Haut-Kontakt beeinträchtigen und ändern.
- Knochige Kopfareale, insbesondere Stirn, Schläfen und Hirnschädel begünstigen ein Wackeln der Messsonde.
- Bei den Messungen der Naseregion war die Abschirmung des Messspots aufgrund der anatomischen Gegebenheiten unzureichend.
- Die Abschirmvorrichtung der Messsonde konnte die exakte Wiedergabe der zuvor gewählten Messposition behindern.
- Veränderung des Anpressdrucks bei einer der drei Messstellen einer Läsion.
- Die gekennzeichneten Messstellen auf den Tumorfotos konnten der wirklichen Lage in den histologischen Schnitten nicht zugeordnet werden.



Die Studien, bei denen Raman Spektroskopie angewendet wurde, unterscheiden sich stark, was die Integrationszeit angeht. Bei den *In-vitro*-Studien oszilliert sie zwischen 1 s (Gniadecka et al., 2004) und 60 s (Nijssen et al., 2007), wobei lange Integrationszeit bei *Ex-vivo*-Messungen nicht entscheidend ist, solange die Messsysteme eine nicht bewegliche Messsonde haben oder das RS-Gerät stationär ist. Anders sieht es bei den *In-vivo*-Studien aus: bei Zeng et al. (2008) beträgt sie 0,1 s, bei Lui et al. (2012) 1 s, bei Hata et al. 20 s und bei Zakharov et al. (2014) sogar 30 s. Es gibt folgendes Problem beim Verrutschen der Raman-Sonde während einer langen Integrationszeit: die Eindringtiefe der in der RaDiag-Studie benutzten Sonde beträgt 0,1 mm; eine Lageveränderung in diesen Dimensionen ist für einen Menschen kaum wahrnehmbar, aber die Fortsetzung derselben Messung könnte schon die Molekülschwingungen einer anderen Zellgruppe von demselben Tumor registrieren, wo der Infiltrationsgrad noch nicht so weit fortgeschritten ist. Mit mehrfacher Messung desselben Tumors bei verkürzten Messzeiten könnten solche Fehler minimiert werden. Einen Lösungsansatz könnte z.B. in Benutzung von Gewebedetektion mit einem Raman-spektroskopischen Makroraster gesehen werden. Reble et al. (2014) haben in ihrer Studie die Zervix-Biopsien flächendeckend detektiert und je nach Größe bis zu 200 Spektren pro Resektat gemessen. Die Zusammenarbeit mit der pathologischen Abteilung war soweit eingespielt, dass die Messpunkte des Rasters, die digital auf ein Makrobild der Biopsien übertragen wurden, histologisch zugeordnet werden konnten. Die Detektion der gesamten Gewebeprobe führt allerdings zu deutlich längeren Messzeiten.

Das Befeuchten der zu messenden Tumore könnte einen Vorteil für die Messqualität bringen, indem eine perfekte Okklusion zwischen der Haut und der Sonde hergestellt wird. Diesen Effekt kennt man von der Anwendung eines Dermatoskops: durch das Auftragen eines Immersionsmediums, wie einem Desinfektionsmittel, erhält man eine klare und gleichmäßige Bildgebung. Schleusener et al. (2015a) haben *ex vivo* an den Schweineohren untersucht, wie die Wasserimmersion die Messqualität beeinflusst. Bei der Messgruppe, bei der das Wasser als Immersionsmedium angewendet wurde, war die mittlere Abweichung um 20,6% kleiner als bei der Gruppe ohne Immersionsmittel. Außerdem hat dies die Spektrenauswertung nicht stark beeinflusst: in der spektralen Breite von  $1100\text{ cm}^{-1}$  bis  $1800\text{ cm}^{-1}$  gab es nur ein, für das Wasser charakteristisches Band um  $1650\text{ cm}^{-1}$  (OH-Bindung), was durch die pure Wassermessung erkannt werden konnte. Allerdings muss man diese Maßnahme entweder bei allen Messungen oder bei keiner durchführen. Bei schwer zugänglichen Messstellen, wie Ohren, Nasenflügel oder der knöchernen Schädelregion würde dies allerdings eine erhöhte

Gefahr der Sondenbewegung durch das Verrutschen bedeuten. Da die Hauttumoren überwiegend im Gesicht auftreten, musste man auf dieses Hilfsmittel verzichten. Bei kurzer Integrationszeit wäre dies durchaus denkbar.

Die Sondenabschirmung beugt dem Eindringen des Tages- und Raumlichts in den Detektionsspot vor. Fraglich ist allerdings, ob diese Vorrichtung zierlicher gestaltet werden kann. Besonders kritisch war ihre Anwendung bei den schwer zugänglichen Stellen wie Nasenflügel und Ohrmuschel – die Seitenbereiche der runden Abschirmung hatten keinen Hautkontakt und die Tumore in der Region der Nasenfurchen an den Nasenflügeln konnten gar nicht erst gemessen werden. Eine Verkleinerung der Abschirmung könnte in solchen Fällen Abhilfe schaffen.

Die Idee, die hinter der Anfertigung, dem sofortigen Ausdrucken und der Kennzeichnung von drei zu messenden Stellen innerhalb eines Tumors steckte, war, die „blinden“ RS-Messungen den histologischen Arealen in der Region der Eindringtiefe des Lasers zuzuordnen. Auf diese Weise hätte kontrolliert werden können, ob die gemessenen Tumorareale tatsächlich einen infiltrierten Bereich erfasst haben. Alternativ könnte man eine in die Messsonde integrierte Videocamera verwenden. Diese Vorrichtung wurde bereits entwickelt und der in der RaDiag Derma-Studie genutzten Messsonde gegenübergestellt (Schleusener et al., 2014). Während der Videoaufnahme könnten die Schnappschüsse mit dem Messspot auf der Läsion betätigt werden, was einen Vorteil gegenüber der Umlicht-Abschattung hat, die den Messspot abdeckt. Die übrigen Störfaktoren hängen von Zufall oder menschlicher Verfassung ab und können auf Dauer nur durch gebotene Sorgfalt und Vorsicht minimiert werden.

