

Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und
Ohrenkrankheiten, plastische und ästhetische
Operationen des Universitätsklinikums Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Dr. h. c. Rudolf Hagen

**Evaluation eines Raman-
Spektroskopie basierten
Klassifikationssystems von
Leukoplakien des
Stimmlippenepithels**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Florian Hatzing
aus Würzburg

Würzburg, Juni 2020

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Stephan Hackenberg

Korreferent: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Christian Linz

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 13.04.2021

Der Promovend ist Zahnarzt.

Meiner Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abkürzungsverzeichnis..... | 1 |
| 1. Einleitung | 2 |
| 1.1 Leukoplakie | 2 |
| 1.1.1 Definition | 2 |
| 1.1.2 Epidemiologie | 2 |
| 1.1.3 Histologie | 2 |
| 1.2 Anatomie des Larynx..... | 3 |
| 1.2.1 Makroskopie..... | 3 |
| 1.2.2 Mikroskopie..... | 4 |
| 1.3 Keratosen der Stimmlippe | 5 |
| 1.3.1 Definition | 5 |
| 1.3.2 Histologie | 6 |
| 1.3.3 Therapie..... | 6 |
| 1.4 Plattenepitheliale Dysplasien der Stimmlippe | 6 |
| 1.4.1 Definition | 6 |
| 1.4.2 Histologie | 6 |
| 1.4.3 Risikofaktoren | 8 |
| 1.4.4 Klassifikationssysteme | 8 |
| 1.4.5 Therapie..... | 9 |
| 1.5 Plattenepithelkarzinome der Stimmlippen | 10 |
| 1.5.1 Definition | 10 |
| 1.5.2 Epidemiologie | 10 |
| 1.5.3 Histologie | 10 |
| 1.5.4 Symptomatik | 11 |
| 1.5.5 Risikofaktoren | 11 |
| 1.5.6 Einteilung | 12 |
| 1.5.7 Therapie..... | 12 |
| 1.6 Raman-Spektroskopie | 13 |
| 1.6.1 Historie..... | 13 |
| 1.6.2 Physikalischer Hintergrund | 13 |
| 1.6.3 Technik | 14 |
| 1.6.4 Anwendung..... | 15 |
| 1.7 Zielsetzung | 16 |

| | | |
|---------|--|----|
| 2. | Material und Methoden | 18 |
| 2.1 | Material..... | 18 |
| 2.1.1 | Verwendetes Gewebe..... | 18 |
| 2.1.2 | Geräte und Software | 20 |
| 2.1.3 | Chemikalien | 21 |
| 2.1.4 | Verbrauchs- und Labormaterialien..... | 21 |
| 2.1.5 | Angesetzte Lösungen | 22 |
| 2.2 | Methoden | 23 |
| 2.2.1 | Auswahl der Gewebeproben..... | 23 |
| 2.2.2 | Erhebung der klinischen Parameter | 24 |
| 2.2.3 | Herstellung der Paraffinschnitte | 24 |
| 2.2.4 | Entparaffinieren der Gewebeschnitte..... | 25 |
| 2.2.5 | Hämatoxylin-Eosin-Färbung..... | 25 |
| 2.2.6 | Durchlichtmikroskopie der HE-Präparate | 26 |
| 2.2.7 | Messungen am Raman-Spektroskop..... | 27 |
| 2.2.8 | Auswertung | 30 |
| 3. | Ergebnisse | 32 |
| 3.1 | Epidemiologische Auswertung | 32 |
| 3.1.1 | Epidemiologische Daten des Patientenkollektives | 32 |
| 3.1.2 | Suchtmittelanamnese..... | 32 |
| 3.1.3 | Klinische Daten zu Veränderungen der Stimmlippen | 35 |
| 3.2 | Histologische Auswertung der Präparate anhand von Beispielen | 40 |
| 3.2.1 | Leukoplakie ohne Dysplasien | 40 |
| 3.2.2 | Leichtgradige Dysplasie | 41 |
| 3.2.3 | Mäßiggradige Dysplasie | 42 |
| 3.2.4 | Schwergradige Dysplasie | 43 |
| 3.2.5 | Invasives Plattenepithelkarzinom..... | 44 |
| 3.3 | Analyse der Mittelwertspektren | 45 |
| 3.3.1 | Mittelwertspektren der Messpunkte in den basalen Epithelschichten ... | 45 |
| 3.3.2 | Mittelwertspektren der Messpunkte im mittleren Epitheldrittel | 47 |
| 3.4 | Hauptkomponentenanalyse..... | 49 |
| 3.4.1 | Hauptkomponentenanalyse der Messungen in den basalen Epithelschichten..... | 49 |
| 3.4.1.1 | Hauptkomponentenanalyse in Abhängigkeit des Präparats | 49 |
| 3.4.1.2 | Hauptkomponentenanalyse in Abhängigkeit der histologischen Diagnose | 50 |

| | | |
|---------|--|----|
| 3.4.1.3 | Hauptkomponentenanalyse in Abhängigkeit sonstiger Kriterien..... | 54 |
| 3.4.2 | Hauptkomponentenanalyse der Messungen im mittleren Epitheldrittel | 56 |
| 3.4.2.1 | Hauptkomponentenanalyse in Abhängigkeit des Präparats | 56 |
| 3.4.2.2 | Hauptkomponentenanalyse in Abhängigkeit der histologischen Diagnose | 56 |
| 3.4.2.3 | Hauptkomponentenanalyse in Abhängigkeit der Progression zu einem invasiven Plattenepithelkarzinom | 60 |
| 3.4.2.4 | Hauptkomponentenanalyse in Abhängigkeit sonstiger Kriterien..... | 60 |
| 3.5 | Lineare Diskriminanzanalyse..... | 61 |
| 3.5.1 | Lineare Diskriminanzanalyse der Mittelwertspektren basierend auf den Hauptkomponenten eins bis sieben (Modell 1) | 62 |
| 3.5.1.1 | Diskriminanz der Gruppe des dysplasiefreien Plattenepithels und der verschiedenen Dysplasiegrade gegenüber invasiven Karzinomen..... | 62 |
| 3.5.1.2 | Diskriminanz der unterschiedlichen Dysplasiegrade | 62 |
| 3.5.1.3 | Diskriminanz der Progredienz zum invasiven Tumor | 63 |
| 3.5.2 | Lineare Diskriminanzanalyse aller Einzelspektren (Modell 2) | 64 |
| 3.5.2.1 | Diskriminanz der Gruppe des dysplasiefreien Plattenepithels und der verschiedenen Dysplasiegrade gegenüber invasiven Karzinomen..... | 64 |
| 3.5.2.2 | Diskriminanz der unterschiedlichen Dysplasiegrade | 65 |
| 3.5.2.3 | Diskriminanz der Progredienz zum invasiven Tumor | 66 |
| 4. | Diskussion..... | 67 |
| 4.1 | Limitierungen histopathologischer Klassifikationssysteme hinsichtlich der Prognose..... | 67 |
| 4.1.1 | Korrelation maligner Entartung zur Schwere des Dysplasiegrades | 67 |
| 4.1.2 | Varianz der Prognosen | 68 |
| 4.1.3 | Objektivierbarkeit und Reproduzierbarkeit | 69 |
| 4.1.4 | Fazit..... | 70 |
| 4.2 | Diskussion des Patientenkollektivs..... | 70 |
| 4.2.1 | Auswahl der Patienten | 70 |
| 4.2.2 | Vergleichbarkeit des Patientenkollektivs mit der Literatur | 71 |
| 4.3 | Evaluation des experimentellen Setups und der verwendeten Methoden ... | 72 |
| 4.3.1 | Aufbereitung der Gewebeschnitte..... | 73 |
| 4.3.1.1 | Formalin-Fixierung und Entparaffinierung der Gewebeschnitte..... | 73 |
| 4.3.1.2 | Schichtdicke des Gewebeschnittes | 74 |
| 4.3.1.3 | Einfluss des Aufbereitungstages | 75 |
| 4.3.1.4 | Auswahl der Objektträger | 75 |

| | | |
|---------|---|-----|
| 4.3.2 | Versuchsaufbau am Raman-Spektroskop..... | 76 |
| 4.3.2.1 | Orientierung im Präparat | 76 |
| 4.3.2.2 | Zielvolumen der Raman-Spektroskopie..... | 77 |
| 4.3.2.3 | Einfluss des Messtages..... | 77 |
| 4.3.2.4 | Eignung der Raman-Spektroskopie zur Differenzierung unterschiedlichen Gewebes..... | 78 |
| 4.3.2.5 | Weitere Studiendesigns..... | 78 |
| 4.4 | Diskussion der Ergebnisse der Datenanalyse mit multivariaten Methoden | 79 |
| 4.4.1 | Datenvorbereitung | 79 |
| 4.4.2 | Analyse der Mittelwertspektren | 80 |
| 4.4.3 | Hauptkomponentenanalyse | 81 |
| 4.4.3.1 | Probenspezifität..... | 81 |
| 4.4.3.2 | Klassifizierbarkeit der unterschiedlichen Studiengruppen | 81 |
| 4.4.3.3 | Eignung der Hauptkomponentenanalyse zur Klassifikation von mehr als zwei Gruppen | 83 |
| 4.4.4 | Lineare Diskriminanzanalyse | 84 |
| 4.4.4.1 | Klassifizierbarkeit der unterschiedlichen Studiengruppen | 84 |
| 4.4.4.2 | Identifikation von Patienten mit Progression zu einem invasiven Karzinom | 85 |
| 4.5 | Ausblick..... | 86 |
| 5. | Zusammenfassung..... | 87 |
| 6. | Verzeichnisse..... | 89 |
| 6.1 | Literaturverzeichnis | 89 |
| 6.2 | Abbildungsverzeichnis..... | 103 |
| 6.3 | Tabellenverzeichnis..... | 105 |
| | Danksagung | 107 |
| | Lebenslauf..... | 108 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------|---|
| <i>a.u.</i> | <i>arbitrary unit</i> (willkürliche Einheit) |
| B | Beständigkeit |
| C | Celsius |
| CCD | <i>charge-coupled device</i> (ladungsgekoppeltes Element) |
| CO ₂ | Kohlenstoffdioxid |
| DNA | <i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure) |
| <i>et al.</i> | <i>et alii</i> (und andere) |
| F | Fehler |
| FN | <i>false negative</i> (falsch negativ) |
| FP | <i>false positive</i> (falsch positiv) |
| G | Genauigkeit |
| HE | Hämatoxylin-Eosin |
| HNO- | hals-, nasen- und ohren- |
| ICD-O-3 | <i>International Classification of Diseases for Oncology 3rd Edition</i> (Internationale Klassifikation der Krankheiten für die Onkologie, 3. Auflage) |
| <i>i.s.</i> | <i>in situ</i> |
| LDA | Lineare Diskriminanzanalyse |
| MMC | <i>Matthews correlation coefficient</i> (Matthews Korrelationskoeffizient) |
| n | Anzahl |
| OP | Operation |
| PC | <i>principal component</i> (Hauptkomponente) |
| PCA | <i>principal component analysis</i> (Hauptkomponentenanalyse) |
| <i>py</i> | <i>pack year</i> (Packungsjahr) |
| SD | Standardabweichung |
| Se | Sensitivität |
| Sp | Spezifität |
| TN | <i>true negative</i> (richtig negativ) |
| TP | <i>true positive</i> (richtig positiv) |
| VE-Wasser | vollentsalztes Wasser |
| vs. | <i>versus</i> (gegen[über]) |
| WHO | World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation) |

1. Einleitung

1.1 Leukoplakie

1.1.1 Definition

Der Begriff Leukoplakie bezeichnet eine weißliche, nicht abwischbare Schleimhautveränderung, die durch verschiedene histopathologische Veränderungen bedingt sein kann (Kramer *et al.*, 1978).

1.1.2 Epidemiologie

Informationen zur epidemiologischen Lage von Stimmlippenleukoplakien sind spärlich. In den Vereinigten Staaten konnte von Bouquot und Gnepp eine Inzidenz von 10,2 % bei Männern und 2,1 % bei Frauen pro 100.000 Personen beobachtet werden. Zudem lässt sich ein Zusammenhang zwischen Tabakkonsum und dem Auftreten von Leukoplakien der Stimmlippe herstellen (Bouquot und Gnepp, 1991).

1.1.3 Histologie

Histologisch handelt es sich bei einer Leukoplakie um eine Verhornung des Epithels, wobei das gesunde Epithel des Larynx im Regelfall nicht verhornend ist (Isenberg *et al.*, 2008). Es kann sich dabei um eine reine Keratose handeln. Jedoch besteht auch die Möglichkeit, dass der Veränderung ein dysplastischer oder kanzeröser Prozess des darunterliegenden Plattenepithels zu Grunde liegt (Yu *et al.*, 2009).

In einer Langzeit-Studie von 1999 bis 2017 wurde bei ungefähr 20 % der Patienten mit einer rezidivierenden Leukoplakie der Stimmlippe ein Plattenepithelkarzinom diagnostiziert (Jabarin *et al.*, 2018). Dies verdeutlicht die Wichtigkeit der ausführlichen Diagnostik und Therapie solcher Veränderungen.

1.2 Anatomie des Larynx

1.2.1 Makroskopie

Der Larynx ist das stimmbildende Organ des Menschen, zudem schützt er beim Schluckakt die Atemwege vor Aspiration und ist Teil des Respirationstraktes. Er reicht von der Epiglottis bis zum Ringknorpel und besteht in seinem groben Aufbau aus einem Knorpelskelett, Muskeln, Bändern, Bindegewebe und Schleimhaut (Schiebler und Korf, 2007).

Anatomisch kann man den Kehlkopf in verschiedene Ebenen unterteilen, den supraglottischen, den glottischen und den subglottischen Raum (Waschke *et al.*, 2015).

Die Stimmlippen, am Schildknorpel und den Stellknorpeln ansetzend, bestehen aus dem beidseitigen *Ligamentum vocale*, dem rechten sowie dem linken *Musculus thyroarytenoideus, pars medialis*, auch *Musculus vocalis* genannt, und aus bedeckendem mehrschichtigem Plattenepithel (Schünke *et al.*, 2015).

Um entsprechende Veränderungen der Stimmlippen zu verorten, kann man diese anhand des ICD-O-3-Codes der WHO (Wittekind, 2017) in vordere beziehungsweise hintere Kommissur sowie vorderes, mittleres und hinteres Stimmlippendrittel (siehe Abbildung 1) untergliedern.

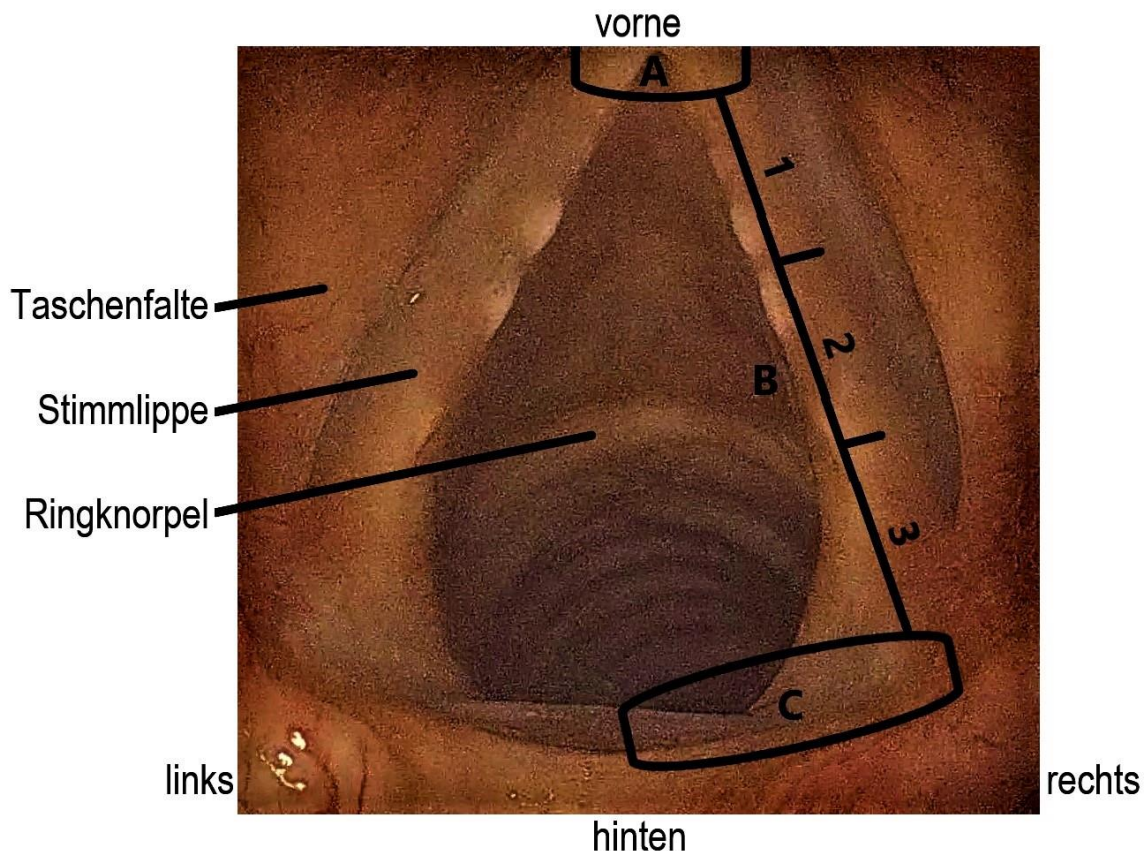


Abbildung 1: Glottis in Respirationsstellung

Die Aufnahme verdeutlicht die Nomenklatur zur Einteilung der Lokalisation von Neubildungen auf der Stimmlippe. Der Bereich A stellt die vordere Kommissur dar, Bereich B ist die Stimmlippe selbst, unterteilt in vorderes (1), mittleres (2) und hinteres Stimmlippendrittel (3), Bereich C veranschaulicht die hintere rechte Kommissur. Zudem sind Taschenfalte und Ringknorpel zu erkennen (mit freundlicher Genehmigung von Dr. med. Fabian Kraus, Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten, plastische und ästhetische Operationen des Universitätsklinikums Würzburg).

1.2.2 Mikroskopie

Die Schleimhaut des Kehlkopfes besteht in den mechanisch beanspruchten Teilen, wie den Stimmlippen, aus mehrschichtigem, unverhornten Plattenepithel, der restliche Anteil wie die kehlkopfzugewandte Seite der Epiglottis oder die Taschenfalten werden von respiratorischem Epithel bedeckt (Stiblar-Martincic, 1997). In Abbildung 2 ist ein Gewebeschnitt des gesunden Stimmlippenepithels dargestellt, welcher dessen Aufbau veranschaulicht. In der unteren Schicht des Plattenepithels, dem *Stratum basale*, befinden sich vor allem kubische Zellen mit einem runden, basal liegenden Zellkern (Welsch *et al.*, 2014). Im *Stratum intermedium*, in welchem sich die Zellen zunehmend differenzieren, bis hin zur

obersten Schicht, dem *Stratum superficiale*, werden die Zellen immer abgeflachter und der Zellkern schrumpft (Lüllmann-Rauch, 2012).

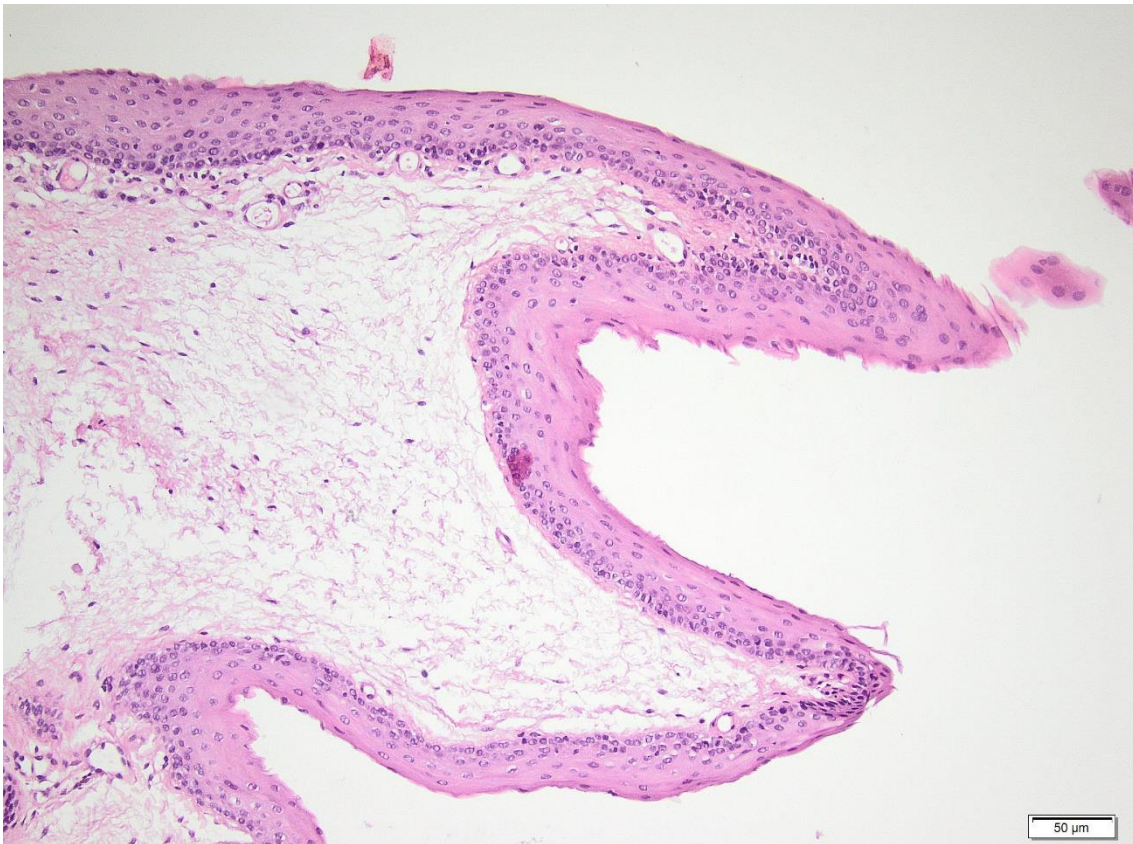


Abbildung 2: Gesundes Plattenepithel der Stimmlippe, HE-gefärbt in zehnfacher Vergrößerung
Zu sehen ist der charakteristische Aufbau des mehrschichtigen, unverhornten
Plattenepithels mit *Stratum basale*, *Stratum intermedium* und *Stratum superficiale*.

Auf dem hinteren Teil der Glottis (hintere Anteile der Stimmlippen sowie die Stellkörper bedeckende Schleimhautareale) kann sich zudem auch respiratorisches Flimmerepithel befinden (Hirano *et al.*, 1986). Daneben kann auch Übergangsepithel auftreten, welches wiederum verschiedene Stufen sowohl des mehrschichtigen Plattenepithels als auch des zylindrischen Epithels des Respirationstraktes enthält (Nakano, 1998).

1.3 Keratosen der Stimmlippe

1.3.1 Definition

Keratosen können als Verhornungsanomalie mit mäßiger Verdickung des *Stratum corneum* beschrieben werden (Darier, 1923). Es handelt sich also um Veränderungen der oberen Epithelschichten.

1.3.2 Histologie

Da das Stimmlippenepithel, wie zuvor beschrieben, in der Regel nicht verhornend ist, handelt es sich bei dessen Verhornung um einen pathologischen Prozess. Als Akanthose bezeichnet man die Verbreiterung des *Stratum spinosum*, in dem die Verhornungsprozesse beginnen. Löst sich der Zellverbund der Keratinozyten in dieser Schicht, spricht man von einer Akantholyse (Kempf *et al.*, 2015). Insgesamt werden frühzeitige, einzelne, pathologische Verhornungen von Keratinozyten als Dyskeratosen bezeichnet (Altmeyer *et al.*, 2002). Die Verhornung kann dabei regelrecht, also orthokeratotisch, ablaufen. Dort besteht die Hornschicht aus kernlosen Korneozyten (Riede und Bianchi, 2004). Geschieht dies übermäßig, spricht man von einer Hyperkeratose. Dem gegenüber steht die irreguläre Verhornung, die Parakeratose, bei der Zellkernreste im verhornenden Anteil des Epithels bestehen bleiben (Böcker und Aguzzi, 2008).

1.3.3 Therapie

Keratosen der Stimmlippe werden klinisch als in Kapitel 1.1 beschriebene Leukoplakien sichtbar. Mit einer reinen Blickdiagnostik ist deshalb keine Diagnostizierung möglich, da mit Hilfe der endoskopischen und klinischen Untersuchung allein keine sichere Zuordnung bezüglich der zugrundeliegenden histopathologischen Veränderung möglich ist. Somit wird eine Probenbiopsie und eine histopathologische Aufarbeitung des Gewebes durchgeführt.

1.4 Plattenepitheliale Dysplasien der Stimmlippe

1.4.1 Definition

Das Wort „Dysplasie“ leitet sich etymologisch aus dem Griechischen ab und bedeutet „abweichende Form“ (Dudenredaktion, 2015).

1.4.2 Histologie

Von dysplastischen Veränderung des Plattenepithels spricht man, sobald das Stadium der Epithelhyperplasie, also die Erhöhung der Anzahl gesunder und gewebstypischer Zellen, überschritten ist und es zu zytologischen Veränderungen der Keratinozyten, wie zum Beispiel Zell- oder Kernpleomorphismen, kommt (Speight, 2007).

In Tabelle 1 sind die zytologischen Merkmale der verschiedenen Dysplasiegrade zusammengefasst, die der Einteilung der Studiengruppen dieser Arbeit zugrunde liegen.

Tabelle 1: Zytologische Merkmale der verschiedenen Dysplasiegrade nach WHO-Einteilung 2005 (Barnes *et al.*, 2005)

| Dysplasiegrad | Beteiligte Schichten | Zell- und Kernpleomorphismus | Kernhyperchromatismus | Anisozytose und Anisonukleose | Vermehrt Mitosefiguren, abnormale Mitosen | Vergrößerte Zellen und Zellkerne | Vergrößerte Nucleolen | Apoptosefiguren |
|-----------------|--------------------------|------------------------------|-----------------------|-------------------------------|---|----------------------------------|-----------------------|-----------------|
| Leichtgradig | Unteres Drittel | ✓ | ✓ | | | | | |
| Mäßiggradig | Bis ins mittlere Drittel | ✓ | ✓ | ✓ | | | | |
| Schwergradig | Bis ins obere Drittel | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| Carcinoma i. s. | Gesamte Schicht | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |

Neben den zytologischen Veränderungen spielt der Aufbau des veränderten Plattenepithels zur Einteilung in die unterschiedlichen Gruppen der Dysplasien eine wichtige Rolle. So liegt beim Dysplasiegrad I (leichtgradige Dysplasien) eine Basalzellhyperplasie vor, während bei Grad II (mäßiggradige Dysplasien) die Polarität in den unteren zwei Dritteln des Epithels verloren geht und sich schließlich bei Grad III (schwergradige Dysplasien) Akantholyse und Dyskeratosen finden lassen, bis die Polarität beim *Carcinoma in situ* völlig aufgehoben scheint (Barnes *et al.*, 2005). In Abbildung 3, Abbildung 4 und Abbildung 5 sieht man Gewebeschnitte mit den zuvor genannten pathologischen Veränderungen des Stimmlippenepithels.

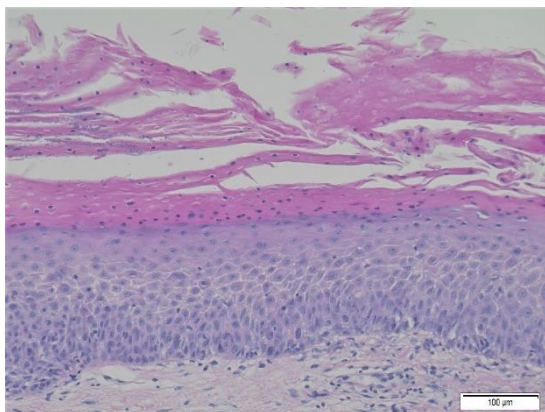


Abbildung 3: Leichtgradige Dysplasie des Stimmlippenepithels mit Hyperparakeratose der Stimmlippe, HE-gefärbt in 20-facher Vergrößerung



Abbildung 4: Mäßiggradige Dysplasie des Stimmlippenepithels mit Hyperparakeratose der Stimmlippe, HE-gefärbt in 20-facher Vergrößerung

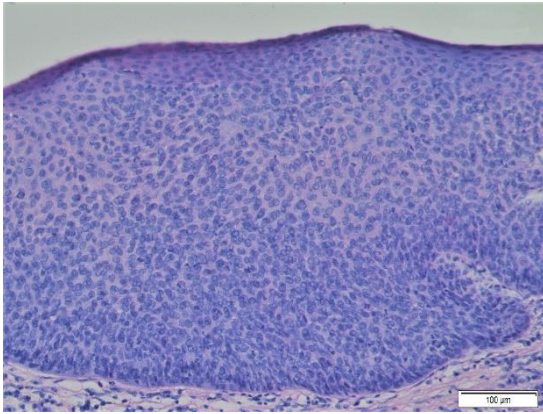


Abbildung 5: Schwergradige Dysplasie des Stimmlippenepithels ohne invasive Komponente, HE-gefärbt in 20-facher Vergrößerung

1.4.3 Risikofaktoren

Risikofaktoren für die Entstehung von dysplastischen Veränderungen der Stimmlippe sind denen der Entstehung eines plattenepithelialen Karzinoms sehr ähnlich. Tabakkonsum sowie regelmäßiger Alkoholkonsum sind prädisponierende Faktoren für die Entstehung von Dysplasien des Stimmlippenepithels (Grasl *et al.*, 1990). Weitere Risikofaktoren sind in Kapitel 1.5.5 dargestellt.

1.4.4 Klassifikationssysteme

Es wurden in der Vergangenheit verschiedene Klassifikationssysteme zur Einteilung von Dysplasiegraden publiziert, die sich an den histopathologischen Veränderungen orientieren. Ziel dieser Einteilungen ist es, eine Korrelation zwischen histologischen Befunden und der Prognose herzustellen, um das Ausmaß der Therapieradikalität festzulegen. Neben den drei Dysplasiegraden der WHO-Klassifikation von 2005 (Barnes *et al.*, 2005), welche vom Pathologischen Institut der Universität Würzburg angewendet werden, gibt es weitere Möglichkeiten, die Veränderungen des Epithels zu kategorisieren. Als Beispiel sei hier die „*Ljubljana classification*“ von 1997 genannt. Unterteilt werden hier einfache Hyperplasie (reguläre Epithelschichtung ohne Zellatypien), abnorme Hyperplasie (Veränderungen in den basalen Schichten des Epithels), atypische Hyperplasie (Zellatypien, einige Mitosen, Dyskeratosen in den unteren zwei Dritteln des Epithels) und das *Carcinoma in situ* (völliger Polaritätsverlust des Epithels, Zellatypien, viele mitotische Figuren) (Hellquist *et al.*, 1999). Später

wurden in einer geänderten Fassung der „*Ljubljana classification*“ die ersten beiden Kategorien zu leichtgradigen plattenepithelialen Läsionen zusammengefasst, die dritte Kategorie in hochgradige plattenepitheliale Läsionen umbenannt und das *Carcinoma in situ* als Kategorie belassen (Gale *et al.*, 2014).

An diesem Schema orientiert sich die Klassifizierung dysplastischer Veränderungen der aktuellen Ausgabe der Klassifikation von Tumoren im Kopf- und Halsbereich von 2017. Dabei werden Kriterien verschiedener Klassifikationen zusammengefasst, was mehr Objektivität schaffen soll, um die verschiedenen Dysplasieregrade als prognostischen Faktor für die Entstehung eines Karzinoms zu verwenden (Naggar *et al.*, 2017). In der neuen Einteilung der WHO von 2017 wird zwischen „*low-grade dysplasias*“ (ehemals leicht- und mäßiggradige Dysplasien) und „*high-grade dysplasias*“ (ehemals schwergradige Dysplasien einschließlich des *Carcinoma in situ*) unterschieden.

1.4.5 Therapie

In der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten, plastische und ästhetische Operationen des Universitätsklinikums Würzburg werden Stimmlippenleukoplakien im Rahmen einer Mikrolaryngoskopie komplett exzidiert. Werden leicht- und mäßiggradige dysplastische Veränderungen diagnostiziert, erfolgen klinische Nachkontrollen des Larynxbefundes, um mögliche Rezidive zu erkennen. Um ein möglichst gutes funktionelles Ergebnis insbesondere in Bezug auf die Stimmfunktion zu erhalten, erfolgt eine sparsame oberflächliche, aber komplette Resektion. Aufgrund der Reversibilität gerade leichtgradiger Dysplasien ist eine subtotale Resektion in diesen Fällen tolerabel, solange regelmäßige Nachkontrollen stattfinden. Wenn in der histopathologischen Aufarbeitung eine schwergradige Dysplasie oder ein *Carcinoma in situ* nachgewiesen wird, erfolgt in der Regel eine zweite Operation zur Nachresektion, um eine R0-Resektion, das heißt einen Resektionsrand in gesundem Gewebe, mit höchster Sicherheit zu gewährleisten. In diesen Fällen werden subtotale Resektionen nicht toleriert. Die Wahrscheinlichkeit, dass sich schwergradige Dysplasien oder ein *Carcinoma in situ* zu einem invasiven

Karzinom entwickeln, liegt bei ungefähr 16 bis 50 % (Ren *et al.*, 2017; Rohde *et al.*, 2012; Stenersen *et al.*, 1991).

1.5 Plattenepithelkarzinome der Stimmlippen

1.5.1 Definition

Im Unterschied zu den dysplastischen Veränderungen des Plattenepithels und dem *Carcinoma in situ* ist bei einem invasiven Karzinom der Stimmlippe die Basalmembran durchbrochen und Tumorinseln, Tumorstränge oder isolierte Tumorzellen infiltrieren in die Tiefe (Böcker und Aguzzi, 2008).

Synonym können die Begriffe glottisches Larynxkarzinom sowie Glottiskarzinom verwendet werden.

1.5.2 Epidemiologie

Larynxkarzinome (glottische Larynxkarzinome einschließlich supra-, sub- und transglottischer Larynxkarzinome) gehören zu den häufigsten Kopf-Hals-Malignomen. Diese machen in Deutschland 1,5 % aller Tumoren bei Männern aus, wobei diese sieben Mal häufiger betroffen sind als Frauen (Probst *et al.*, 2008). 2014 gab es in Deutschland insgesamt 3.500 Neuerkrankungen eines Larynxkarzinoms bei einer Prävalenz von 12.700 Erkrankungen (Robert-Koch-Institut und Gesellschaft-der-epidemiologischen-Krebsregister-in-Deutschland-e.V., 2017). Der Anteil der glottischen Larynxkarzinome liegt bei 75 bis 80 % mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 69,9 % (Pantel und Guntinas-Lichius, 2012). Das mittlere Alter der Erstdiagnose eines Larynxkarzinoms liegt bei 62 Jahren und im Falle der Lokalisation an der Glottis wird dieses aufgrund der frühzeitig auftretenden Dysphonie häufig in einem frühen Stadium diagnostiziert (Peller *et al.*, 2016).

1.5.3 Histologie

Es gelten allgemeine zytologische Kriterien eines Tumors, wie unterschiedlich große Zellkerne, pathologische Kernformen und eine Veränderung der Kern-Zytoplasma-Beziehung (Bechtelsheimer *et al.*, 2013), sowie histologische Merkmale, wie eigenständiges Wachstum, Infiltration des Nachbargewebes und eine unscharfe Begrenzung (Addicks *et al.*, 2013). In Abbildung 6 ist ein Gewebeschnitt eines invasiven Plattenepithelkarzinoms der Stimmlippe dargestellt.