### **4.7 Integration nichtinvasiver diagnostischer Methoden in den Praxisalltag**

Eine Vielzahl an Faktoren verursacht eine Notwendigkeit zur Entwicklung und Etablierung einer nichtinvasiven Untersuchungsmethode von malignen Hauttumoren. Zu den wichtigsten gehört die steigende Inzidenzrate von dieser Krebsart. Dies kann zum Teil auf die Tatsache zurückgeführt werden, dass die staatlich geförderten Aufklärungskampagnen und dadurch das gesteigerte Bewusstsein bei den Patienten sowie die durch die Krankenkassen popularisierte

Hautkrebsvorsorge in Form von body-checks zu einer früheren und häufigeren Hautkrebserkennung beitragen. Auch wenn die Anwendung eines Dermatoskops die Effektivität der Blickdiagnostik verbessert, ist die Einschätzung der Tumorwahrscheinlichkeit stark von der Kompetenz und Erfahrung des behandelnden Facharztes abhängig. Dies ist insbesondere bei kleinen und oberflächlichen Tumoren oder bei der Abgrenzung der Tumoren von atypischen Nävi problematisch (Welzel and Sattler, 2016). Die steigende Anzahl an neuentdeckten Tumoren, die eingeschränkte Verfügbarkeit der ausgebildeten Dermatologen, insbesondere im ländlichen Bereich, sowie die Berücksichtigung der finanziellen Mittel, sind nur einige Argumente, die für einen effizienteren Ablauf in der Hauttumordiagnostik sprechen. Die Raman-Spektroskopie, könnte dabei Abhilfe schaffen, indem sie die Tumorauswertung anhand der gemessenen Spektren generiert und somit eine objektive diagnostische Methode darstellt. Trotzdem ist dieses Verfahren lediglich als eine Hilfestellung für ausgebildete Fachärzte zu verstehen darf nicht autonom als Ersatz einer ärztlichen Diagnose verwendet werden.

Der Zeit- und Kostenfaktor spielt eine wichtige Rolle für die diagnostischen Verfahrensmethoden. Für eine experimentelle Studie ist die Untersuchung einer verdächtigen Läsion nicht von entscheidender Bedeutung, jedoch im klinischen Alltag ist der Zeitfaktor immens. Eine österreichische Studie (Zalaudek et al., 2008) hat sich mit der Zeiterfassung der dermatologischen kompletten Ganzkörperuntersuchung beschäftigt und hat ergeben, dass die Verwendung eines Dermatoskops die Untersuchungszeit von 72 s (ohne Hilfsmittel) auf 142 s erhöht. Dabei ist die Anzahl der verdächtigen Nävi gestiegen, was einen großen Vorteil für die Hauttumordiagnostik ergab (Wassef and Rao, 2013). Zusätzliche Verfahren wie die RS-Methode werden den body-check zwar verlängern, aber die Förderung der Diagnostik von frühen Tumorstadien oder Krebsvorstufen mindert die Anzahl von zu spät erkannten Fällen. Dank diesem Paradigmenwechsel werden die langwierigen und kostspieligen Therapien im fortgeschrittenen Stadium seltener, was einen großen Vorteil und geringere Belastung für Patienten ergibt und aus ökonomischer Sicht weitaus weniger Kosten generiert.

### **4.8 Die Stärken und Herausforderungen der Raman-Spektroskopie**

Die Raman-Spektroskopie beruht im Gegensatz zu den modernen bildgebenden Verfahren, wie Konfokalmikroskopie und OCT, nicht auf der Expertenmeinung, sondern stützt sich auf

objektive Messwerte, die unabhängig von der Erfahrung des Untersuchers und der Tagesform sind. Für die Anwendung des RS-Geräts an einer verdächtigen Läsion ist keine Exzision notwendig, was insbesondere bei der Untersuchung von multiplen Nävi die Diagnostik erleichtert und viel komfortabler für die Patienten ist. Die Messung ist sowohl für die Haut als auch für den Tumor nicht invasiv und entwickelt keine gewebsschädigende Hitze. Die RS benötigt außerdem weder eine Färbung noch Vorbehandlung. (Kourkoumelis et al., 2015).

Auf der anderen Seite ist das Signal der Raman-Banden sehr schwach, deshalb sind lange Messzeiten erforderlich. Darüber hinaus ist für die *In-vivo*-Untersuchung eine aufwendige Optik notwendig, damit die bewegliche Detektionssonde an nahezu jeder Hautstelle eingesetzt werden kann. Eine große Herausforderung besteht weiterhin in der Detektion aller Raman-Banden; in der RaDiag-Studie konnte der Wellenzahlenbereich unterhalb  $1100\text{ cm}^{-1}$  aufgrund der Oszillationen nur eingeschränkt ausgewertet werden (Schleusener et al., 2015b). Eine weitere Schwierigkeit ergab sich aus dem Studiendesign: für eine aussagekräftige Diskriminanzanalyse ist eine bestimmte Mindestanzahl an Daten notwendig und außerdem muss eine hohe Anzahl an vorausgewählten Patienten gemessen werden. Da im Vorfeld der Studie die Hauttumore weder gemessen noch gespeichert wurden, konnte die vorläufige Diskriminanzanalyse erst beim Vorliegen von ca. der Hälfte der vorgesehenen Patientendaten vorgenommen werden. Daraus ergibt sich folgende Abhängigkeit: je mehr Hauttumorspektren und -typen gemessen und ausgewertet werden, umso genauer ist die Diskriminanzanalyse. Ein relativ schwaches Ergebnis bei der Diskriminierung zwischen BCC0 und BBC1 sowie zwischen SCC0 und SCC1 ergibt sich zum Teil aus der Tatsache, dass die 0-Gruppen eine weitgefächerte Zusammenstellung von benignen Hautveränderungen enthält und bei denen die Raman-Banden kein einheitliches Bild darstellen. Die relativ kleinen Fallzahlen der untersuchten Tumorgruppen und Gruppen der Alternativbefunde ergaben sich aus der Vorselektion der Dermatologen. Bei höherer Patienten- und Spektrenanzahl könnte man Subgruppen desselben Typus bilden, wodurch eine genauere Diskriminanzanalyse höhere BAC-Werte bieten würde.

## 5. Zusammenfassung

### 5.1 RaDiag-Studie

Die meisten veröffentlichten Studien, die sich mit der Untersuchung von Hauttumoren mittels der Raman-Spektroskopie befasst haben, wurden *in vitro* durchgeführt. Die Herausforderung, eine Direktmessung am Patienten in Echtzeit durchzuführen, konnte durch ein spezielles optisches System, eine Glasfaser-gekoppelte Messsonde gelöst werden. Im Zuge der Studienvorbereitungen wurde außerdem die optimale Detektionstiefe von ca. 100  $\mu\text{m}$  und die Spotgröße von ca. 200  $\mu\text{m}$  ausgewählt, damit die typische Zellaktivität der frühen Tumorformen in der Region der Basalmembran sowie eine repräsentative Anzahl von solchen Zellen erfasst werden (Reble et al., 2011).