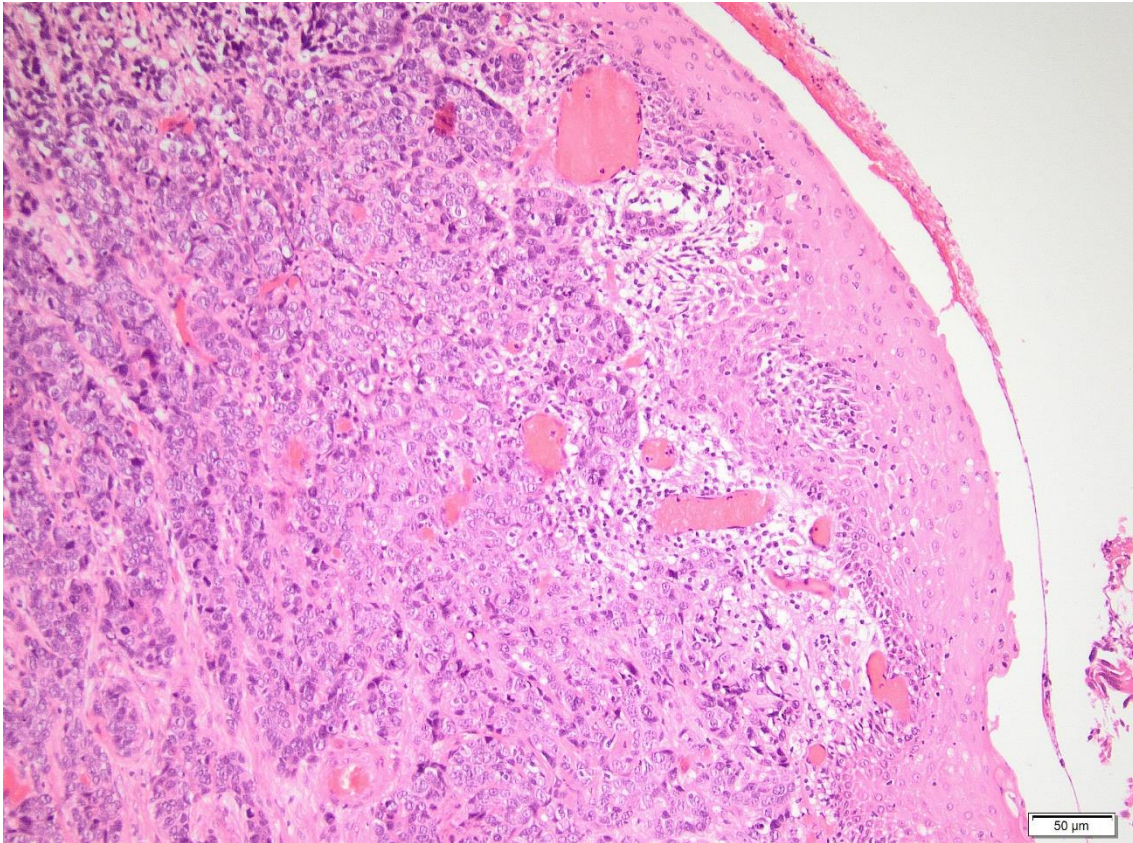


Abbildung 6: Invasives, plattenepitheliales Karzinom der Stimmlippe, HE-gefärbt in zehnfacher Vergrößerung

Der Vorgang der Infiltration lässt sich, falls dies histopathologisch nicht eindeutig möglich ist, beispielsweise mit Hilfe einer immunhistochemischen Färbung von Laminin 5 nachweisen. Der Nachweis eines diskontinuierlichen Musters des in der Basalmembran vorkommenden Glykoproteins deutet auf eine nicht intakte Basalmembran hin (Rahman *et al.*, 2013). Des Weiteren lassen sich Unterschiede der Morphologie des Zellkerns von gesundem zu kanzerösem Plattenepithel nachweisen (Namyslowski *et al.*, 2004; Scierski *et al.*, 2003).

1.5.4 Symptomatik

Das klinische Hauptsymptom, das auf ein glottisches Larynxkarzinom hindeutet, ist Heiserkeit, seltener treten Atemnot, Halsschmerzen und Schluckstörungen auf (Raitiola und Pukander, 2000).

1.5.5 Risikofaktoren

Unumstrittene ätiologische Faktoren für die Entstehung eines Larynxkarzinoms sind vor allem Nikotinabusus und Alkoholmissbrauch (Vassileiou *et al.*, 2012). Auch schon das passive Einatmen von Zigarettenrauch kann als

prädisponierender Faktor angesehen werden (Mallis *et al.*, 2011). Weitere Risikofaktoren seien das Trinken von Kaffee (Chen und Long, 2014) sowie ein mäßiger Einfluss von Asbest-Belastung (Ramroth *et al.*, 2011). So ist das Larynxkarzinom in Deutschland eine anerkannte, asbestverursachte Berufskrankheit (Arendt *et al.*, 2013).

Auch kann ionisierende Strahlung, wie zum Beispiel nach der Nuklearkatastrophe in Chernobyl (Antoniv *et al.*, 2017) oder nach vorausgegangener Radiotherapie (Van der Laan *et al.*, 1995; Weichselbaum *et al.*, 1991) ein Risikofaktor für die Entstehung eines Larynxkarzinoms sein.

Kontrovers diskutiert wird, ob laryngopharyngealer Reflux die Entstehung eines Karzinoms begünstigt (Tae *et al.*, 2011) oder möglicherweise der Zusammenhang zwischen Tabak- und Alkoholkonsum einen verfälschenden Einfluss auf die eigentliche Relation von Reflux und der Karzinogenese hat (Coca-Pelaz *et al.*, 2013). Der Einfluss von Humanen Papillomaviren scheint bei der Karzinogenese des Larynxkarzinoms eine untergeordnete Rolle zu spielen (Gheit *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2013).

1.5.6 Einteilung

Anhand des Differenzierungsgrades der Epithelzellen des Karzinoms erfolgt das *Grading* von Larynxkarzinomen. Es kann zwischen einem gut, mäßig oder gering differenzierten plattenepithelialen Karzinom unterschieden werden (Naggar *et al.*, 2017).

Ein gut differenziertes Karzinom ist gesundem Plattenepithel ähnlich, im mäßig differenzierten Karzinom lassen sich Kernpleomorphismen und mitotische Figuren finden, wohingegen die Zellen des wenig differenzierten Karzinoms unreifen Keratinozyten ähneln (Bonhin *et al.*, 2014).

1.5.7 Therapie

Mittels der TNM-Klassifikation wird das Larynxkarzinom anhand von Tumorgröße, regionärem Lymphknotenbefall und Fernmetastasen von der „*Union for International Cancer Control*“ in verschiedene Stadien eingeteilt (Brierley *et al.*, 2016).

Die Therapie wird je nach Stadium individuell und interdisziplinär von Patient zu Patient entschieden. Operative Tumorsektionen können beispielsweise über

eine mikroskopische, laserchirurgische Tumorresektion, eine Kehlkopfteilresektion von außen oder eine totale Laryngektomie durchgeführt werden. Zudem hat die Strahlentherapie sowohl als alleinige primäre Radiatio als auch als adjuvante Radiatio einen festen Bestandteil in der Therapie des Larynxkarzinoms (Leitlinienprogramm Onkologie *et al.*, 2018).

1.6 Raman-Spektroskopie

1.6.1 Historie

Die Entdeckung der Raman-Streuung geht auf Sir C. V. Raman und Sir K. S. Krishnan im Jahre 1928 zurück, die von ihnen erstmals anhand der Durchleuchtung von Flüssigkeiten nachgewiesen wurde (Raman und Krishnan, 1928). Für die Dokumentation dieser Streuung und den damit assoziierten Forschungsergebnissen erhielt Raman 1930 den Nobelpreis im Fach Physik (Loader, 1970). Die theoretischen Grundlagen hierfür legte der österreichische Physiker Adolf Smekal, der den Effekt bereits 1923 voraussagte (Smekal, 1923).

1.6.2 Physikalischer Hintergrund

Die Raman-Spektroskopie bezieht sich auf den physikalischen Effekt, den Licht beim Durchdringen von Materie auf dessen Bestandteile ausübt. Dabei können mehrere Effekte eintreten. Zum einen kann eine Interaktion der zu untersuchenden Materie mit den Photonen ausbleiben oder das Licht kann partiell oder vollständig absorbiert werden. Eine weitere Möglichkeit ist die Streuung des Lichtes an den Molekülen der Materie (Smith und Dent, 2005). Grundsätzlich existieren mehrere Arten der Streuung, zum Beispiel die elastische Streuung, auch Rayleigh-Streuung genannt, bei der die eintretenden und die gestreuten Photonen gleich viel Energie besitzen (Strutt, 1871), während sich bei der unelastischen Raman-Streuung, auch Stokes- und Anti-Stokes-Streuung genannt, das Energieniveau der Photonen ändert (Kneipp *et al.*, 2007).

Beim Raman-Effekt interagieren die Photonen mit Bindungen des mit einem Laser bestrahlten Materials. Die entsprechende Bindung wird dabei in einen anderen Schwingungszustand versetzt, es wird Energie vom Molekül auf das einstrahlende Photon oder vom einstrahlenden Photon auf das Molekül übertragen (Gilson und Hendra, 1970). Die dabei entstehende Energiedifferenz drückt sich durch eine Veränderung der Wellenlänge des einstrahlenden im

Verhältnis zum gestreuten Photon aus (Crow *et al.*, 2003). Auf diese Weise können durch das aufgezeichnete Spektrum bindungs- beziehungsweise molekülspezifische Maxima dokumentiert werden (Talari *et al.*, 2015). Das Raman-Spektrum ist damit abhängig von der molekularen Zusammensetzung des zu untersuchenden Stoffes beziehungsweise des zu untersuchenden Gewebes. Da sich die Veränderung der Wellenlänge umgekehrt proportional zur Wellenzahl verhält, wird die Verschiebung des Spektrums mit der Einheit cm^{-1} skaliert (Colthup, 2012).

1.6.3 Technik

In der Regel wird im Raman-Spektroskop ein monochromatischer Laser als Lichtquelle genutzt. Das gestreute Licht wird mithilfe mehrerer Monochromatoren und Filter in ein Spektrum aufgefächert und mittels CCD-Sensoren (Sensoren mit ladungsgekoppelten Elementen) registriert und aufgezeichnet (Smith und Dent, 2005). In den meisten Fällen werden die Spektroskope durch ein Mikroskop ergänzt, um bestimmte Bereiche in der zu untersuchenden Probe zu fokussieren. In Abbildung 7 ist der Aufbau des verwendeten Raman-Spektroskops schematisch dargestellt.

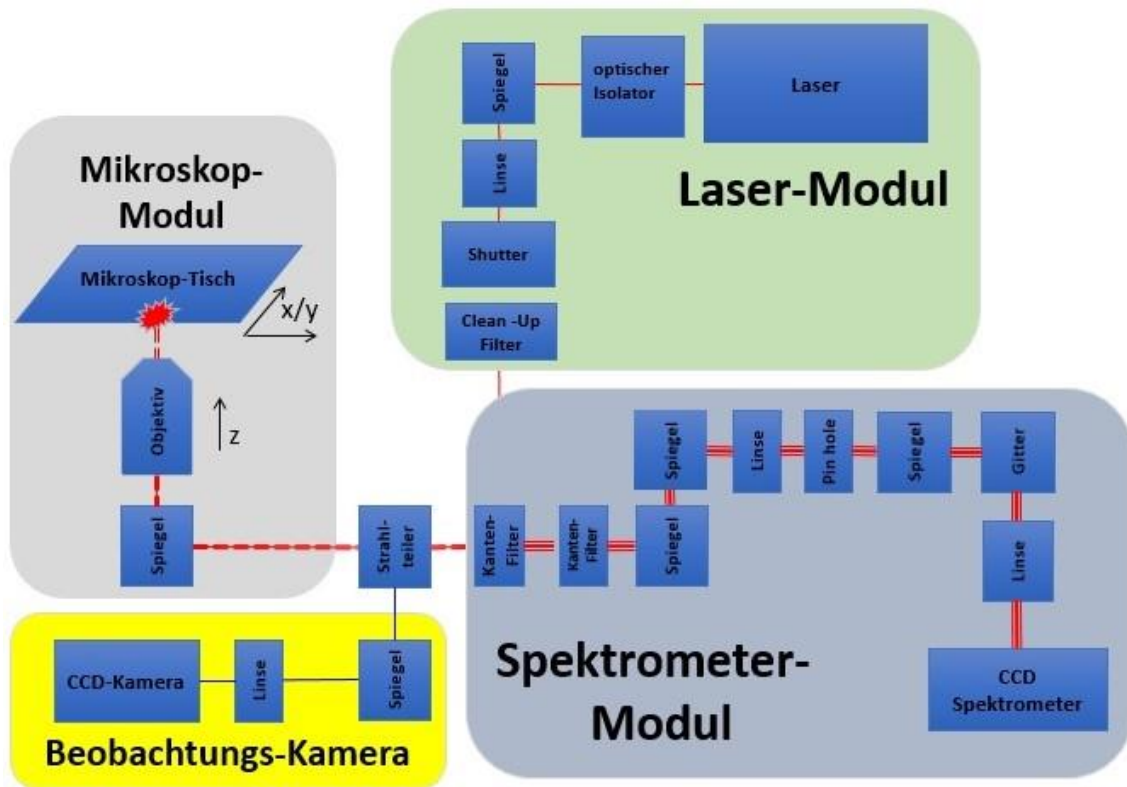


Abbildung 7: Schematische Darstellung des verwendeten Raman-Spektroskops
 Die Skizze veranschaulicht den Aufbau eines Raman-Spektroskops mit den Modulen des Mikroskops, der Kamera, des Lasers sowie des Spektrometers (mit freundlicher Genehmigung der CellTool GmbH).

1.6.4 Anwendung

Die Raman-Spektroskopie findet viele Anwendungsbereiche in der Wissenschaft, beginnend mit der Untersuchung von anorganischen Stoffen und Mineralien (Wang *et al.*, 1994), der Identifikation von Polymeren (Chalmers und Griffiths, 2002) sowie der Untersuchung von biologischem Material (Gremlich und Yan, 2000).

Neuere Studien zeigen, dass es in Abhängigkeit des gewählten Zielvolumens möglich ist, einzelne Zellen und auch einzelne Zellkompartimente zu untersuchen. So kann mithilfe der Informationen aus der Raman-Spektroskopie auf die molekularbiologische Zusammensetzungen der Zelle geschlossen werden, die einen „*fingerprint*“ (Ellis und Goodacre, 2006) der jeweiligen Zelle ergeben. Diesen „Fingerabdruck“ kann man nutzen, um verschiedene Zellen wie zum Beispiel Bakterien zu identifizieren (Xie *et al.*, 2005) oder den Differenzierungsgrad von Stammzellen zu bestimmen (Ilin *et al.*, 2015).

Auch in der Onkologie konnten schon Forschungsergebnisse mithilfe der Raman-Spektroskopie erzielt werden. So konnte zwischen benignen und malignen Formen des Prostatakarzinoms unterschieden werden (Magalhaes *et al.*, 2018) oder aus Feinnadelbiopsien gewonnene Zellen Subtypen von Schilddrüsenkrebs zugeordnet werden (O'Dea *et al.*, 2018). Auch im Kopf- und Halsbereich konnten Forschungsgruppen zwischen gesundem und kanzerösem Gewebe diskriminieren (Cals *et al.*, 2018; Hoesli *et al.*, 2017; Holler *et al.*, 2017).

1.7 Zielsetzung

Derzeit werden Leukoplakien der Stimmlippe unter Berücksichtigung histomorphologischer Kriterien klassifiziert. Entsprechend dieser Klassifikation in Anlehnung des Grades der Dysplasie wird die Radikalität der Therapie angepasst. Es besteht zwar eine prognostische Korrelation zwischen dem Schweregrad der Dysplasie und der Entstehung eines invasiven Plattenepithelkarzinoms im Verlauf, jedoch ist diese Korrelation in vielen Fällen nicht verlässlich.

Daraus resultiert praktisch, dass einige Patienten Untertherapien und einige Übertherapien erfahren. Speziell an der Stimmlippe bewirken nur wenige Millimeter größere Resektionen eine erhebliche Einschränkung der Stimmfunktion, wohingegen zu kleine Resektionen in eine schlechtere onkologische Prognose münden.

Wünschenswert wäre eine Klassifikation, welche mit einer höheren Korrelation die Entstehung eines invasiven Plattenepithelkarzinoms vorhersagen könnte, woraus sich gegebenenfalls therapeutische Konsequenzen ableiten lassen.

Aktuell verfügbare histopathologische Klassifikationen können bislang nur eingeschränkt als therapeutischer Marker eingesetzt werden.

Die Raman-Spektroskopie lässt auf biomolekulare Eigenschaften des Gewebes schließen, was einen Ansatz darstellen kann, entsprechende Veränderungen der Stimmlippe zu klassifizieren.

Ziel dieser Arbeit ist es, zu evaluieren, ob mithilfe von Spektraldaten der Raman-Spektroskopie Gewebeproben der Stimmlippe nach Dysplasiegrad oder klinischen Parametern, wie beispielsweise dem Risiko der Entstehung eines invasiven Plattenepithelkarzinoms, klassifiziert werden können und ob das

Raman-Spektrum, zusätzlich zur Histomorphologie, als therapeutischer Marker geeignet ist.

Dazu wurde ein retrospektives Studiendesign verwendet, um ein großes Kollektiv und einen langen Nachbeobachtungszeitraum zu untersuchen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verwendetes Gewebe

Die vorliegende Studie wurde an entparaffinierten Gewebeproben durchgeführt. Die Gewebeproben wurden allesamt in der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten, plastische und ästhetische Operationen des Universitätsklinikums Würzburg im Rahmen einer Operation in Allgemeinanästhesie entnommen und vom Pathologischen Institut aufbereitet und begutachtet. Das verdächtige Gewebe der Stimmlippen wurde mithilfe eines scharfen Doppellöffels, Scherchen und in einigen Fällen auch mit einem CO₂-Laser entnommen und an die Pathologie verschickt. Daraufhin wurde dieses in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Tabelle 2 stellt die verwendeten Gewebeproben nach Studiengruppe geordnet dar.

Die Studie wurde von der Ethik-Kommission der Universität Würzburg genehmigt (129/18). Es erfolgte eine schriftliche Aufklärung der Patienten.

Tabelle 2: Liste verwendeter Gewebeproben mit histopathologischen Diagnosen des Patienten

| Studiennummer | Histopathologische Diagnosen |
|---------------|--|
| I.1 | Hyperparakeratose |
| I.2 | Akanthose, Hyperparakeratose |
| I.3 | Akanthose |
| I.4 | Hyperkeratose |
| I.5 | Hyperparakeratose, Hyperorthokeratose |
| I.6 | Akanthose, Hyperorthokeratose |
| I.7 | Hyperparakeratose |
| I.8 | Akanthose, Hyperkeratose |
| I.9 | Akanthose, Parakeratose, Hyperkeratose |
| I.10 | Akanthose, Hyperparakeratose |
| II.1 | leichtgradige plattenepitheliale Dysplasie, Parakeratose, Hyperkeratose |
| II.2 | leichtgradige plattenepitheliale Dysplasie, Akanthose, Hyperkeratose |
| II.3 | leichtgradige, verruköse plattenepitheliale Dysplasie, Akanthose, Hyperparakeratose |
| II.4 | leichtgradige plattenepitheliale Dysplasie |
| II.5 | leichtgradige plattenepitheliale Dysplasie, Hyperparakeratose |
| II.6 | leichtgradige plattenepitheliale Dysplasie, Dyskeratose, Parakeratose, Hyperkeratose |
| II.7 | leichtgradige plattenepitheliale Dysplasie, Dyskeratose, Akanthose, Hyperparakeratose, Hyperorthokeratose |
| II.8 | leichtgradige plattenepitheliale Dysplasie |
| II.9 | leichtgradige plattenepitheliale Dysplasie |
| II.10 | leichtgradige plattenepitheliale Dysplasie, Hyperkeratose |
| III.1 | mäßiggradige plattenepitheliale Dysplasie, Akanthose, Parakeratose, Orthokeratose |
| III.2 | mäßiggradige plattenepitheliale Dysplasie, Hyperparakeratose |
| III.3 | mäßiggradige plattenepitheliale Dysplasie, Akanthose, Hyperkeratose |
| III.4 | mäßiggradige plattenepitheliale Dysplasie, Akanthose, Hyperparakeratose |
| III.5 | mäßiggradige plattenepitheliale Dysplasie, Akanthose, Hyperorthokeratose |
| III.6 | mäßiggradige plattenepitheliale Dysplasie, leichtgradige plattenepitheliale Dysplasie, Akantholyse, Akanthose, Hyperparakeratose, Orthokeratose |
| III.7 | mäßiggradige plattenepitheliale Dysplasie, Akanthose, Hyperparakeratose |
| III.8 | mäßiggradige plattenepitheliale Dysplasie, leichtgradige plattenepitheliale Dysplasie, Parakeratose |
| III.9 | mäßiggradige plattenepitheliale Dysplasie, Hyperparakeratose |
| III.10 | mäßiggradige plattenepitheliale Dysplasie, Hyperparakeratose |
| IV.1 | schwergradige plattenepitheliale Dysplasie, mäßiggradige plattenepitheliale Dysplasie, |
| IV.2 | schwergradige plattenepitheliale Dysplasie, mäßiggradige plattenepitheliale Dysplasie, Hyperorthokeratose |
| IV.3 | schwergradige plattenepitheliale Dysplasie, mäßiggradige plattenepitheliale Dysplasie |
| IV.4 | schwergradige plattenepitheliale Dysplasie, mäßiggradige plattenepitheliale Dysplasie, Akanthose, Hyperkeratose |
| IV.5 | schwergradige plattenepitheliale Dysplasie |
| IV.6 | schwergradige plattenepitheliale Dysplasie |
| IV.7 | schwergradige plattenepitheliale Dysplasie, mäßiggradige plattenepitheliale Dysplasie, leichtgradige plattenepitheliale Dysplasie, Hyperparakeratose |
| IV.8 | schwergradige plattenepitheliale Dysplasie, mäßiggradige plattenepitheliale Dysplasie, Hyperparakeratose, Hyperorthokeratose |
| IV.9 | <i>Carcinoma in situ</i> , schwergradige plattenepitheliale Dysplasie, mäßiggradige plattenepitheliale Dysplasie, Hyperparakeratose |
| IV.10 | <i>Carcinoma in situ</i> |
| V.1 | invasives plattenepitheliales Karzinom (mäßig differenziert, gering verhornt), leichtgradige plattenepitheliale Dysplasie |
| V.2 | invasives plattenepitheliales Karzinom, <i>Carcinoma in situ</i> |
| V.3 | invasives plattenepitheliales Karzinom (gut differenziert, partiell verhornt), schwergradige plattenepitheliale Dysplasie |
| V.4 | invasives plattenepitheliales Karzinom (mäßig differenziert, abortiv verhornt) |
| V.5 | invasives plattenepitheliales Karzinom (mäßig differenziert, abortiv verhornt), <i>Carcinoma in situ</i> |
| V.6 | invasives plattenepitheliales Karzinom (mäßig differenziert, verhornt) |
| V.7 | invasives plattenepitheliales Karzinom (gut differenziert, verhornt) |
| V.8 | invasives plattenepitheliales Karzinom (wenig differenziert, nicht verhornt), <i>Carcinoma in situ</i> |
| V.9 | invasives plattenepitheliales Karzinom (gut differenziert, verhornt) |
| V.10 | invasives plattenepitheliales Karzinom (gut differenziert, verhornt) |

2.1.2 Geräte und Software

Tabelle 3: Liste verwendeter Geräte mit Hersteller

| Gerät | Hersteller |
|---|--|
| Abzug | Prutscher, Neudörfel [AT] |
| Kühlblock EG1150C | Leica, Wetzlar [DE] |
| Manueller Objektträgerdrucker VSP5001 | Vogel, Fernwald [DE] |
| Mikroskop Keyence BZ 9000 | Keyence, Neu-Isenburg [DE] |
| Objektträgerschnelltrockner TDO66, 37 °C; 60 °C | Medite, Burgdorf [DE] |
| Raman Spektroskop BioRam® | CellTool, Bernried [DE] |
| Schlittenmikrotom SM2010R | Leica, Wetzlar [DE] |
| Timer | TFA Dostmann, Wertheim-Reicholzheim [DE] |
| Wasserbad Typ 1052 | GFL, Burgwedel [DE] |

Tabelle 4: Liste verwendeter Software mit Entwickler

| Software | Entwickler |
|----------------------------------|--------------------------------------|
| Endnote X8.1 | Thomson Reuters, Toronto [USA] |
| Keyence BZII-Analyzer 2.1 | Keyence, Neu-Isenburg [DE] |
| Keyence BZII-Viewer 2.1 | Keyence, Neu-Isenburg [DE] |
| Microsoft Office Excel 2010/2016 | Microsoft Corporation, Redmond [USA] |
| Microsoft Office Word 2010/2016 | Microsoft Corporation, Redmond [USA] |
| Microsoft Paint 2018 | Microsoft Corporation, Redmond [USA] |
| The UnscramblerX 10.3 | CAMO Software, Oslo [NO] |

2.1.3 Chemikalien

Tabelle 5: Liste verwendeter Chemikalien mit Hersteller

| Chemikalie | Hersteller |
|---------------------------------|--|
| Isopropanol $\geq 99,95$ % | Carl Roth, Karlsruhe [DE] |
| Entellan | Merck, Darmstadt [DE] |
| Eosin, 1 % | Morphisto, Frankfurt [DE] |
| Ethanol vergällt, $\geq 99,8$ % | Carl Roth, Karlsruhe [DE] |
| Hämatoxylin sauer nach Mayer | Morphisto, Frankfurt [DE] |
| VE-Wasser | Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin, Würzburg [DE] |
| Xylol > 98 % | Carl Roth, Karlsruhe [DE] |

2.1.4 Verbrauchs- und Labormaterialien

Tabelle 6: Liste verwendeter Verbrauchsmaterialien mit Hersteller

| Verbrauchsmaterial | Hersteller |
|------------------------------|-----------------------------------|
| Deckgläser 24x60 mm | Menzel-Gläser, Braunschweig [DE] |
| Deckgläser 26x76 mm | R. Langenbrinck, Emmendingen [DE] |
| Mikrotomklingen | pfm medical, Köln [DE] |
| Objektträger Polysine®Slides | Menzel-Gläser, Braunschweig [DE] |
| Pipettenspitzen | Eppendorf, Hamburg [DE] |
| Präzisionswischtücher | Kimberly-Clark, Surrey [GB] |
| Securline lab marker II | Aspen Surgical, Caledonia [USA] |

Tabelle 7: Liste verwendeter Labormaterialien mit Hersteller

| Labormaterial | Hersteller |
|-------------------------------------|----------------------------|
| Bechergläser | Schott, Mainz [DE] |
| Borstenpinsel Sorte 613 F | Pelikan, Hannover [DE] |
| Deckglaspinzette | Hartenstein, Würzburg [DE] |
| Drahtbügel aus rostfreiem Edelstahl | Hartenstein, Würzburg [DE] |
| Edelstahl-Färbeeinsatz mit Griff | Hartenstein, Würzburg [DE] |
| Färberahmen für Objektträger, Glas | Hartenstein, Würzburg [DE] |
| Glasküvette | Schott, Mainz [DE] |
| Haarpinsel Sorte 25 Größe 4/5 | Pelikan, Hannover [DE] |
| Mikropipette | Eppendorf, Hamburg [DE] |
| Pipettenspitzen Box | neoLab, Heidelberg [DE] |
| Sprühflasche | Hartenstein, Würzburg [DE] |
| Trichter | Hartenstein, Würzburg [DE] |

2.1.5 Angesetzte Lösungen

Tabelle 8: Liste verwendeter Lösungen mit Komponenten und Mischungsverhältnis

| Lösung | Komponenten |
|---------------|--|
| Ethanol, 50 % | Ethanol vergällt, $\geq 99,8$ %, gemischt mit VE-Wasser im Verhältnis 1:1 |
| Ethanol, 70 % | Ethanol vergällt, $\geq 99,8$ %, gemischt mit VE-Wasser im Verhältnis 2,33:1 |
| Ethanol, 96 % | Ethanol vergällt, $\geq 99,8$ %, gemischt mit VE-Wasser im Verhältnis 24:1 |

2.2 Methoden

2.2.1 Auswahl der Gewebeproben

Die Identifikation der Präparate erfolgte über das Krankenhaus-Informationssystem der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten, plastische und ästhetische Operationen des Universitätsklinikums Würzburg. Eingeschlossen wurden Patienten, die eine Operation an dieser erhalten haben und eine erstmalige Biopsie oder auch Exzisionsbiopsie einer Stimmlippe erhalten haben.

Die entsprechende Probebiopsie sollte dabei die erste Entnahme im Bereich der Stimmlippen beim jeweiligen Patienten sein. Die so ausgewählten Fälle datierten auf das Jahr 2013 und früher, mit dem Ziel, die Krankheitsgeschichte des Patienten über mindestens fünf Jahre beobachten zu können.

Die verschiedenen Präparate wurden aufgrund der pathologisch-histologischen Begutachtung des Pathologischen Instituts der Universität Würzburg in die Studiengruppen I bis V eingeteilt.

Gruppe I beinhaltet Präparate mit Leukoplakien ohne plattenepitheliale Dysplasie oder invasives Karzinomwachstum.

Der Studiengruppe II wurden Präparate mit einer leichtgradigen Dysplasie des Plattenepithels zugeteilt, der Studiengruppe III Gewebeproben mit mäßiggradigen Dysplasien und Studiengruppe IV Präparate mit schwergradigen Dysplasien und das *Carcinoma in situ*.

Gruppe V schließt alle Proben mit invasiven, plattenepithelialen Karzinomen der Stimmlippe als Erstdiagnose ein.

Alle verwendeten Gewebeproben sind in 2.1.1 tabellarisch aufgeführt.

Ausschlaggebend für die Einteilung in die Gruppen I bis V war die - im Rahmen des ersten Eingriffes - jeweils schwerwiegendste histopathologische Diagnose, welche vom Pathologischen Institut der Universität Würzburg gestellt wurde. Wurden bei einem Probanden zum Beispiel innerhalb einer Probe oder in verschiedenen Fraktionen der gleichen Probenentnahme sowohl leichtgradige als auch mäßiggradige Dysplasien diagnostiziert, so erfolgte eine Zuordnung des entsprechenden Probanden zur Studiengruppe III (mäßiggradige Dysplasien).

2.2.2 Erhebung der klinischen Parameter

Die patientenbezogenen Daten, wie Alter und Geschlecht, wurden der Dokumentation der jeweiligen Akten und des Krankenhaus-Informationssystems der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten, plastische und ästhetische Operationen des Universitätsklinikums Würzburg entnommen.

Angaben zum Tabakkonsum und Nikotinabusus wurden bei Erstaufnahme erfasst. Die Erhebung dieser Daten erfolgte jedoch nicht standardisiert. Patienten, die Tabak konsumierten, wurden in Raucher, ehemalige Raucher, keine Raucher und Patienten, zu denen keine Angaben vorlagen, kategorisiert. Falls anamnestisch erfragt, wurden angesammelte *pack years* (Multiplikation der pro Tag konsumierten Zigarettenpackungen mit der Anzahl der Jahre, in denen Zigaretten konsumiert wurden) dokumentiert. Der Alkoholkonsum der Patienten wurde unterteilt in regelmäßigen Alkoholkonsum (mindestens ein alkoholisches Getränk pro Tag), ehemals regelmäßigen Alkoholkonsum, gelegentlichen Alkoholkonsum, seltenen Alkoholkonsum sowie keinen Alkoholkonsum und Patienten, zu denen keine Angaben vorlagen oder diese nicht angegeben wurden.

Die Lokalisation der verdächtigen Schleimhautveränderung im Larynx, die Anzahl der operativen Eingriffe, der Beobachtungszeitraum (Dauer von Erstvorstellung bis zur letzten dokumentierten Vorstellung) sowie die Zeitspanne von Erstvorstellung bis zum histologischen Nachweis eines invasiven Plattenepithelkarzinoms wurden ebenfalls den gegebenen Operationsberichten und pathologischen Berichten im Krankenhaus-Informationssystem der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten, plastische und ästhetische Operationen des Universitätsklinikums Würzburg entnommen.

2.2.3 Herstellung der Paraffinschnitte

Zunächst wurden die in Paraffin eingebetteten Gewebeproben, die vom Pathologischen Institut der Universität Würzburg bereitgestellt wurden, auf einem Kühlblock mit etwa -5° Celsius temperiert.

Für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung wurden die Präparate 3,5 µm dick geschnitten und mithilfe von Pinseln in ein Wasserbad aus VE-Wasser (vollentsalztes Wasser) mit Zimmertemperatur übertragen. Anschließend wurden

die Schnitte auf beschriftete Objektträger übertragen, um sie in einem Wasserbad von 50° Celsius zu strecken.

Die Schnitte, die für die Raman-Spektroskopie verwendet werden sollten, wurden 20 µm dick geschnitten, um später nicht fälschlicherweise das Spektrum des Deckglases zu messen, sondern des dickeren Gewebeschnittes (Moerth, 2017). Vorerst wurden die Schnitte nach dem Übertragen in VE-Wasser mit Zimmertemperatur auch auf beschichtete Objektträger übertragen, weil sich die Schnitte beim direkten Übertragen auf die dünnen Deckgläser nicht mehr ausreichend strecken ließen. Im 50°C-Wasserbad wurden die Schnitte letztendlich auf Deckgläser mit einer Stärke von etwa 0,13 bis 0,16 mm übertragen.

Alle Objektträger wurden in entsprechende Halter überführt und für 24 Stunden in einen Schnelltrockner bei ungefähr 40° Celsius gelagert, um die Gewebeschnitte auf dem Objektträger beziehungsweise dem Deckglas zu fixieren.

2.2.4 Entparaffinieren der Gewebeschnitte

Als Vorbereitung der HE-Färbung und für die Raman-Spektroskopie mussten die Schnitte zuerst vom Paraffin befreit werden. Dazu wurden die mit den Objektträgern und Deckgläsern gefüllten Objektträgerhalter für eine Stunde in einen Schnelltrockner bei 60° Celsius gelagert, um das Paraffin zu schmelzen. Daraufhin wurde das Paraffin für jeweils zehn Minuten in zwei Xylol-Bädern (> 98 %) aus den Gewebeschnitten herausgelöst. Um die 3,5 µm-Schnitte später färben und die 20 µm-Schnitte mithilfe des Raman-Spektroskops vermessen zu können, wurden diese in einer absteigenden Alkoholreihe (zweimal 96%iges, 70%iges und 50%iges Ethanol) durch dreimaliges Auf- und Abtauchen und Schwenken in VE-Wasser rehydriert.

Im nächsten Schritt wurden die 20 µm-Schnitte zum Trocknen über Nacht im Schnelltrockner bei ungefähr 40° Celsius gelagert.

2.2.5 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Um sich in den Präparaten orientieren zu können, wurde die Hämatoxylin-Eosin-Färbung gewählt, eine der am meisten genutzten Färbemethoden in der Diagnostik der anatomischen Pathologie (Feldman und Wolfe, 2014). Diese

Färbung wurde auch vom Pathologischen Institut der Universität Würzburg zur Diagnostik der verschiedenen Dysplasiegrade und Karzinome verwendet.

Die 3,5 µm-Schnitte wurden hierfür sechs Minuten in „Hämatoxylin sauer nach Mayer“ gegeben, unter schwach fließendem VE-Wasser ausgewaschen und für fünf Minuten unter warmem Leitungswasser gespült, um den pH-Wert wieder zu erhöhen. Dabei färbt sich der Farbstoff Hämalaun, der sich an basophile Strukturen, wie die DNA in den Zellkernen, anlagert, blau (Cardiff *et al.*, 2014).

Als Gegenfärbung wurden die Schnitte wiederum sechs Minuten in 1%iges Eosin überführt und wieder unter schwach fließendem VE-Wasser ausgewaschen. Der rote Farbstoff lagert sich in eosinophile Strukturen wie dem Zytoplasma oder Kollagen ein (Chan, 2014).

Nun mussten die Schnitte wieder entwässert werden. Dies geschah durch zweimaliges Auf- und Abtauchen in 70%igem Ethanol und einer zweiminütigen Lagerung in 96%igem Ethanol. Daraufhin wurden die Schnitte für jeweils zwei mal fünf Minuten in Isopropanol ($\geq 99,95\%$) und Xylol ($> 98\%$) getaucht.

Nach Abschluss des letzten Xylol-Bades wurden die Objektträger mithilfe einer Pinzette aus dem Bad entnommen, der Schnitt mit einem Tropfen Entellan beträufelt und mit einem Deckglas eingedeckt. Um das restliche Xylol ausdampfen zu lassen, wurden die Objektträger über Nacht im Abzug stehen gelassen.

2.2.6 Durchlichtmikroskopie der HE-Präparate

Die HE-gefärbten Gewebeschnitte wurden mit einem Lichtmikroskop in Vergrößerungen vom Faktor zwei bis 40 begutachtet. Die Befunde des Pathologischen Instituts wurden nachvollzogen und entsprechende Bereiche fotografiert und dokumentiert, um sie später auf den entsprechenden 20 µm-Schnitten für die Raman-Spektroskopie zu identifizieren. Es wurde insbesondere versucht, die Position von Atypien, wie zum Beispiel Mitosen in den oberen Zellschichten oder Apoptosefiguren, des pathologisch veränderten Epithels aufzusuchen und für die späteren Messungen am Raman-Spektroskop vorzumerken.