Die Spektrenanalyse hat ergeben, dass in keinem Hauptspektrum charakteristische Raman-Banden einer bestimmten Tumorart zugeordnet werden konnten. Die Unterscheidung zwischen Malignen Melanomen und (dysplastischen) Nävi mit bloßem Auge oder Dermatoskop ist oft schwierig, deshalb ist die Gegenüberstellung der beiden Gruppen für die Zukunft der nichtinvasiven Diagnostik hochinteressant. Bei der Diskriminierung zwischen MM und PN konnte ein mit BAC von 91% sowohl für den gesamten Wellenzahlenbereich 300-1730  $\text{cm}^{-1}$  als auch für 1100-1730  $\text{cm}^{-1}$  erreicht werden, wobei bei einer sehr hohen Sensitivität von 94% nur eine geringfügig niedrigere Spezifität von 87% vorliegt (Schleusener et al., 2015b). Die Diskriminierung von beiden hellen Hautkrebsarten gegen die Haut in der unmittelbaren Tumorumgebung hat eine BAC von 73% für BCC und 85% für SCC ergeben (Schleusener et al., 2015b). Die genannten Ergebnisse sind vergleichbar mit anderen *In-vivo*-Studien. Es muss dabei bedacht werden, dass die Differenzierung im Studiendesign, wie untersuchte Patientenanzahl, die Dauer der Studie oder unterschiedliche Gruppierung verschiedener Läsionsarten, das Endergebnis maßgeblich beeinflusst haben, weshalb ein objektiver Vergleich der Studien nur begrenzt möglich ist.

Die Ergebnisse der RaDiag-Studie kann man mit den Resultaten von praktizierenden Hausärzten, die an einem dermatologischen Training teilgenommen haben, und erfahrenen Dermatologen vergleichen: bei der Unterscheidung zwischen pigmentierten Nävi und MM ohne und mit Oberflächenvergrößerung (wie z. B. Dermatoskop) rangierte die diagnostische

Genauigkeit bei der ersten Ärztteruppe zwischen 49 und 80% (Sensitivität zwischen 25% und 88%), während die Fachärzte das Ergebnis von 85 bis 89% (Sensitivität zwischen 74% und 100%) erreicht haben (Corbo and Wismer, 2012). Aus diesem direkten Vergleich lässt sich schließen, dass die objektive statistische Diskriminanzmethode, die in der RaDiag-Studie verwendet wurde, dem Urteilsvermögen von dermatologisch partizipierenden Hausärzten überlegen ist sowie keine schlechteren Resultate als die der Dermatologen bietet. Die Raman-Spektroskopie kann somit als ein effektives unterstützendes Hilfsmittel im Prozess der Diagnostik kutaner Tumoren angesehen werden.

### **5.2 Der Ausblick in die Zukunft**

Bei der Fortsetzung der Forschungen an der RS-Diagnostik könnten etliche Aspekte beachtet werden, um die Möglichkeiten dieser vielversprechenden Methode noch effektiver auszuschöpfen. Um mehr Spektren zu generieren, bietet sich die Erhöhung von Messstellen oder eine Messsonde mit mehreren Detektionsspot an, damit viele Messungen gleichzeitig möglich sind. Außerdem könnte der Aufbau des Messkopfes optimiert werden, um sichtbare Messspots zu erhalten, damit diese auf den histologischen Schnitten wiederzufinden sind. Somit könnte man feststellen, wie ausgeprägt der Tumor an einer konkreten Stelle war. Künftig könnte das RS-Gerät auch bei der Tumorrandkontrolle verwendet werden.

Um das Potential anderer nichtinvasiver diagnostischer Verfahren zu nutzen, ist es sinnvoll, RS mit anderen spektrometrischen oder bildgebenden Methoden zu kombinieren.