2.2.7 Messungen am Raman-Spektroskop

Das Raman-Spektroskop (BioRam®, Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin) musste vor jeder Benutzung kalibriert werden, um die Ergebnisse verschiedener Messtage vergleichen zu können und sicherzustellen, dass das Gerät richtig und konstant arbeitet. Dies geschah mithilfe eines Silikat-Kristalls, der ein charakteristisches Intensitätsmaximum im Raman-Spektrum bei 520 cm^{-1} besitzt. Die Differenz zu diesem Maximum, verglichen mit dem Maximum der aktuellen Messreihe, kann beim Auswerten der Daten miteinbezogen werden. Für die Kalibrierung wurde ein 60x-Objektiv verwendet, gemessen wurde mit einer Belichtungszeit von einer Sekunde, in der 10 einzelne Messungen vorgenommen wurden. Der Fokus wurde so lange verändert bis das Maximum des Silikats seinen höchsten Ausschlag hatte und die Wellenzahl des entsprechenden Intensitätsmaximums notiert (siehe Abbildung 8).

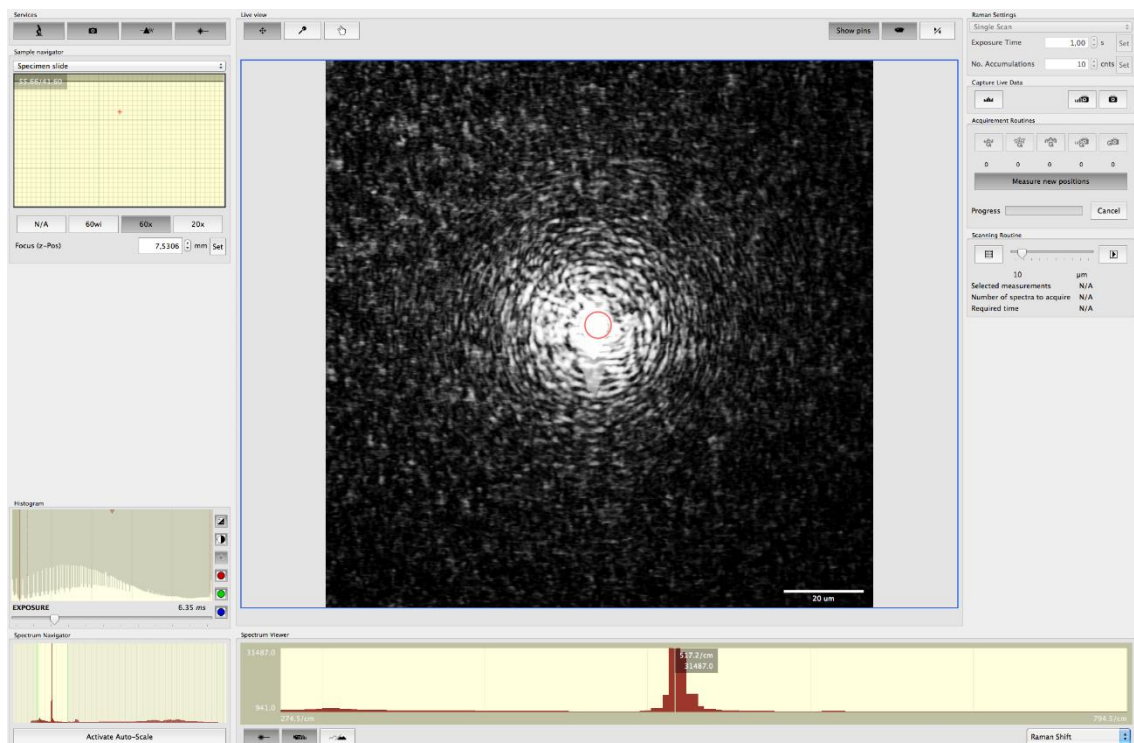


Abbildung 8: Kalibrieren des Raman-Spektroskops

Das Raman-Spektroskop wurde vor jedem Messtag mit den zuvor beschriebenen Einstellungen kalibriert. An diesem Tag lag das Maximum des Silikats bei einer Wellenlänge von $517,2\text{ cm}^{-1}$ und 31.487 counts .

Damit die Messungen an den entsprechenden dysplastisch oder kanzerogen veränderten Bereichen des Gewebes stattfanden, wurde das entsprechende HE-gefärbte Präparat an einem separaten Lichtmikroskop aufgelegt. Durch

paralleles Verschieben der Objektträger und der Orientierung an morphologischen Besonderheiten wurde die entsprechende Stelle lokalisiert und vermessen (siehe Abbildung 9).

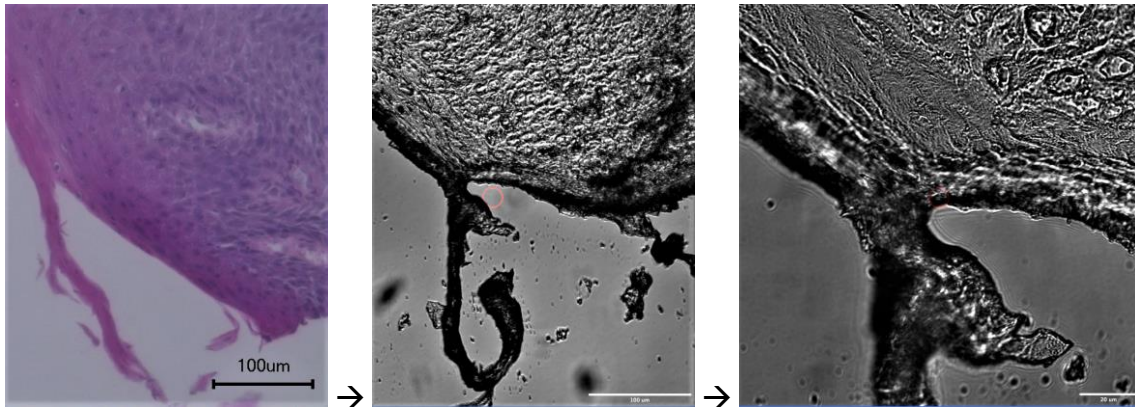


Abbildung 9: Orientierung in den Gewebeschnitten mit Lichtmikroskop und Raman-Spektroskop
Zu sehen ist das HE-gefärbte Präparat bei einer Vergrößerung von 20, die entsprechende Stelle wurde bei 20-facher Vergrößerung am Raman-Spektroskop ausgemacht und schlussendlich wurde bei gleicher Position auf das 60x-Objektiv gewechselt.

Nachdem der zu untersuchende Gewebeabschnitt in der zweidimensionalen Ebene identifiziert wurde, musste das Gewebe noch richtig fokussiert werden. Dabei wurde der Abstand vom Objektträger zum Objektiv beziehungsweise Laser in der Z-Achse justiert, um nicht fälschlicherweise das Spektrum des Deckglases zu ermitteln. Dieser Messaufbau wurde im Wesentlichen im Rahmen der Bachelorarbeit von Agnes Moerth entwickelt (Moerth, 2017).

Es wurden an allen Präparaten 20 Messungen, wenn möglich, im Epithel im Abstand von fünf bis 15 μm zur Basalmembran Richtung luminal durchgeführt. Bei einigen invasiven Karzinomen, bei denen keine Basalmembran ausmachbar gewesen ist, wurde inmitten des karzinösen Gewebes gemessen. Darüber hinaus wurden alle Präparate mit 25 Messungen im mittleren Drittel des Epithels vermessen (siehe Abbildung 10).

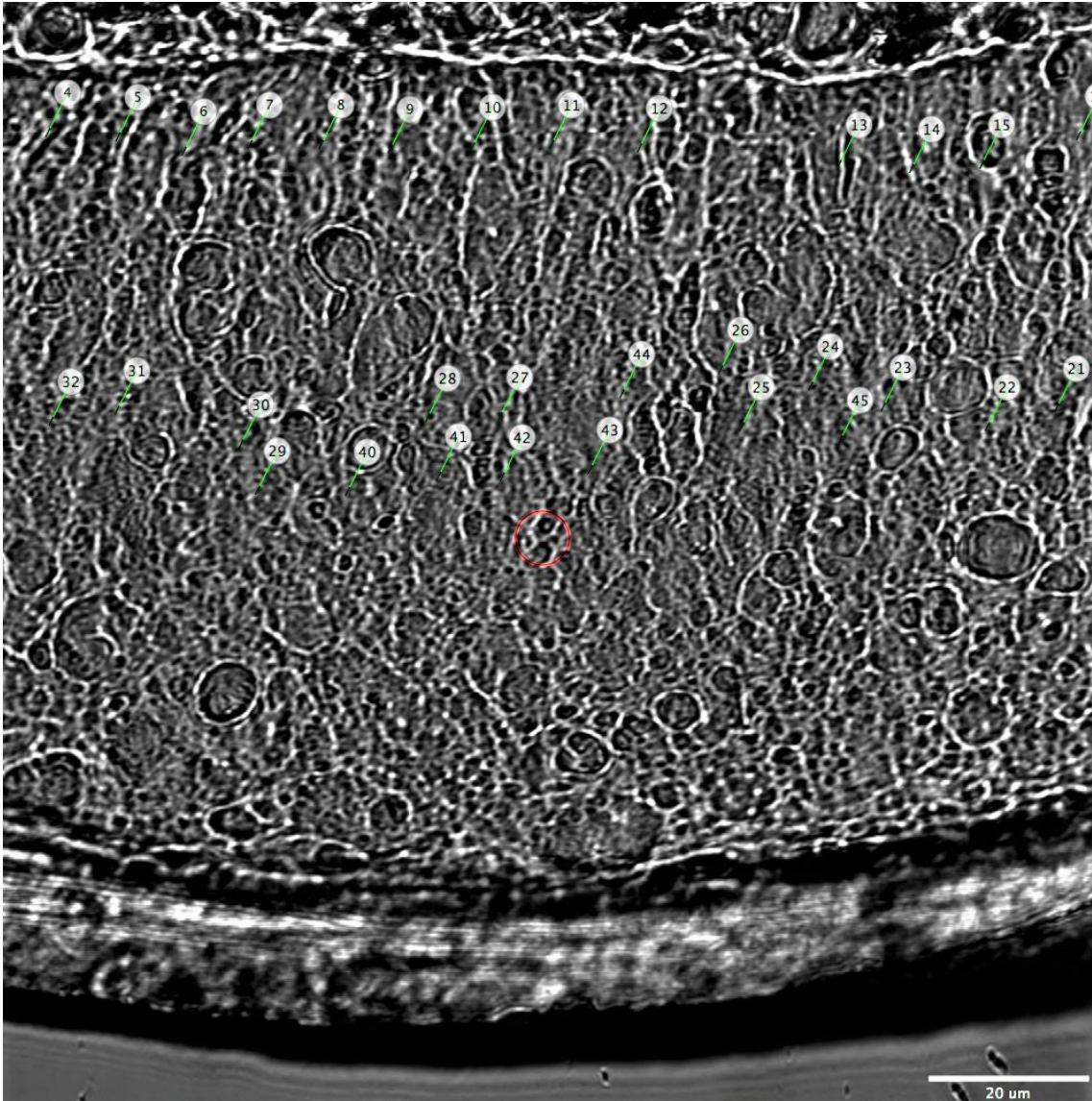


Abbildung 10: 20 Messpunkte nahe der Basalmembran und 25 Messpunkte im mittleren Drittel des Epithels

Am oberen Bildrand ist spärlich Stoma zu sehen, darunter die Basalmembran, am unteren Bildrand ist das Lumen zu sehen, dazwischen erstreckt sich das Plattenepithel.

Die Messungen wurden unter Verwendung eines 60x-Wasserimmersionsobjektivs ausgeführt. Es wurden je drei akkumulierte Messungen von zehn Sekunden durchgeführt. Verwendet wurde ein Laser mit einer Wellenlänge von 784,92 nm.

Abschließend wurden die Daten exportiert, um die Rohdaten zur weiteren Auswertung in die Unscrambler-Software zu überführen.

2.2.8 Auswertung

Zunächst wurden die spektralen Rohdaten in die Unscrambler-Software überführt. In einem ersten Schritt wurden die spektralen Rohdaten in einem *Line-Plot* dargestellt. Hier wurde überprüft, ob die Daten passend zu den Messungen im biologischen Material sind und nicht ein typisches Glas-Spektrum vorliegt.

In der weiteren Auswertung wurde sich auf den Wellenzahlenbereich von 1800 bis 500 cm^{-1} konzentriert. In diesem Bereich der Wellenzahlen befinden sich biologisch relevante Informationen (Movasaghi *et al.*, 2007).

Es wurden Mittelwertspektren für die einzelnen Proben jeweils für die basalen und mittigen Messungen erstellt. Des Weiteren wurden Mittelwertspektren in Abhängigkeit von der histologischen Diagnose erstellt. Die Mittelwertspektren in Abhängigkeit von der histologischen Diagnose wurden auf sichtbare Differenzen analysiert und den für die jeweilige Wellenzahl charakteristischen chemischen Verbindungen zugeordnet.

In der weiteren Analyse erfolgte die multivariate Datenanalyse anhand einer Hauptkomponentenanalyse. Mithilfe dieser Methodik wird ein komplexer Datensatz vereinfacht dargestellt und Unterschiede des Datensatzes durch die Hauptkomponenten beschrieben. Es sind die Hauptkomponenten eins bis sieben in das Modell eingeflossen. Die so berechneten *Scores-Plots* wurden in Abhängigkeit von verschiedenen Variablen (histologische Diagnose, klinische Prognose, usw.) und den verschiedenen Hauptkomponenten auf Clusterbildungen analysiert.

Die weitergehende statistische Evaluation wurde unter Zuhilfenahme einer linearen Diskriminanzanalyse unter Verwendung mit dem im mittleren Epithel ermittelten Spektren durchgeführt. Hierzu wurde ein Modell mit probenspezifischen Mittelwerten erstellt. Die lineare Diskriminanzanalyse erfolgte anhand der ersten bis siebten Hauptkomponente. Ein weiteres Modell der linearen Diskriminanzanalyse erfolgte mit den Originalspektren im Wellenzahlenbereich von 1650 bis 655 cm^{-1} . Die Validität der Modelle wurde anhand folgender Parameter überprüft: Spezifität, Sensitivität, Genauigkeit, „*Matthews correlation coefficient*“, Fehler und Beständigkeit. Entsprechende Formeln sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Die Auswertung wurde mit Unterstützung durch Dr. med. Till Meyer und Dr. Maria Steinke durchgeführt.

Tabelle 9: Formeln der errechneten Parameter der linearen Diskriminanzanalyse
 Die Tabelle stellt jeweils die errechneten Variablen dar, TP entspricht richtig positiven Ergebnissen, TN richtig negativen Ergebnissen, FP falsch positiven Ergebnissen und FN falsch negativen Ergebnissen.

| Parameter | Formel |
|------------------------------------|---|
| Spezifität | $Sp = \frac{TN}{TN + FP}$ |
| Sensitivität | $Se = \frac{TP}{TP + FN}$ |
| Genauigkeit | $G = \frac{TP + TN}{TP + TN + FP + FN}$ |
| „Matthews correlation coefficient“ | $MCC = \frac{TP \times TN - FP \times FN}{\sqrt{(TP + FN) \times (TP + FP) \times (TN + FP) \times (TN + FN)}}$ |
| Fehler | $F = \frac{FP}{FP + FN}$ |
| Beständigkeit | $B = \frac{2 \times (G - F)}{1 + G - F }$ |

3. Ergebnisse

3.1 Epidemiologische Auswertung

3.1.1 Epidemiologische Daten des Patientenkollektives

Veränderungen der Stimmlippe des Patientenstamms wurden zum ersten Mal in einem mittleren Alter von 63,76 Jahren diagnostiziert (SD=11,94). Plattenepithelkarzinome der Stimmlippe als Erstdiagnose ohne vorherige Probeentnahme wurden in einem mittleren Alter von 70,6 Jahren (SD=11,73) festgestellt. Es waren mehr Männer als Frauen betroffen, das Verhältnis betrug ungefähr 6:1. In der Studiengruppe der Plattenepithelkarzinome waren alle Patienten männlich.

3.1.2 Suchtmittelanamnese

Bei Erstvorstellung in der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten, plastische und ästhetische Operationen des Universitätsklinikums Würzburg werden Patienten auf die Risikofaktoren Alkohol- und Nikotinabusus befragt.

In Abbildung 11 ist der Tabakkonsum der verschiedenen Studiengruppen dargestellt. 56 % der Patienten waren zum Zeitpunkt der Erstdiagnose einer plattenepithelialen Veränderung der Stimmlippe aktive Raucher, 26 % der Patienten waren ehemalige Raucher. Somit kann bei 82 % der Patienten ein bestehender oder ehemaliger Tabakkonsum festgestellt werden. Bei drei Patienten lagen keine Angaben zum Rauchverhalten vor.

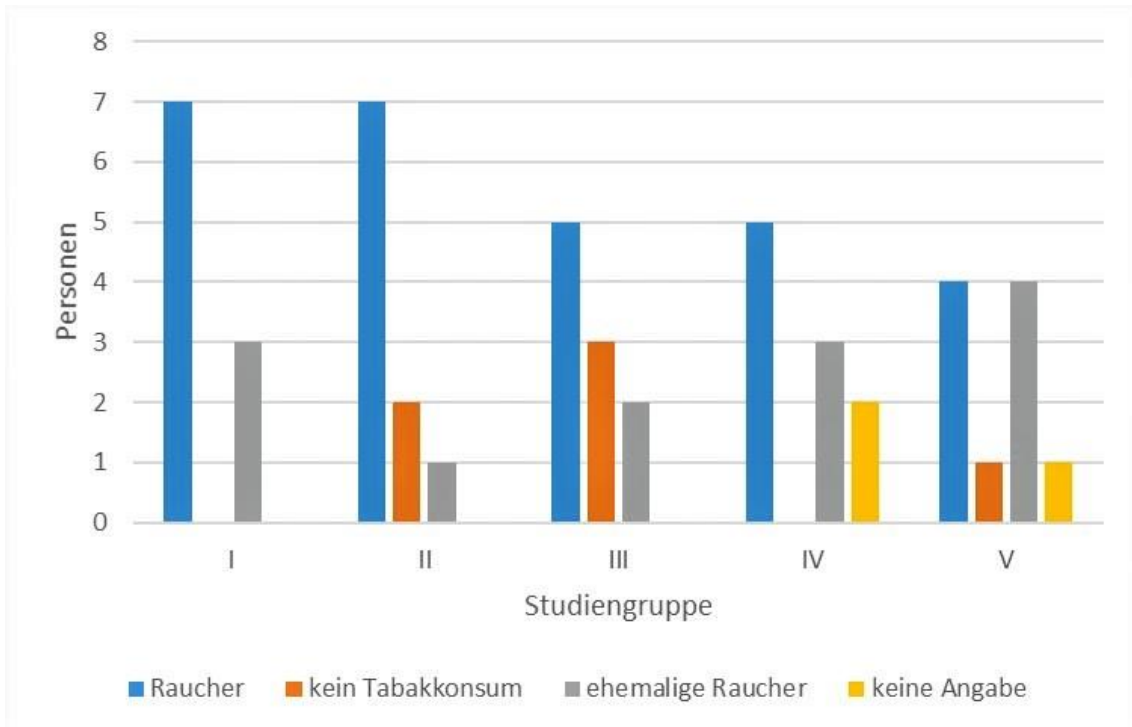


Abbildung 11: Tabakkonsum geordnet nach Studiengruppe

Anhand der Anamnesen bei Erstaufnahme wurde erfasst, ob die Patienten Tabak konsumieren. Es wurde kategorisiert in Raucher, ehemalige Raucher, keine Raucher und Patienten, zu denen keine Angaben vorlagen. Die verschiedenen Studiengruppen an der x-Achse sind der Anzahl der Patienten an der y-Achse gegenübergestellt.