## 6 Literaturverzeichnis

- AMJADI, M., COVENTRY, B. & J GREENWOOD, A. M. 2010. Reflectance Confocal Microscopy in the Diagnosis of NonMelanoma Skin Cancer and Benign Lesions Versus Normal Skin: A Blinded Prospective Trial. *The Internet Journal of Plastic Surgery*, 7, 1-6.
- BARNES, B., BERTZ, J., BUTTMANN-SCHWEIGER, N., FIEBIG, J., JORDAN, S., KRAYWINKEL, K., NIEMANN, H., NOWOSSADECK, E., POETHKO-MÜLLER, C., PRÜTZ, F., RATTAY, P., SCHÖNFELD, I., STARKER, A., WIENECKE, A., WOLF, U., CASTELL, S., DELERÉ, Y., GRABOW, D., KAATSCH, P., MULTMEIER, J., SPIX, C. & TENCKHOFF, B. 2016. *Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016*, Berlin, Robert Koch Institut. s. 53-56.
- BERGMEIR, P., NITSCHKE, C., NONNAST, J., BARGENDE, M., ANTONY, P. & KELLER, U. 2014. *Klassifikationsverfahren zur Identifikation von Korrelationen zwischen Antriebsstrangbelastungen und Hybridkomponentenfehlern einer Hybridfahrzeugflotte*. Hochschule Esslingen.
- BOCKLITZ, T., WALTER, A., HARTMANN, K., RÖSCH, P. & POPP, J. 2011. How to pre-process Ramn spektra for reliable and stable models? *Analytica Chimica Acta*, 704, 47-56.
- BODANESE, B., SILVEIRA, F. L., ZÂNGARO, R. A., PACHECO, M. T., PASQUALUCCI, C. A. & SILVEIRA, L. J. 2012. Discrimination of basal cell carcinoma and melanoma from normal skin biopsies in vitro through Raman spectroscopy and principal component analysis. *Photomed Laser Surg.*, 30(7):, 381-7.
- BREITBART, E. W., WENDE, A., MOHR, P., GREINERT, R. & VOLKMER, B. 2004. *Hautkrebs. Gesundheitsberichterstattung des Bundes.*, Berlin, Robert Koch-Institut in Zusammenarbeit mit dem Statistischen Bundesamt. s. 7-20.
- BREUNINGER, H., BOOTZ, F., HAUSCHILD, A., KORTMANN, R.-D., WOLFF, K., STOCKFLETH, E., SZEIMIES, M., ROMPEL, R. & GARBE, C. 2011. *Leitlinie der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft - Plattenepithelkarzinom der Haut* [Online]. Available: [www.derma.de](http://www.derma.de) Informationsportal der deutschsprachigen Dermatologie.
- BYRNE, H., SOCKALINGUM, G. & STONE, N. 2011. Raman Microscopy: Complement or Competitor. in: *Biomedical Applications of Synchrotron Infrared Microspectroscopy*. Dublin: Royal Society of Chemistry, RCS Analytical Spectroscopy Monographs. s. 105-142.
- CALIN, M. A., PARASCA, S. V., SAVASTRU, R., R., C. M. & S., D. 2013. Optical techniques for the noninvasive diagnosis of skin cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*, 139, 1083–1104.
- CASSILETH, B. R., CLARK, W. H. J., LUSK, E. J., FREDERICK, B. E., THOMPSON, C. J. & WALSH, W. P. 1986. How well do physicians recognize melanoma and other problem lesions? *J Am Acad Dermatol.*, 14(4):, 555-60.
- CHEN, S. C., BRAVATA, D. M., WEIL, E. & OLKIN, I. 2001. A comparison of dermatologists' and primary care physicians' accuracy in diagnosing melanoma: a systematic review. *Arch Dermatol.*, 137(12):, 1627-34.
- CORBO, M. D. & WISMER, J. 2012. Agreement between dermatologists and primary care practitioners in the diagnosis of malignant melanoma: review of the literature. *J Cutan Med Surg.* , doi: 10.1177/120347541201600506.
- DEV PURA, 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, doi: 10.1118/1.4870981.
- DIPPEL, B. 2017. *Fundamentals & Technology of Raman Spectroscopy* [Online]. Königswinter, Deutschland. Available: <http://www.raman.de/>.
- EICHHORN, R., WESSLER, G., SCHOLZ, M., LEUPOLD, D., STANKOVIC, G., BUDER, S., STÜCKER, M. & HOFFMANN, K. 2009. Early diagnosis of melanotic melanoma based on laser-induced melanin fluorescence. *J Biomed Opt.*, doi: 10.1117/1.3155511.
- ERDMANN, F., LORTET-TIEULEN, J., SCHÜZ, J., ZEEB, H., GREINERT, R., BREITBART, E. W. & BRAY, F. 2012. International trends in the incidence of malignant melanoma 1953–2008—are recent generations at higher or lower risk? *International Journal of Cancer*, doi:10.1002/ijc.27616.
- FINK, A. M., FIALLA, R. & STEINER, A. 2001. Seasonal pattern of the excision rate of melanoma and naevi. *Melanoma Res.*, 11(5):, 531-4.
- FRITSCH, P. 2004. *Tumoren der Haut*. In: *Dermatologie Venerologie*, 2. Auflage, Berlin Heidelberg New York, Springer-Verlag.
- GARCIA-URIBE, A., SMITH, E. B., ZOU, J., DUVIC, M., PRIETO, V. & WANG, L. V. 2011. In-vivo characterization of optical properties of pigmented skin lesions including melanoma using oblique incidence diffuse reflectance spectrometry. *J Biomed Opt.*, doi: 10.1117/1.3536509.
- GERGER, A., HOFMANN-WELLENHOF, R., LANGSENLEHNER, U., RICHTIG, E., KOLLER, S., WEGER, W., AHLGRIMM-SIESS, V., HORN, M., SAMONIGG, H. & SMOLLE, J. 2008. In vivo confocal laser scanning microscopy of melanocytic skin tumours: diagnostic applicability using unselected tumour images. *Br J Dermatol*, 329-33.
- GNIADDECKA, M. 1997. Potential for high-frequency ultrasonography, nuclear magnetic resonance, and Raman spectroscopy for skin studies. *Skin Res Technol.* , doi: 10.1111/j.1600-0846.1997.tb00178.x.
- GNIADDECKA, M., PHILIPSEN, P. A., SIGURDSSON, S., WESSEL S, NIELSEN, O. F., CHRISTENSEN, D. H., HERCOGOVA, J., ROSSEN, K., THOMSEN, H. K., GNIADDECKI, R., HANSEN, L. K. & CH, W. H. 2004. Melanoma Diagnosis by Raman Spectroscopy and Neural Networks: Structure Alterations in Proteins and Lipids in Intact Cancer Tissue. *Journal of Investigative Dermatology*, 122, 443–449.
- GUITERA, P., PELLACANI, G., CROTTY, K. A., SCOLYER, R. A., LI, L. X., BASSOLI, S., VINCETI, M., RABINOVITZ, H., LONGO, C. & MENZIES, S. W. 2010. The impact of in vivo reflectance confocal microscopy on the diagnostic accuracy of lentigo maligna and equivocal pigmented and nonpigmented macules of the face. *J Invest Dermatol*, 2080-91.
- HAKA, A. S., VOLYNSKAYA, Z., GARDECKI, J. A., NAZEMI, J., LYONS, J., HICKS, D., FITZMAURICE, M., DASARI, R. R., CROWE, J. P. & FELD, M. S. 2006. In vivo margin assessment during partial mastectomy breast surgery using raman spectroscopy. *Cancer Research*, 66(6):, 3317-22.
- HATA, T. R., SCHOLZ, T. A., ERMAKOV, I. V., MCCLANE, R. W., KHACHIK, F., GELLERMANN, W. & PERSHING, L. K. 2000. Non-invasive raman spectroscopic detection of carotenoids in human skin. *J Invest Dermatol*, 115, 441-8.
- HAUSCHILD, A., BREUNINGER, H., KAUFMANN, R., KORTMANN, R.-D., SCHWIPPER, V., WERNER, J., REIFENBERGER, J., DIRSCHKA, T. & GARBE, T. 2012. *Kurzleitlinie - Basalzellkarzinom der Haut*. AWMF-Register Nr. 032/021 Klasse: S2k. [Online]. Available: [http://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/032-0211\\_S2k\\_Basalzellkarzinom\\_2013-verlaengert.pdf](http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/032-0211_S2k_Basalzellkarzinom_2013-verlaengert.pdf).



- HESSE, M., MEIER, H. & ZEEH, B. 2011. *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, 8. Auflage, Stuttgart, Thieme Verlag. s. 74 ff.
- HINZ, T., EHLER, L. K., HORNUNG, T., VOTH, H., FORTMEIER, I., MAIER, T., HÖLLER, T. & SCHMID-WENDTNER, M. H. 2012. Preoperative characterization of basal cell carcinoma comparing tumour thickness measurement by optical coherence tomography, 20-MHz ultrasound and histopathology. *Acta Derm Venereol*, 92, 132-7.
- HUANG, Z., LUI, H., CHEN, X. K., ALAJLAN., A., MCLEAN, D. I. & ZENG, H. 2004. Raman spectroscopy of in vivo cutaneous melanin. *J Biomed Opt.*, 9(6):, 1198-205.
- HUANG, Z., LUI, H., MCLEAN, D. I., KORBELIK, M. & ZENG, H. 2005. Raman spectroscopy in combination with background near-infrared autofluorescence enhances the in vivo assessment of malignant tissues. *Photochem Photobiol.*, 81(5):, 1219-26.
- HUANG, Z., TEH, S. K., ZHENG, W., LIN, K., HO, K. Y., TEH, M. & YEOH, K., G. 2010. In vivo detection of epithelial neoplasia in the stomach using image-guided Raman endoscopy. *Biosens Bioelectron.*, doi: 10.1016/j.bios.2010.07.125.
- JONES, T. P., BOIKO, P. E. & PIEPKORN, M. W. 1996. Skin biopsy indications in primary care practice: a population-based study. *J Am Board Fam Pract.* , 9(6):, 397-404.
- KELLER, M. D., KANTER, E. M., LIEBER, C. A., MAJUMDER, S. K., HUTCHINGS, J., ELLIS, D. L., BEAVEN, R. B., N, S. & MAHADEVAN-JANSEN, A. 2008. Detecting temporal and spatial effects of epithelial cancers with Raman spectroscopy. *Disease Markers*, 25, 323-337.
- KESSLER, W. 2007. *Multivariate Datenanalyse für Pharma-, Bio- und Prozessanalytik.*, Weinheim, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- KOLLIAS, N., GILLIES, R., MORAN, M., KOCHEVAR, I. E. & ANDERSON, R. R. 1988. Endogenous skin fluorescence includes bands that may serve as quantitative markers of aging and photoaging. *J Invest Dermatol.*, 111(5):, 776-80.
- KONG, K., ROWLANDS, C. J., VARMA, S., PERKINS, W., LEACH, I. H., KOLOYDENKO, A. A., WILLIAMS, H. C. & NOTINGHER, I. 2013. Diagnosis of tumors during tissue-conserving surgery with integrated autofluorescence and Raman scattering microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, doi: 10.1073/pnas.1311289110.
- KOURKOUHELIS, N., BALATSOUKAS, I., MOULIA, V., ELKA, A., GAITANIS, G. & BASSUKAS, I. D. 2015. Advances in the in Vivo Raman Spectroscopy of Malignant Skin Tumors Using Portable Instrumentation. *Int J Mol Sci*, 16, 14554-70.
- KRACKOWIZER, P. & BRENNER, E. 2008. Dicke der Epidermis und Dermis: Sonographische Messung an 24 Stellen des menschlichen Körpers. *Phlebologie*, 37.
- KRACKOWIZER P. & BRENNER, E. 2008. Dicke der Epidermis und Dermis. Sonographische Messung an 24 Stellen des menschlichen Körpers. *Phlebologie*, 2, s. 83-92.
- KRAFFT, C., STEINER, G., BELEITES, C. & SALZER, R. 2009. Disease recognition by infrared and Raman spectroscopy. *J Biophotonics*, 2, 13-28.
- LANDTHALER, M. & HOHENLEUTNER, U. 2006. *Lasertherapie in der Dermatologie. Atlas und Lehrbuch.*, 2. Auflage, Heidelberg, Springer Medizin Verlag.
- LIEBER, C. A., MAJUMDER, S. K., BILLHEIMER, D., ELLIS, D. L. & MAHADEVAN-JANSEN, A. 2008a. Raman microspectroscopy for skin cancer detection in vitro. *Journal of Biomedical Optics*, 13(2) 024013.
- LIEBER, C. A., MAJUMDER, S. K., ELLIS, D. L., BILLHEIMER, D. D. & MAHADEVAN-JANSEN, A. 2008b. In vivo nonmelanoma skin cancer diagnosis using Raman microspectroscopy. *Lasers in surgery and medicine*, 40, 461-467.
- LUI, H., ZHAO, J., MCLEAN, D. & ZENG, H. 2012. Real-time Raman spectroscopy for in vivo skin cancer diagnosis. *Cancer research*, 72, 2491-2500.

- MARZEC, K. M., RYGULA, A., GASIOR-GLOGOWSKA, M., KOCHAN, K., CZAMARA, K., BULAT, K., MALEK, K., KACZOR, A. & BARANSKA, M. 2015. Vascular diseases investigated ex vivo by using Raman, FT-IR and complementary methods. *Pharmacol Rep.*, doi: 10.1016/j.pharep.2015.05.001.
- MICHEL, B. & HOLCOMB, P. 2007. Simulation der Lichtstreuung in menschlicher Haut. *Photonik*, 60-63.
- MOLL, I. 2010. *Duale Reihe Dermatologie*, 7. Auflage, Stuttgart, Thieme Verlag, s. 3-14, 302-328.
- NIJSSEN, A., BAKKER SCHUT, T. C., HEULE, F., CASPERS, P. J., HAYES, D. P., NEUMANN, M. H. A. & J., P. G. 2002. Discriminating Basal Cell Carcinoma from its surrounding tissue by Raman Spectroscopy. *Journal of Investigative Dermatology*, DOI: 10.1046/j.1523-1747.2002.01807.x.
- NIJSSEN, A., MAQUELIN, K., SANTOS, L. F., CASPERS, P. J., BAKKER SCHUT, T. C., DEN HOLLANDER, J. C., NEUMANN, M. H. & PUPPELS, G. J. 2007. Discriminating basal cell carcinoma from perilesional skin using high wave-number Raman spectroscopy. *J Biomed Opt*, DOI: 10.1117/1.2750287.
- OLMEDO, J. M., WARSCHAW, K. E., SCHMITT, J. M. & SWANSON, D. L. 2007. Correlation of thickness of basal cell carcinoma by optical coherence tomography in vivo and routine histologic findings: a pilot study. *Dermatol Surg*, 33, 421-6.
- ORTIZ, A. & GRANDO, S. A. 2012. Smoking and the skin. *International Journal of Dermatology*, 51, 250-262.
- OTBERG, N., RICHTER, H., SCHAEFER, H., BLUME-PEYTAVI, U., STERRY, W. & LADEMANN, J. 2004. Variations of hair follicle size and distribution in different body sites. *The Journal of investigative dermatology*, 122, 14-19.
- OUYANG, H., XU, J., ZHU, Z., LONG, T. & YU, C. 2015. Rapid discrimination of malignant lesions from normal gastric tissues utilizing Raman spectroscopy system: a meta-analysis. *J Cancer Res Clin Oncol.*, doi: 10.1007/s00432-015-1971-9.
- PAGNONI, A., AM, K., SEL, G. & T, S. 1994. Determination of density of follicles on various regions of the face by cyanoacrylate biopsy: correlation with sebum output. *British Journal of Dermatology*, 131, 862-865.
- PFLUGFELDER, A., KOCHS, C., CZESCHIK, C., SCHADENDORF, D., GARBE, C., FOLLMANN, M. & SELBMANN, H.-K. 2013. *Malignes Melanom. S3-Leitlinie: Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms.* , Berlin, Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, Deutschen Krebsgesellschaft e.V. und Deutschen Krebshilfe e.V.
- PHILIPSEN, P. A., KNUDSEN, L., GNIADACKA, M., RAVNBAK, M. H. & WULF, H. C. 2013. Diagnosis of malignant melanoma and basal cell carcinoma by in vivo NIR-FT Raman spectroscopy is independent of skin pigmentation. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*, 12, 770-776.
- RAGHUNATH, R. S., VENABLES, Z. C. & MILLINGTON, G. W. 2015. The menstrual cycle and the skin. *Clin Exp Dermatol*, 40, 111-5.
- RAJARAM, N., REICHENBERG, J. S., MIGDEN, M. R., NGUYEN, T. H. & TUNNELL, J. W. 2010. Pilot clinical study for quantitative spectral diagnosis of non-melanoma skin cancer. *Lasers Surg Med*, 42, 716-27.
- REBLE, C. 2012. *Handbuch des klinischen Prüfers. Prospektive in-vivo-Studie zum Einsatz der Ramanspektroskopie für die Tumordiagnostik in der Dermatologie.* , Berlin, LMTB Berlin.
- REBLE, C., GERSONDE, I., DRESSLER, C., HELFMANN, J., KÜHN, W. & EICHLER, H. J. 2014. Evaluation of Raman spectroscopic macro raster scans of native cervical cone