In Abbildung 12 sind die durchschnittlichen *pack year*-Angaben der Raucher veranschaulicht. Über alle Gruppen hinweg waren durchschnittlich 40,13 *pack years* zu verzeichnen, wobei bei vier Patienten keine genauen Angaben hinsichtlich der *pack years* dokumentiert wurden.

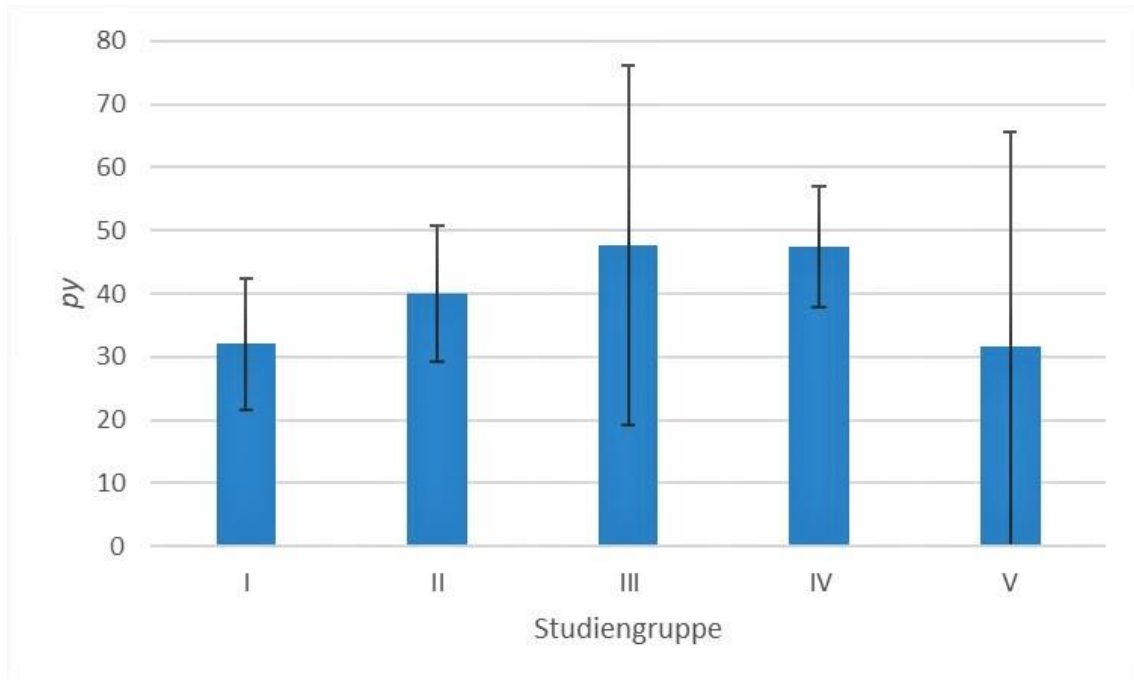


Abbildung 12: Nikotinabusus in *py* geordnet nach Studiengruppe mit Standardabweichung
 Dargestellt sind die durchschnittlichen *py*-Angaben der Raucher aus den jeweiligen Studiengruppen, sofern diese angegeben wurden. Eine standardisierte Anamneseerhebung der angesammelten *py* erfolgte nicht. Die verschiedenen Studiengruppen an der x-Achse sind den angesammelten *pack years* an der y-Achse gegenübergestellt. Die eingefügten Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.

In Abbildung 13 ist der Alkoholkonsum der Patienten veranschaulicht. Insgesamt war bei 20 % der Patienten ein regelmäßiger Alkoholkonsum (mindestens ein alkoholisches Getränk pro Tag) dokumentiert, bei einem Patienten ein ehemals regelmäßiger Alkoholkonsum. Bei dem Großteil der Patienten (48 %) bestand ein gelegentlicher Alkoholkonsum.

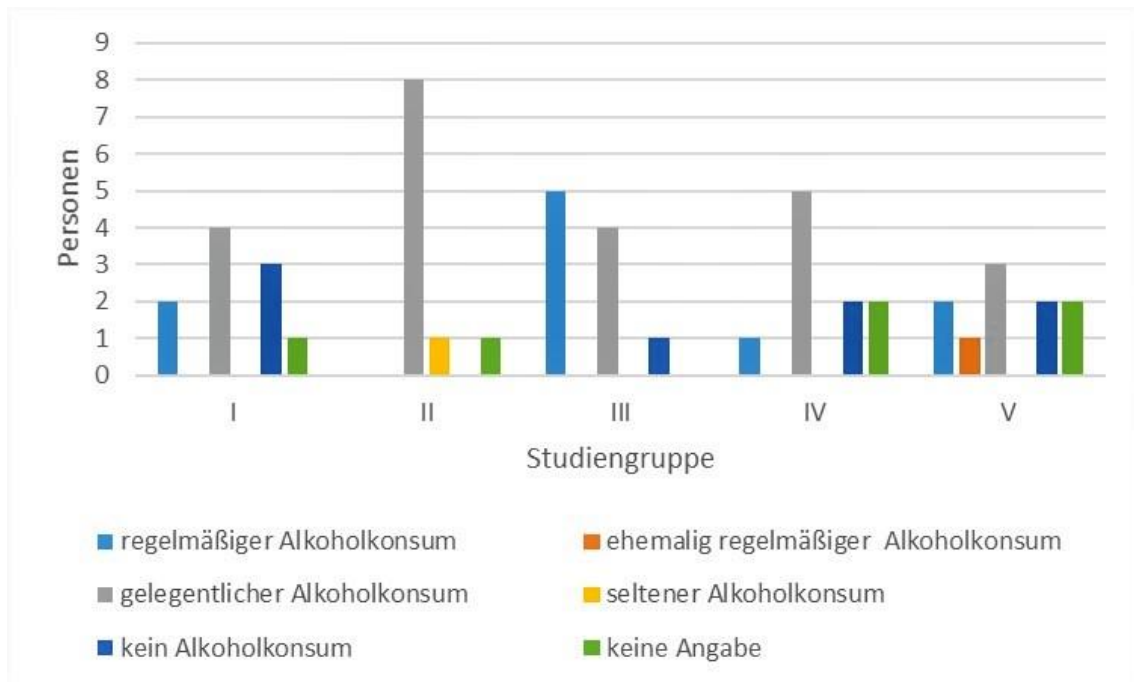


Abbildung 13: Alkoholkonsum geordnet nach Studiengruppe

Anhand der Anamnesen bei Erstaufnahme wurde erfasst, ob die Patienten Alkohol konsumieren. Es wurde unterteilt in regelmäßigen Alkoholkonsum (mindestens ein alkoholisches Getränk pro Tag), ehemalig regelmäßigen Alkoholkonsum, gelegentlichen Alkoholkonsum, seltenen Alkoholkonsum sowie kein Alkoholkonsum und Patienten, zu denen keine Angaben vorlagen oder diese nicht angegeben wurden. Eine standardisierte Anamneseerhebung des Alkoholkonsums erfolgte nicht. Die verschiedenen Studiengruppen an der x-Achse sind der Anzahl der Patienten an der y-Achse gegenübergestellt.

3.1.3 Klinische Daten zu Veränderungen der Stimmlippen

Bei 82 % der Patienten war Dysphonie der Grund der Vorstellung und somit Hauptsymptom. Weitere Symptome waren rezidivierender Husten und Dyspnoe. Bei drei Patienten lagen keine dokumentierten Symptome bei Erstvorstellung vor. Hier war die Leukoplakie im Rahmen einer HNO-ärztlichen Untersuchung aufgrund eines anderen Vorstellungsgrundes aufgefallen.

Die Veränderungen der Stimmlippe wurden im OP-Bericht anhand des ICD-O-3-Codes verschiedenen Regionen zugeordnet. Am häufigsten waren vorderes, mittleres oder das hintere Stimmlippendrittel betroffen, weniger häufig die vordere sowie hintere Kommissur. Neben der Glottis waren Areale wie die subglottische Region, Taschenfalten, der *Sinus morgagni* und die interarytenoide Region betroffen. Entsprechende Lokalisationen der suspekten Veränderungen mit prozentualer Verteilung sind in Tabelle 10 aufgelistet.

Tabelle 10: Lokalisationen der verdächtigen Veränderungen

Bei der Probeentnahme wurden die entsprechend verdächtigen Veränderungen der Stimmlippe lokalisiert. Es ist eine Mehrfachnennung möglich gewesen, wenn sich mehrere Veränderungen auf einer Stimmlippe befanden oder beide Stimmlippen betroffen waren.

| Lokalisation | Anzahl des Areals, in welcher eine verdächtige Schleimhautveränderung vorlag (prozentualer Anteil) |
|------------------------------|--|
| vorderes Stimmlippendrittel | 50 (35 %) |
| mittleres Stimmlippendrittel | 40 (28 %) |
| hinteres Stimmlippendrittel | 23 (16 %) |
| vordere Kommissur | 9 (6 %) |
| subglottische Region | 7 (5 %) |
| Taschenfalte | 5 (3 %) |
| hintere Kommissur | 4 (3 %) |
| <i>Sinus morgagni</i> | 3 (2 %) |
| Interarytenoidregion | 2 (1 %) |
| Trachea | 1 (1 %) |

In 54 % der Fälle waren die Veränderungen unilateral, betrafen also nur eine Stimmlippe. 15 Schleimhautveränderungen waren auf der rechten Stimmlippe, zwölf auf der linken Stimmlippe zu objektivieren. In 46 % der Patientenfälle waren die Veränderungen auf beiden Stimmlippen sichtbar oder überschritten die Mittellinie der vorderen oder hinteren Kommissur.

In Abbildung 14 ist der durchschnittliche Beobachtungszeitraum der Patienten dargestellt. Als Beobachtungszeitraum wurde der Zeitraum zwischen erster Vorstellung und letzter dokumentierter Vorstellung gewertet. Leichtgradige Dysplasien und Leukoplakien ohne Dysplasien wurden im Schnitt am kürzesten beobachtet, wohingegen mäßiggradige Dysplasien am längsten beobachtet wurden.

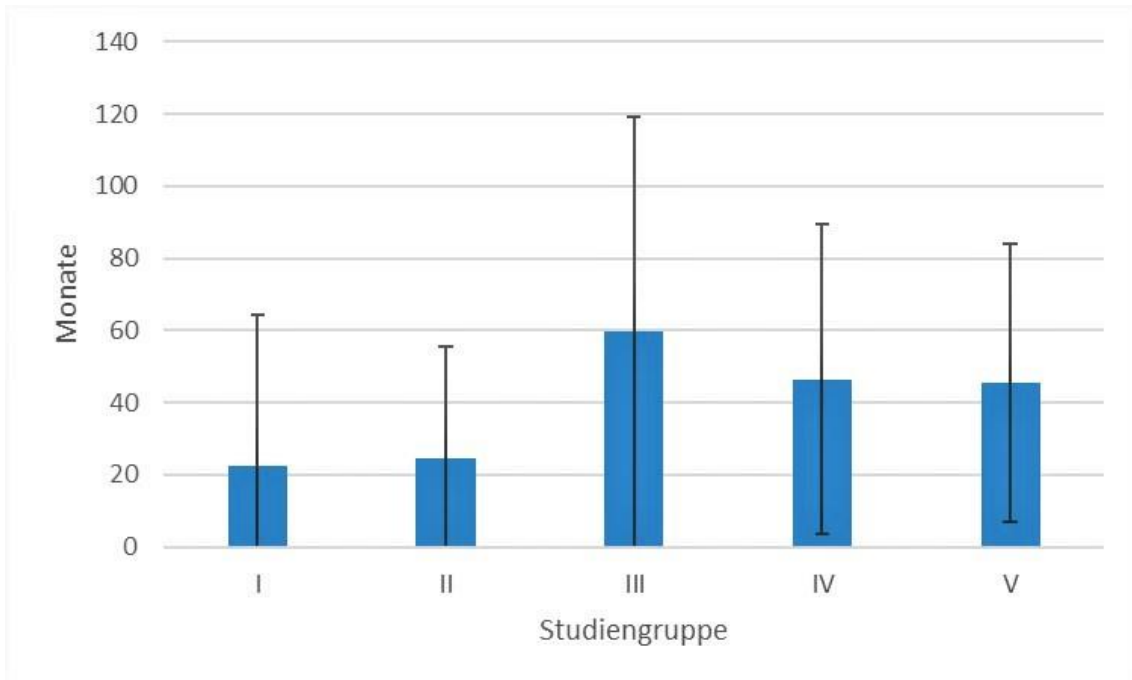


Abbildung 14: Durchschnittlicher Beobachtungszeitraum geordnet nach Studiengruppe mit Standardabweichung
 Dargestellt ist der durchschnittliche Beobachtungszeitraum der verschiedenen Studiengruppen von Erstvorstellung bis zur letzten Vorstellung des Patienten. Die verschiedenen Studiengruppen an der x-Achse sind dem Zeitraum in Monaten an der y-Achse gegenübergestellt, in welchem die Patienten an Nachuntersuchungen der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten, plastische und ästhetische Operationen des Universitätsklinikums Würzburg bezüglich der initial diagnostizierten Schleimhautveränderung der Stimmlippe teilnahmen. Die eingefügten Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.

Auffällig ist, dass schwergradige Dysplasien und Plattenepithelkarzinome im Mittel kürzer als mäßiggradige Dysplasien beobachtet wurden. Im Schnitt fanden jedoch innerhalb dieses Zeitraumes mehr operative Eingriffe statt, was in Abbildung 15 zu sehen ist.

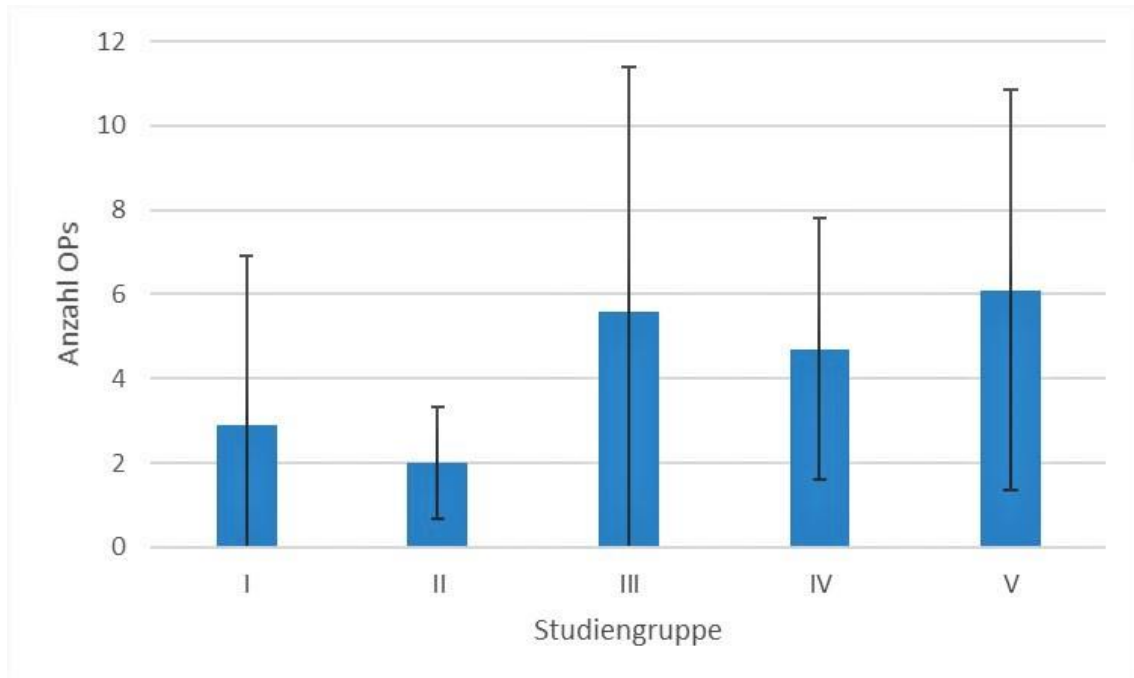


Abbildung 15: Anzahl der durchschnittlichen operativen Eingriffe nach Studiengruppe geordnet mit Standardabweichung
 Berücksichtigt wurden alle operativen Eingriffe der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten, plastische und ästhetische Operationen des Universitätsklinikums Würzburg, die in lokalem und thematischem Zusammenhang mit der Stimmlippe standen. Die verschiedenen Studiengruppen an der x-Achse sind der Anzahl der operativen Eingriffe an der y-Achse gegenübergestellt. Die eingefügten Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.

Aus Studiengruppe II entwickelte sich bei einem Patienten ein invasives Plattenepithelkarzinom (10 %), aus Studiengruppe III bei drei Patienten (30 %) und bei Studiengruppe IV bei fünf Patienten (50 %). In der Studiengruppe I entwickelten sich keine invasiven Karzinome im *follow-up*. In Abbildung 16 ist die durchschnittliche Zeit bis zum histologischen Nachweis eines invasiven plattenepithelialen Karzinoms der Stimmlippe dargestellt. Es lässt sich vor allem beobachten, dass der Zeitraum, in welchem sich die Karzinome, die aus einer schwergradigen Dysplasie oder einem *Carcinoma in situ* hervorgegangen sind, sehr viel kürzer ist, als der der anderen Gruppen.