- biopsies using histopathological mapping. *J Biomed Opt*, doi: 10.1117/1.JBO.19.2.027007.
- REBLE, C., GERSONDE, I., LIEBER, C. A. & HELFMANN, J. 2011. Influence of tissue absorption and scattering on the depth dependent sensitivity of Raman fiber probes investigated by Monte Carlo simulations. *Biomed Opt Express*, doi: 10.1364/BOE.2.000520.
- ROWE, P. 2012. *Statistik für Mediziner und Pharmazeuten.*, 1. Auflage, Weinheim, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, s. 67 ff.
- SALZER, R., THIELE, S., SUEMMCHEN, L. & MACHILL, S. 2016. *Einführung in die Interpretation von IR- und Raman-Spektren.* [Online]. Available: [http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/3/anc/ir\\_spek/allg\\_interpretation.vlu.html](http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/3/anc/ir_spek/allg_interpretation.vlu.html) (abgerufen am 01.08.2017).
- SANDBY-MOLLER, J., POULSEN, T. & WULF, H. C. 2003. Epidermal thickness at different body sites: relationship to age, gender, pigmentation, blood content, skin type and smoking habits. *Acta Derm Venereol*, 83, 410-3.
- SATOR, P. G., SATOR, M. O., SCHMIDT, J. B., HUBER, J. C. & HONIGSMANN, H. 2001. Measurement of skin thickness by high-frequency ultrasound to objectify the effects of hormone replacement therapy in the perimenopause. *Ultraschall Med*, 22, 219-24.
- SCHENDERA, C. F. G. 2014. *Regressionsanalyse mit SPSS.*, 2. Auflage, München, Oldenburg Wissenschaftsverlag GmbH, s.354.
- SCHLEUSENER, J., GLUSZCZYNSKA, P., REBLE, C., GERSONDE, I., HELFMANN, J., CAPPUS, H.-J., FLUHR, J. W. & MEINKE, M. C. 2015a. Perturbation Factors on Clinical Handling of a Fiber-Coupled Raman Probe for the cutaneous in vivo diagnostic Raman spectroscopy. *Applied Spectroscopy*, DOI: 10.1366/14-07482.
- SCHLEUSENER, J., GLUSZCZYNSKA, P., REBLE, C., GERSONDE, I., HELFMANN, J., FLUHR, J. W., LADEMANN, J., RÖWERT-HUBER, J., PATZELT, A. & MEINKE, M. C. 2015b. In vivo study for the discrimination of cancerous and normal skin using fibre probe-based Raman spectroscopy. *Exp Dermatol.*, DOI: 10.1111/exd.12768.
- SCHLEUSENER, J., REBLE, C., HELFMANN, J., GERSONDE, I., CAPPUS, H. J., GLANERT, M., FLUHR, J. W. & MEINKE, M. C. 2014. Design and technical evaluation of fibre-coupled Raman probes for the image-guided discrimination of cancerous skin. *Measurement Science and Technology*, DOI: 10.1088/0957-0233/25/3/035701.
- SHAIKH, R., PRABITHA, V. G., DORA, T. K., CHOPRA, S., MAHESHWARI, A., DEODHAR, K., REKHI, B., SUKUMAR, N., KRISHNA, C. M. & SUBHASH, N. 2016. A comparative evaluation of diffuse reflectance and Raman spectroscopy in the detection of cervical cancer. *J Biophotonics*, doi: 10.1002/jbio.201500248.
- SHORT, M. A., LUI, H., MCLEAN, D., ZENG, H., ALAJLAN, A. & CHEN, X. K. 2006. Changes in nuclei and peritumoral collagen within nodular basal cell carcinomas via confocal micro-Raman spectroscopy. *J Biomed Opt.*, DOI: 10.1117/1.2209549.
- SILVEIRA, F. L., PACHECO, M. T. T., BODANESE, B., PASQUALUCCI, C. A., ZANGARO, R. A. & SILVEIRA, L. J. 2015. Discrimination of Non-Melanoma Skin Lesions From Non-Tumor Human Skin Tissues In Vivo Using Raman Spectroscopy and Multivariate Statistics. *Lasers in Surgery and Medicine*, 47:, 6-16.
- SILVEIRA, L. J., SATHAIAH, S., ZÂNGARO, R. A., PACHECO, M. T., CHAVANTES, M. C. & PASQUALUCCI, C. A. 2002. Correlation between near-infrared Raman spectroscopy and the histopathological analysis of atherosclerosis in human coronary arteries. *Lasers Surg. Med*, 30(4):, 290-7.
- SILVEIRA, L. J., SILVEIRA, F. L., BODANESE, B., ZÂNGARO, R. A. & PACHECO, M. T. 2012. Discriminating model for diagnosis of basal cell carcinoma and melanoma in

- vitro based on the Raman spectra of selected biochemicals. . *J Biomed Opt.*, DOI: 10.1117/1.JBO.17.7.077003.
- SINGH, S. P., DESHMUKH, A., CHATURVEDI, P. & MURALI KRISHNA, C. 2012. In vivo Raman spectroscopic identification of premalignant lesions in oral buccal mucosa. *J Biomed Opt.*, DOI: 10.1117/1.JBO.17.10.105002.
- STEINER, A. 2013. *Laser-Gewebe-Wechselwirkungen*, in: Raulin, C, Karsai, S. (Hrsg.), *Lasertherapie der Haut.*, Berlin Heidelberg, Springer-Verlag, s. 31.
- STERRY, W. 2011. *Kurzlehrbuch Dermatologie*, Stuttgart, Georg Thieme Verlag, s. 3-6, 27-28, 138, 181-187, 208, 243-244.
- STONE, N., HART PRIETO, M. C., CROW, P., UFF, J. & RITCHIE, A. W. 2007. The use of Raman spectroscopy to provide an estimation of the gross biochemistry associated with urological pathologies. *Anal Bioanal Chem.*, 387(5), 1657-68.
- TUOHIMAA, P. 2009. Vitamin D and aging. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 114, 78-84.
- ULRICH, M. 2016. Optical coherence tomography for diagnosis of basal cell carcinoma: essentials and perspectives. *British Journal of Dermatology*, doi: 10.1111/bjd.15137.
- ULRICH, M., KLEMP, M., DARVIN, M. E., KÖNIG, K., LADEMANN, J. & MEINKE, M. C. 2013. In vivo detection of basal cell carcinoma: comparison of a reflectance confocal microscope and a multiphoton tomograph. *Journal of Biomedical Optics*, DOI: 10.1117/1.JBO.18.6.061229.
- ULRICH, M., THEMSTRUP, L., DE CARVALHO, N., MANFREDI, M., GRANA, C., CIARDO, S., KÄSTLE, R., HOLME, J., WHITEHEAD, R., JEMEC, G. B. E., PELLACANI, G. & WELZEL, J. 2016. Dynamic Optical Coherence Tomography in Dermatology. *Dermatology*, doi: 10.1159/000444706.
- VESTERGAARD, M.E., MACASKILL, P., HOLT, P.E., MENZIES, S.W. 2008. 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.* 159 (3): 669-676.
- WASSEF, C. & RAO, B. K. 2013. Uses of non-invasive imaging in the diagnosis of skin cancer: an overview of the currently available modalities. *International journal of dermatology*, 52, 1481-1489.
- WELSCH, M., MARSZALEK, R., YOUNG, M., ZHU, J., CLARKE, L. & HELM, K. 2012. Seasonal variation in dysplastic naevi. *Clin Exp Dermatol*, 37, 554-6.
- WELZEL, J. & SATTLER, E. 2016. *Nichtinvasive physikalische Diagnostik in der Dermatologie.*, Berlin, Heidelberg., Springer Verlag, 38-41.
- XUE, L., SUN, P., OU, D., CHEN, P., CHEN, M. & YAN, B. 2013. Diagnosis of pathological minor salivary glands in primary Sjogren's syndrome by using Raman spectroscopy. *Lasers Med Sci.*, doi: 10.1007/s10103-013-1398-y.
- ZAKHAROV, V. P., BRATCHENKO, I. A., KOZLOV, S. V., MORYATOV, A. A., MYAKININ, O. O. & N., A. D. 2014. Two-step Raman spectroscopy method for tumor diagnosis. *Biophotonics*, doi:10.1117/12.2052121.
- ZAKHAROV, V. P., I.A., B., ARTEMYEV, D. N., MYAKININ, O. O., KORNILIN, D. V., KOZLOV, S. V. & MORYATOV, A. A. 2015. Comparative analysis of combined spectral and optical tomography methods for detection of skin and lung cancers. *J Biomed Opt.*, doi: 10.1117/1.JBO.20.2.025003.
- ZALAUDEK, I., KITTLER, H., MARGHOOB, A. A., BALATO, A., BLUM, A., DALLE, S., FERRARA, G., FINK-PUCHES, R., GIORGIO, C. M., HOFMANN-WELLENHOF, R., MALVEHY, J., MOSCARELLA, E., PUIG, S., SCALVENZI, M., THOMAS, L. & ARGENZIANO, G. 2008. Time required for a complete skin examination with and without dermoscopy: a prospective, randomized multicenter study. *Arch Dermatol.*, 144(4):, 509-13.

ZENG, H., ZHAO, J., SHORT, M., MCLEAN, D., LAM, S., MCWILLIAMS, A. & LUI, H. 2008. Raman spectroscopy for in vivo tissue analysis and diagnosis, from instrument development to clinical applications. *Journal of Innovative Optical Health Sciences*, 1, 95-106.

## 7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Energiezustände. ....	21
Abbildung 2: Vergleich des IR- und Raman-Spektrums für Polystyrol (Dippel, 2017). ....	22
Abbildung 3: Foto des Raman-Messgerätes. ....	26
Abbildung 4: Messkopfbestandteile: a-Raman-Fasersonde, b- Umlichtabschattung, c-Schutterkontakt- Anlenkung, d- Videokamera. ....	27
Abbildung 5: Screenshot der Software „RaDiagDermSpec“. Aus dem Handbuch des klinischen Prüfers. ....	31
Abbildung 6: Interpretation der Ergebnisse: die Konfidenzintervalle a und c lassen sich als signifikant unterschiedlich interpretieren, im Konfidenzintervall b liegt die Null, ist also nicht signifikant (Rowe, 2012). ....	34
Abbildung 7: Signifikante mittlere Abweichungen der Prinzipalkomponenten (PC) 1 und 2 im Verhältnis zur Standardabweichung der individuellen Messungen (Schleusener et al., 2015a). ....	43
Abbildung 8: Die Verteilung der Hauttumoren auf dem Körper. ....	47
Abbildung 9: Verteilung der Hauttumoren - Verhältnis von Kopf, Rumpf und Extremitäten. ....	48
Abbildung 10: Verteilung der Hauttumoren - prozentuelles Verhältnis von Kopf, Rumpf und Extremitäten inklusive absoluter Zahlen. ....	48
Abbildung 11: Der Spektrenverlauf der untersuchten Tumorgruppen, als Referenzgruppen dienen gesunde Haut aus der Tumornähe sowie eine Nävi-Kontrollgruppe. Die Hauptspektren und die Standardabweichung $1\sigma$ der bestätigten Läsionen der BCC1 (n=105), SCC1 (n=66) und MM1 (n=69), sowie die Hauptspektren normaler Haut (nor, n=1026) und pigmentierter Nävi (PN, n=201). Charakteristische Raman-Banden konnten identifiziert werden: A: C-C-Streckschwingung bei Prolinen und Valinen, B: C-C-Streckschwingung und Ausdehnung/Kontraktion des Phenylalaninrings, C: Artefakte, D: Symmetrische C-C Streckschwingungen von Lipiden, E: C=N-Streckschwingungen und N-H- Deformationsschwingungen der tertiären Amide, F: C-H-Deformations- schwingungen von Adenin und Phenylalanin, G: $\delta(CH_2)(CH_3)$ Deformations- schwingungen von Lipiden und Proteinen, H: C=O- Streckschwingungen der primären Amide (Schleusener et al., 2015b). ....	50