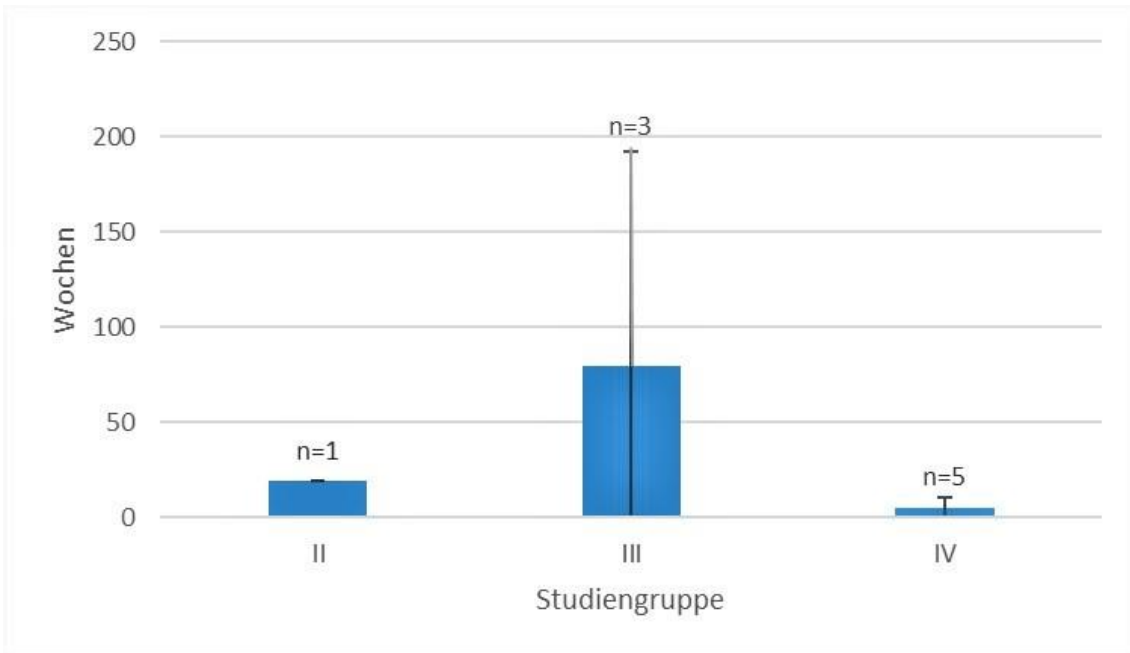


Abbildung 16: Durchschnittliche Zeit von erster Vorstellung bis zum histologischen Nachweis eines invasiven Plattenepithelkarzinoms mit Standardabweichung
 Die verschiedenen Studiengruppen an der x-Achse sind dem durchschnittlichen Zeitraum in Wochen an der y-Achse gegenübergestellt, in dem beim Patienten ein invasives Plattenepithelkarzinom aufgetreten ist. Aus Studiengruppe II entwickelte sich bei einem Patienten ein invasives Plattenepithelkarzinom des Larynx, aus Studiengruppe III bei drei Patienten und aus Studiengruppe IV bei fünf Patienten. Die eingefügten Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.

3.2 Histologische Auswertung der Präparate anhand von Beispielen

In diesem Kapitel sollen für jede Studiengruppe exemplarisch die Begutachtung und die histopathologischen Besonderheiten der Gewebeschnitte beschrieben werden.

3.2.1 Leukoplakie ohne Dysplasien

Die Studiengruppe I umfasst Patienten mit einer Leukoplakie, wie in Kapitel 1.1 beschrieben, die keine dysplastischen Veränderungen des Epithels aufweist. In Abbildung 17 ist ein histologischer Schnitt des Präparats I.7 dargestellt. Man erkennt die typische, gesunde Schichtung eines mehrschichtigen Plattenepithels mit kubischen Zellen im *Stratum basale* und immer flacher werdenden Keratinozyten nach luminal (von rechts unten nach links oben). Unterhalb der Basalmembran befindet sich aufgelockertes Stroma mit Bindegewebe, Blutgefäßen, sowie Nerven und Lymphgefäßen. Das mehrschichtige Plattenepithel weist hier eine Verhornungsstörung auf, die im histologischen Schnitt eosinophil dem Epithel aufgelagert scheint. Aufgrund des Vorhandenseins pyknotischer Kerne spricht man hier von einer Hyperparakeratose. Die Hornschicht hat sich bei der histologischen Aufbereitung und Schnittführung zum Teil vom Epithel abgelöst.

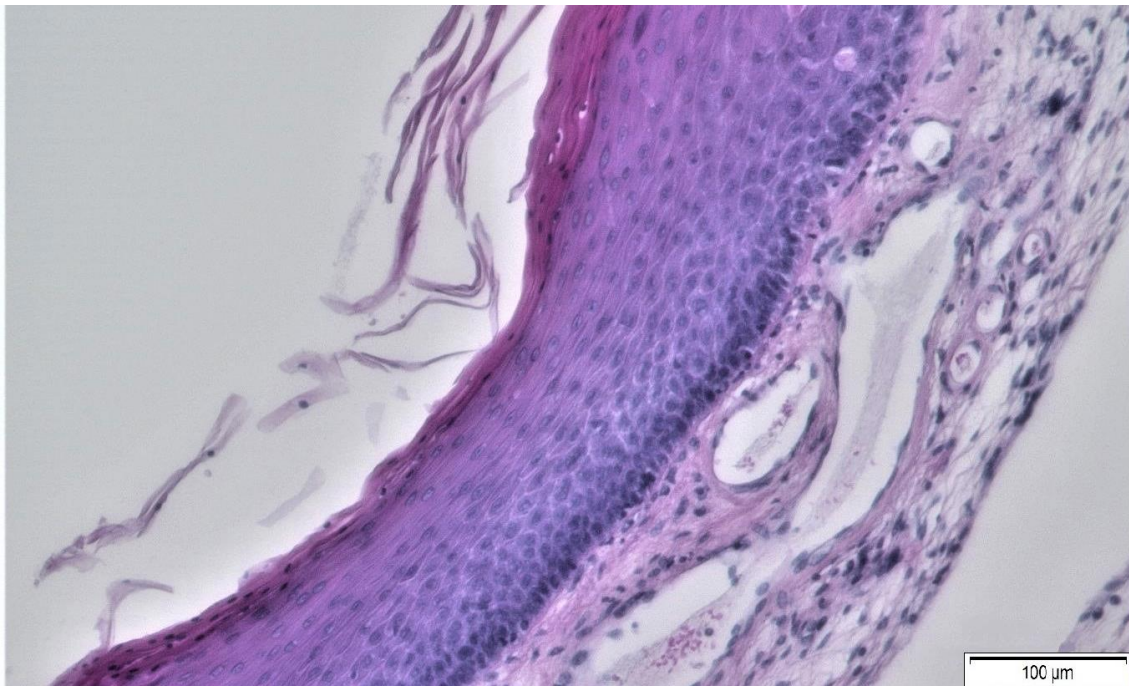


Abbildung 17: Leukoplakie ohne dysplastische Veränderung des Stimmlippenepithels (Präparat I.7) der Stimmlippe mit Hyperparakeratose, HE-gefärbt in 20-facher Vergrößerung

3.2.2 Leichtgradige Dysplasie

Der abgebildete histologische Schnitt (Abbildung 18) stellt ein Präparat der Studiengruppe II dar. Man erkennt von rechts unten nach links oben Stroma, die Basalmembran, ein verdicktes *Stratum basale* mit Veränderungen im unteren Epitheldrittel, jedoch sich langsam abflachende Keratinozyten weiter luminal. Die Verhornungsstörung der dem Plattenepithel aufgelagerten Zellen sind als Hyperparakeratose zu werten. Die dysplastischen Veränderungen im unteren Epitheldrittel umfassen stärker basophil angefärbte Zellkerne sowie unterschiedlich große und geformte Kerne der Keratinozyten. Eine Schichtung sowie die Polarität des Epithels sind nachvollziehbar.

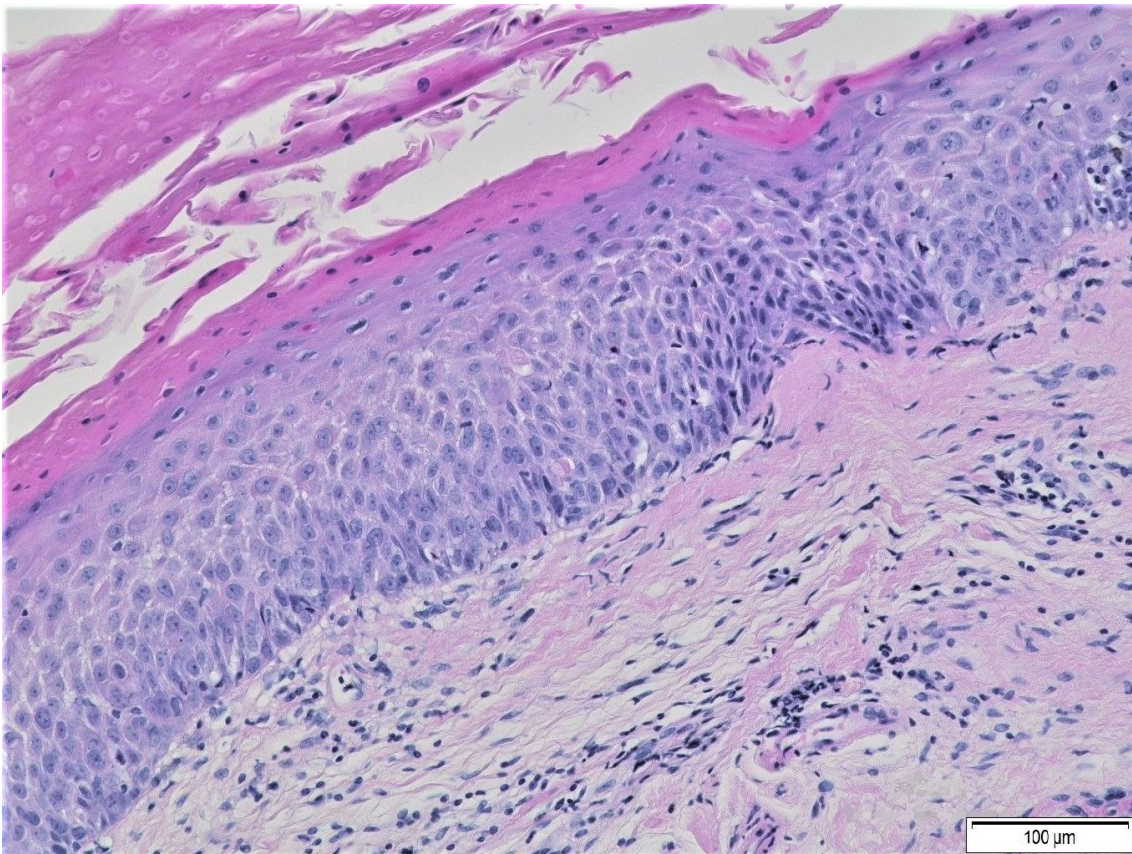


Abbildung 18: Leichtgradige Dysplasie des Stimmlippenepithels mit Hyperparakeratose (Präparat II.5) der Stimmlippe, HE-gefärbt in 20-facher Vergrößerung

3.2.3 Mäßiggradige Dysplasie

Das Präparat III.3 weist, wie in Abbildung 19 zu sehen ist, Veränderungen des Epithels bis ins mittlere Epitheldrittel auf und stellt somit eine mäßiggradige Dysplasie des Plattenepithels dar. Diese Präparate werden der Studiengruppe III zugeordnet.

Im abfotografierten Schnitt ist die Veränderung gegenüber gesundem mehrschichtigem Plattenepithel besonders in der Mitte des Bildes deutlich. Dort befinden sich veränderte Zellen, welche nicht dem abflachenden Prozess einer gesunden Epithelschichtung folgen. Stattdessen sind die Epithelzellen bis in das mittlere Epitheldrittel rundlicher und mit hyperchromem Zellkern charakterisiert.

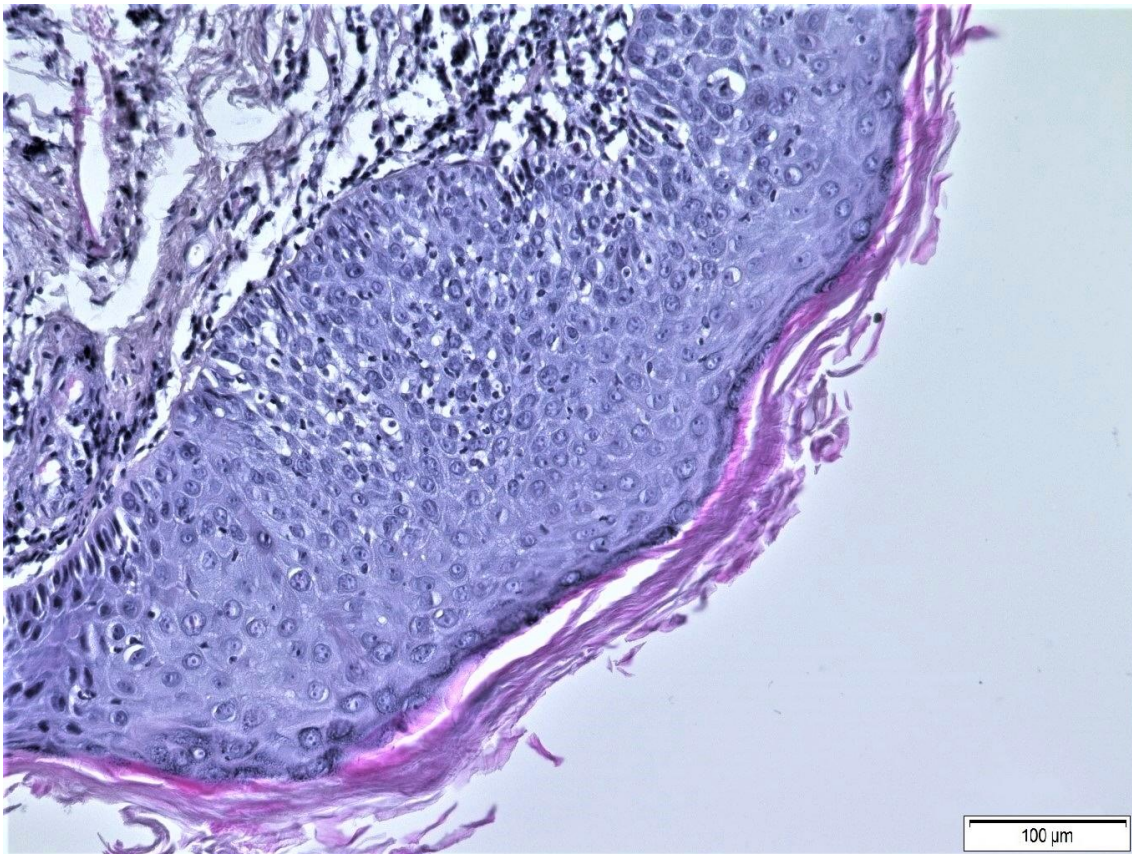


Abbildung 19: Mäßiggradige Dysplasie des Stimmlippenepithels mit Hyperkeratose (Präparat III.3) der Stimmlippe, HE-gefärbt in 20-facher Vergrößerung

Zudem lassen sich bis in das mittlere Epitheldrittel unterschiedlich große Zellen finden, ohne vorhandene Polarität. Im oberen Epitheldrittel, weiter nach luminal, sind die Zellen wieder abgeflachter. Zudem ist hier eine Hyperkeratose im Sinne einer aufgelagerten Hornschicht mit Korneozyten ohne Zellkern sichtbar.

3.2.4 Schwergradige Dysplasie

Zu Studiengruppe IV gehörige Präparate sind schwergradige Dysplasien des Plattenepithels sowie das *Carcinoma in situ*.

Die Epithelpolarität scheint in dieser Aufnahme (Abbildung 20) aufgehoben. Es ist keine Abflachung der Keratinozyten von basal nach luminal (links nach rechts) erkennbar. Zudem ist das Epithel verdickt. Zellen sowie Zellkerne weisen unterschiedliche Größen auf. Man erkennt keine Ordnung der Zellen, sie scheinen desorganisiert. Eine Infiltration des Stromas mit einem Durchbruch der Basalmembran (linker Bildrand) durch Keratinozyten ist nicht zu erkennen. Vereinzelt sieht man sich teilende Zellen, sowie Apoptosefiguren.

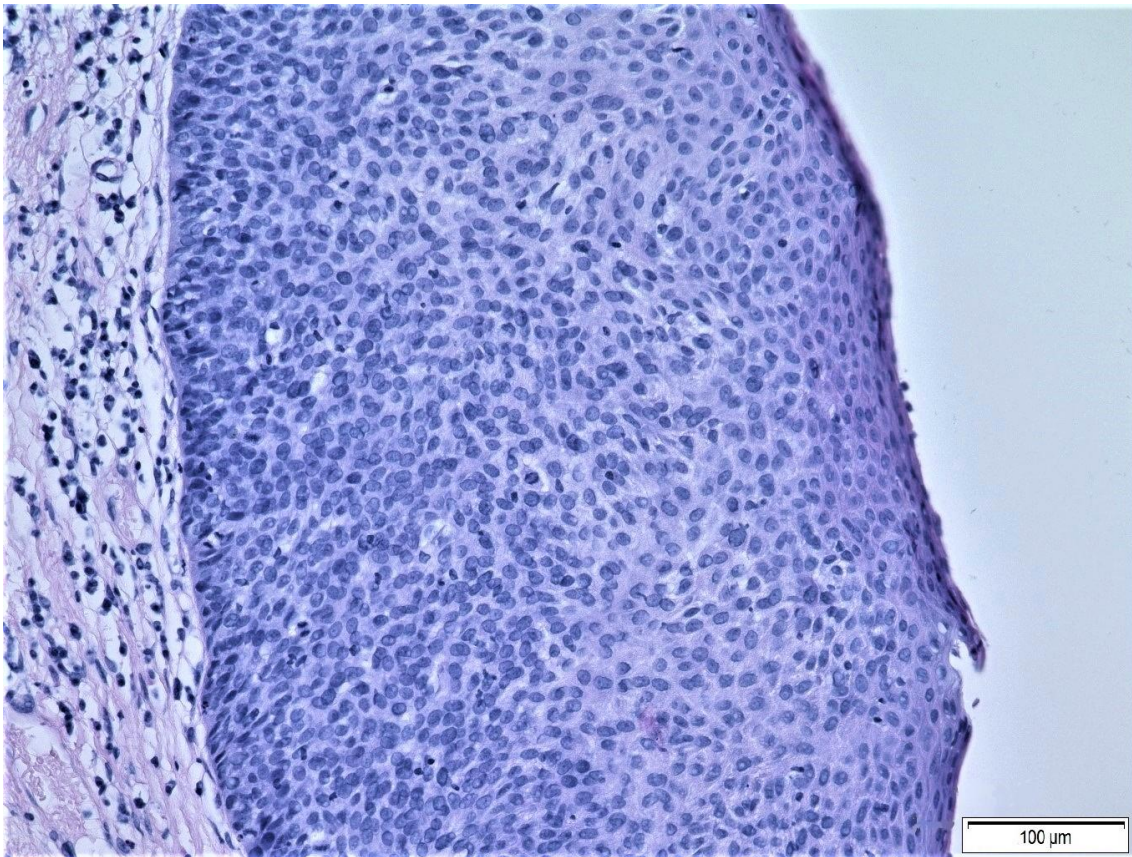


Abbildung 20: Schwergradige Dysplasie des Stimmlippenepithels ohne Keratosen (Präparat IV.5) der Stimmlippe, HE-gefärbt in 20-facher Vergrößerung

Die Veränderungen, die für das Präparat IV.5 zuvor beschrieben wurden, sind über die gesamte Epithelbreite hinweg zu erkennen. Sie erstrecken sich vom unteren bis ins obere Epitheldrittel. Eine Keratose des Stimmlippenepithels ist hier nicht zu beobachten.