## 8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Die Wellenzahlen und entsprechende chemische Verbindungen, die im Raman-Spektrum einer Zelle beobachtet wurden; Anregungswellenlänge beträgt 785nm (Byrne et al., 2011).....	23
Tabelle 2: Wahrheitsmatrix für Die RaDiag-Studie. ....	36
Tabelle 3: Die Übersicht über die Anzahl der positiven Befunde der untersuchten Tumorarten und ihrer Subtypen. Abkürzungen: VD-Verdachtsdiagnose, (y)-Medianwert, M.-Melanom, min-jüngste(-r) Patient(-in), max-älteste(-r) Patient(-in), CL-Clark Level, skleroderm.-sklerodermiform, oberfl.-oberflächlich, pigm.-pigmentiert. In der Spalte „VD“ wurde die ursprüngliche Anzahl der Patienten und nachträgliche Gruppenverschiebung vermerkt. ....	45
Tabelle 4: <i>Die identifizierten charakteristischen Raman-Banden in der RaDiag-Studie</i> .....	51
Tabelle 5: Sensitivität, Spezifität und BAC für die Diskriminierung des MM von anderen Messgruppen (Schleusener et al., 2015b). Abkürzungen: v-Wellenzahlbereich, BAC-balanced accuracy, Sens-Sensitivität, Spez-Spezifität, >/<1 mm- Tumordicke dicker/dünner als 1 mm, MM1-histologisch bestätigte Maligne Melanome, MM0-histologisch bestätigte Alternativbefunde in der gesamten Melanomgruppe, PN-pigmentierte Nävi (Schleusener et al., 2015b). ....	53
Tabelle 6: <i>Sensitivität, Spezifität und BAC für die Diskriminierung der BCC und SCC von anderen Messgruppen (Schleusener et al., 2015b). Abkürzungen: Sens-Sensitivität, Spez-Spezifität, BAC- balanced accuracy, v-Wellenzahlbereich, diff-Spektrektrenunterschiede zwischen Messungen an der Läsion und normaler Haut aus der Läsionsnähe wurden für die Diskriminierung genutzt, BCC1-histologisch bestätigte BCC-Befunde, BCC0-histologisch bestätigte Alternativbefunde in der gesamten BCC-Gruppe, SCC1-histologisch bestätigte SCC-Befunde, SCC0-histologisch bestätigte Alternativbefunde in er gesamten SCC-Gruppe, nor- normale Haut in der Tumornähe (Schleusener et al., 2015b).</i> ....	55
Tabelle 7: Sensitivität, Spezifität und BAC für die Diskriminierung aller Tumorgruppen gegenseitig. Abkürzungen: Sens-Sensitivität, Spez-Spezifität, BCC1-histologisch bestätigte BCC-Befunde, SCC1-histologisch bestätigte SCC-Befunde, MM1-histologisch bestätigte MM-Befunde (Schleusener et al., 2015b).....	56
Tabelle 8: Ausgewählte In-vitro-Studien, bei denen RS angewendet wurde. Abkürzungen: MRDF-maximum representation and discrimination fracture, SMLR-spacse multinomial logistic regression.....	61
Tabelle 9: Ausgewählte In-vivo-Studien, bei denen RS angewendet wurde.....	65
Tabelle 10: Kombinierte RS-Verfahren. ....	68

## 9 Publikationen

### Publikation 1:

Schleusener J., Gluszczynska P., Reble C., Gersonde I., Helfmann J., Cappius, H.-J., Fluhr J.W., Meinke M.C.. Perturbation Factors in the Clinical Handling of a Fiber-Coupled Raman Probe for Cutaneous in Vivo Diagnostic Raman Spectroscopy. *Appl Spectrosc* 2015.

doi: 10.1366/14-07482

### Publikation 2:

Schleusener J., Gluszczynska P., Reble C., Gersonde I., Helfmann J., Fluhr J.W., Lademann J., Röwert-Huber J., Patzelt A., Meinke M.C.. 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.



## 10 Anteilserklärung an erfolgten Publikationen

Patrycja Głuszczyńska hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

### Publikation 1:

Schleusener J., Gluszczyńska P., Reble C., Gersonde I., Helfmann J., Cappius, H.-J., Fluhr J.W., Meinke M.C.: 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.

Beitrag im Einzelnen:

- Rekrutierung von Probanden
- Durchführung der Messungen mit dem Raman-Messgerät bei Simulation von diversen Fehlerquellen
- Aufnahme von Rohdaten
- Dateninterpretation chemometrischer Methoden
- Revision des Manuskripts

### Publikation 2:

Schleusener J.\*, Gluszczyńska P.\*, Reble C., Gersonde I., Helfmann J., Fluhr J.W., Lademann J., Röwert-Huber J., Patzelt A., Meinke M.C.: In vivo study for the discrimination of cancerous and normal skin using fibre probe based Raman spectroscopy. Exp Dermatol 2015.

\*Geteilte Erstautorenschaft

Beitrag im Einzelnen:

- Literaturrecherche
- Durchführung der MPG-Studie, insbesondere: Hospitation und Patientenrekrutierung während der dermatologischen Sprechstunde, Patientenaufklärung, Durchführung von Messungen mit dem Raman-Messgerät und Aufnahme von Rohdaten, Ausfüllen und Aktualisierung von CRF-Bögen mit histologischen Befunden, digitale Bilderfassung von verdächtigen Läsionen, Erhebung von histologischen Befunden für die spätere chemometrische Auswertung
- Dateninterpretation chemometrischer Methoden
- Entwurf und Revision des Manuskripts

---

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

## **11 Lebenslauf**

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

## 12 Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Patrycja Głuszczyńska, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Prospektive In-vivo-Studie zum Einsatz der Raman-Spektroskopie für die Tumordiagnostik in der Dermatologie“ 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](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

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

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

Datum

Unterschrift

## 13 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meiner Promotionsbetreuerin, Frau Prof. Dr. rer. nat. Martina Meinke, die mir ermöglicht hat, an der Klinik für Dermatologie zu promovieren, mich eingearbeitet und zu jeder Zeit der Studiendauer sowie bei dem Schreibprozess mit zahlreichen Ratschlägen unterstützt hat.

Desweiteren möchte ich mich bei Herrn Dr. rer. medic. Johannes Schleusener für die Zusammenarbeit sowohl bei dem klinischen als auch dem Auswertungsteil der RaDiag Derma-Studie, sowie für Anregungen beim Korrekturlesen meiner Dissertation bedanken.

Für die ärztliche Begleitung der Studiendurchführung danke ich herzlich Herrn Prof. Dr. med. Joachim Fluhr, Frau Dr. Alexa Patzelt und für die histologische Auswertung Herrn Dr. Joachim Röwert-Huber.

Ein weiterer Dank gilt dem gesamten LMTB-Team, insbesondere Herrn Hans-Joachim Cappius und Frau Dr. Carina Reble für die Studienvorbereitung, Qualitätssicherung und die Wahrung des ordnungsgemäßen Studienablaufs, sowie Herrn Dr. Ingo Gersonde für Unterstützung des Auswertungsteils.

Außerdem bedanke ich mich bei den ärztlichen Mitarbeitern der dermatochirurgischen Sprechstunde für Ihre Hilfe bei der Patientenvorauswahl sowie bei dem medizinischen Personal, das mir während der Studie ein reibungsloses Eintakten der Patientennmessungen ermöglichte.

Diese Arbeit wäre ohne großartige Unterstützung, Motivation und Ansporn seitens meiner Familie nicht entstanden, was ich nicht hoch genug schätzen kann.