3.2.5 Invasives Plattenepithelkarzinom

Präparat V.8 stellt beispielhaft Studiengruppe V dar. In zu dieser Studiengruppe gehörigen histologischen Schnitten befinden sich das Stroma infiltrierende und die Basalmembran überschreitende Epithelzellen.

In diesem Foto (Abbildung 21) ist der Ausschnitt eines invasiven Plattenepithelkarzinoms dargestellt.

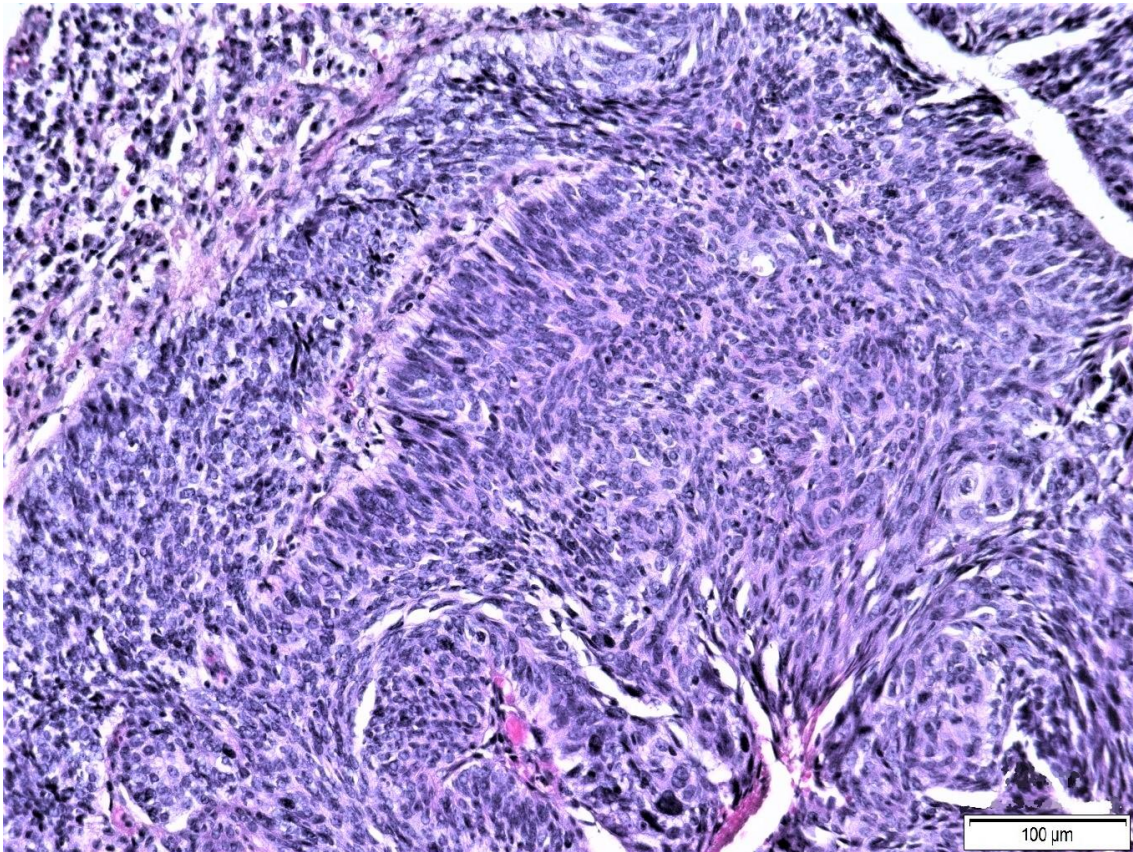


Abbildung 21: Invasives, wenig differenziertes, nicht verhorntes Plattenepithelkarzinom (Präparat V.8) der Stimmlippe, HE-gefärbt in 20-facher Vergrößerung

Man erkennt unkoordiniert angeordnete, dicht aneinander liegende Keratinozyten, die denen aus basalen Schichten eines gesunden mehrschichtigen Plattenepithels ähneln. Der Tumor ist somit wenig differenziert. Die Relation von Zytoplasma zu Kern liegt erheblich auf Seiten des Zellkerns. Zum Teil erkennt man Tumorrisenzellen sowie zahlreiche atypische Mitosen.

3.3 Analyse der Mittelwertspektren

Um einen Überblick über die spektralen Unterschiede der verschiedenen Studiengruppen zu erhalten, wurden diagnosespezifische Mittelwertspektren für die basal und mittig durchgeführten Messungen erstellt und visuell auf Unterschiede an den prominenten *peaks* beurteilt. Die verschiedenen Mittelwertspektren der Messpunkte in den basalen Epithelschichten und derer im mittleren Epitheldrittel sind in Kapitel 3.3.1 und 3.3.2 dargestellt und beschrieben. Anhand der Mittelwertspektren erkennt man bereits grobe Unterschiede der Raman-Intensitäten an unterschiedlichen Wellenzahlen der Raman-Streuung. Da sich das Mittelwertspektrum des Präparats III.5 derartig von den anderen Mittelwertspektren unterschied, wurde es aus allen folgenden Analysen und Modellen ausgeschlossen. Auch in der folgenden Hauptkomponentenanalyse und der linearen Diskriminanzanalyse wurde Präparat III.5 als Ausreißer identifiziert und aus der Auswertung ausgeschlossen.

3.3.1 Mittelwertspektren der Messpunkte in den basalen Epithelschichten

In Abbildung 22 sind die Mittelwertspektren der basalen Messpunkte dargestellt. Man erkennt Intensitätsunterschiede in einzelnen *peaks* der Studiengruppen. In der Mittelwertspektren-Analyse der Messungen, welche in den basalen Epithelschichten aufgenommen wurden, zeigen sich unterschiedliche Intensitäten der Maxima, wie zum Beispiel bei der Wellenzahl 1437 cm^{-1} oder 1003 cm^{-1} . Weitere gut sichtbare Unterschiede der verschiedenen Spektren betreffen die Wellenzahlen 1653 cm^{-1} , 1328 cm^{-1} , 1117 cm^{-1} , 1084 cm^{-1} und 950 cm^{-1} . In Tabelle 11 sind die den Wellenzahlen zugeordneten biologischen Informationen der Raman-Spektroskopie aufgelistet. So unterscheiden sich die verschiedenen Mittelwertspektren aufgrund der optischen Auswertung an der Intensität der Wellenzahlen, die auf Unterschiede der DNA-, Lipid- und Aminosäure-Anteile in den einzelnen Gruppen hindeuten.

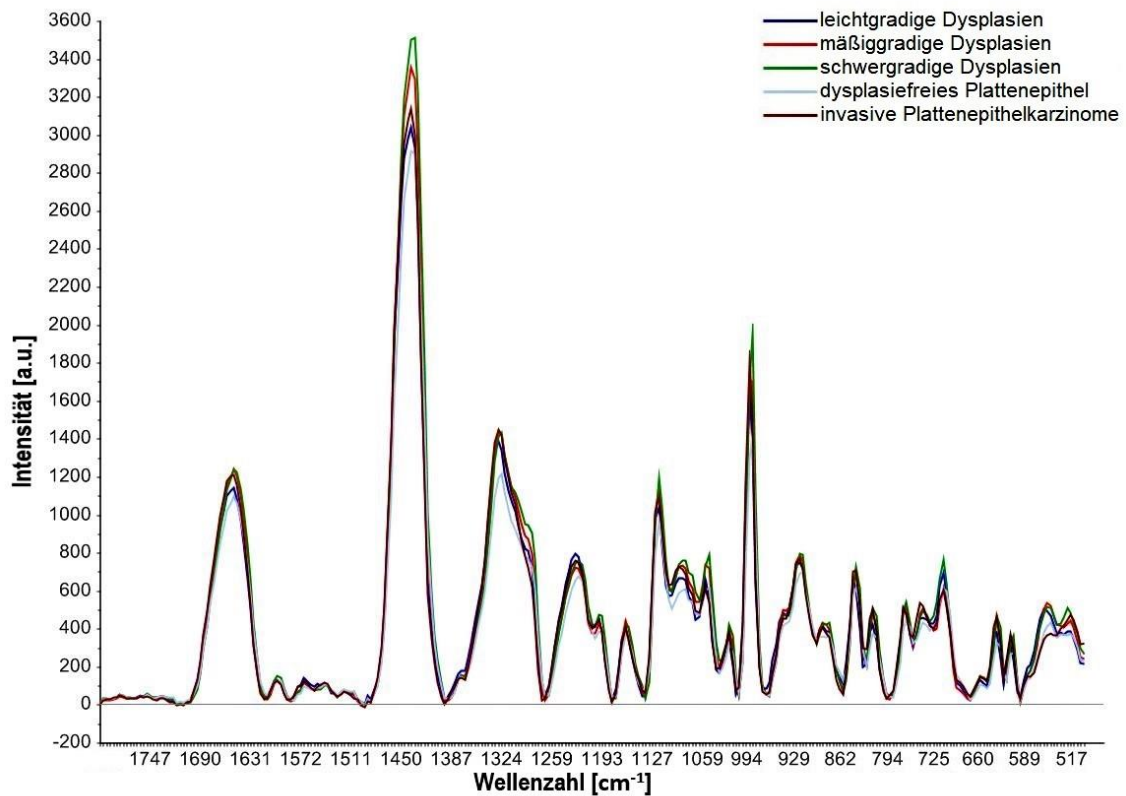


Abbildung 22: Mittelwertspektren der Messungen in den basalen Epithelschichten in Abhängigkeit der histologischen Diagnose
 Dargestellt sind die Mittelwertspektren der basalen Messpunkte. Man erkennt den Verlauf der Mittelwertspektren aufgetragen an der x-Achse die Wellenzahl der Raman-Streuung in cm^{-1} , an der y-Achse die entsprechende Intensität der Streuung.

Tabelle 11: Visuelle, qualitative Analyse der Mittelwertspektren der Messpunkte in den basalen Epithelschichten
 In der Tabelle sind die entsprechenden Wellenzahlen dargestellt, an denen sich die Mittelwertspektren der verschiedenen Studiengruppen unterscheiden. Die Zuordnung erfolgte anhand der Publikation „*Raman Spectroscopy of Biological Tissues*“ (Movasaghi *et al.*, 2007).

| Wellenzahl in cm^{-1} | Zugeordnete molekularbiologische Information |
|--------------------------------|--|
| 1653 | Lipide |
| 1437 | Lipide |
| 1328 | DNA |
| 1117 | Glukose |
| 1084 | DNA |
| 1003 | Phenylalanin |
| 950 | Aminosäuren |

Die unterschiedlichen *peaks* an der Wellenzahl 1328 cm^{-1} , die für Bestandteile der DNA charakteristisch ist, folgen in ihrer Intensität abstufend von invasiven Plattenepithelkarzinomen und schwergradigen Dysplasien über mäßig- und leichtgradige Dysplasien bis hin zu dysplasiefreiem Plattenepithel.

Generell gibt es bei den unterschiedlichen *peaks* jedoch keine lineare Abfolge im Sinne unterschiedlicher Intensitäten auf- oder absteigend von der dysplasiefreien Gruppe über die dysplastischen Veränderungen bis hin zur Gruppe der Karzinome.

3.3.2 Mittelwertspektren der Messpunkte im mittleren Epitheldrittel

In Abbildung 23 sind die Mittelwertspektren der Messpunkte im mittleren Epitheldrittel aufgezeichnet. Es finden sich unter anderem unterschiedliche Intensitäten an den Wellenzahlen 1652 cm^{-1} , 1437 cm^{-1} , 1328 cm^{-1} , 1084 cm^{-1} , 1053 cm^{-1} , 1003 cm^{-1} und 729 cm^{-1} .

In Tabelle 12 sind die Wellenzahlen, in denen sich die Mittelwertspektren unterscheiden, den biologischen Informationen der Raman-Spektroskopie gegenübergestellt. Auch hier betreffen die optischen Unterschiede vor allem molekularbiologische Informationen der DNA, von Lipiden, Aminosäuren und Proteinen.

Auch bei den Messpunkten im mittleren Epitheldrittel ist keine lineare Abfolge nach Schwere der Dysplasie erkennbar

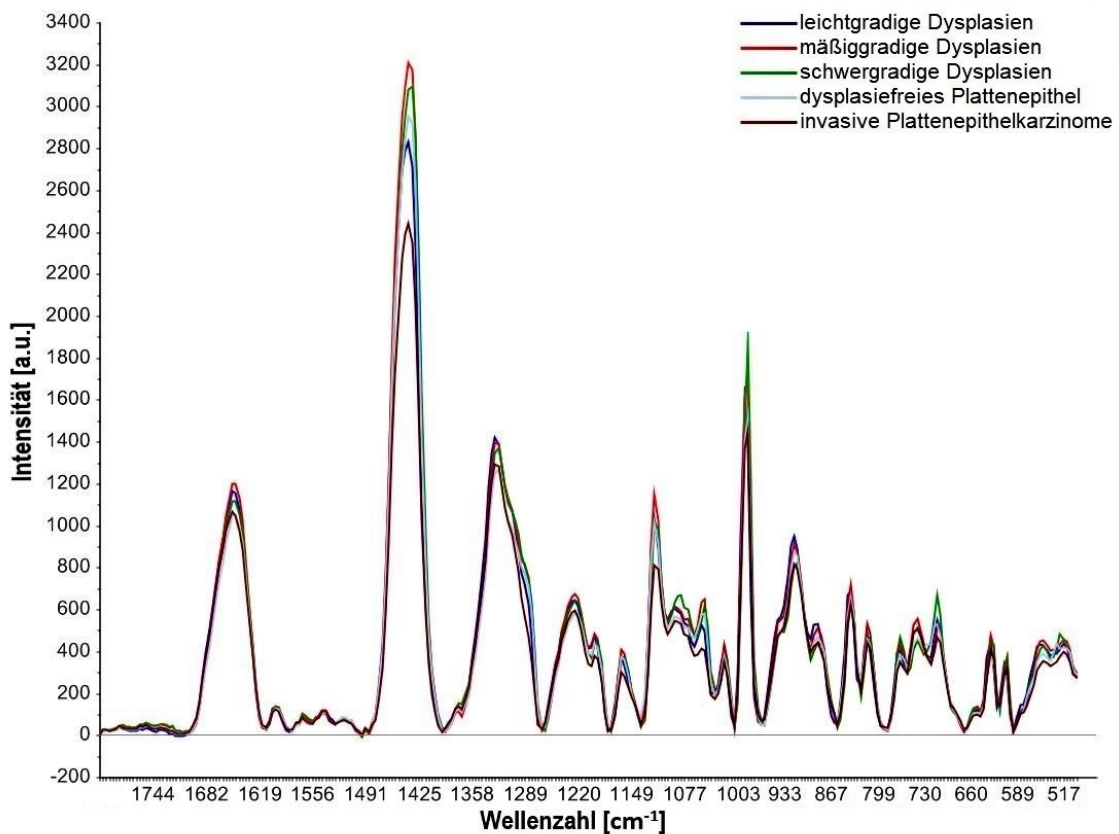


Abbildung 23: Mittelwertspektren der Messungen im mittleren Epitheldrittel in Abhängigkeit der histologischen Diagnose
 Dargestellt sind die Mittelwertspektren der Messpunkte im mittleren Epitheldrittel. Man erkennt den Verlauf der Mittelwertspektren aufgetragen an der x-Achse die Wellenzahl der Raman-Streuung in cm^{-1} , an der y-Achse die entsprechende Intensität der Raman-Streuung.

Tabelle 12: Visuelle, qualitative Analyse der Mittelwertspektren der Messpunkte im mittleren Epitheldrittel
 In der Tabelle sind die entsprechenden Wellenzahlen dargestellt, an denen sich die Mittelwertspektren der verschiedenen Studiengruppen unterscheiden. Die Zuordnung erfolgte anhand der Publikation „*Raman Spectroscopy of Biological Tissues*“ (Movasaghi *et al.*, 2007).

| Wellenzahl in cm^{-1} | Zugeordnete molekularbiologische Information |
|--------------------------------|--|
| 1652 | Lipide |
| 1437 | Lipide |
| 1328 | DNA |
| 1084 | DNA |
| 1053 | Protein |
| 1003 | Phenylalanin |
| 729 | DNA |

3.4 Hauptkomponentenanalyse

Die Hauptkomponentenanalyse erfolgte getrennt für die Messungen in den basalen Epithelschichten und denen im mittleren Epitheldrittel.

Es wurden Hauptkomponentenanalysen in Abhängigkeit verschiedener Kriterien durchgeführt (beispielsweise in Abhängigkeit der histologischen Diagnose oder der Progression zu einem invasiven Plattenepithelkarzinom).

Das Präparat III.5 wurde, wie bereits erwähnt, als Ausreißer identifiziert und aus den weiteren Analysen ausgeschlossen.

Clusterbildung in den *Scores-Plots* zeigt eine Differenzierbarkeit der Daten anhand der für die Clusterbildung verantwortlichen Hauptkomponenten an.

Anhand der *Loading-Plots* werden die Wellenzahlen bestimmt, die einen statistisch starken Einfluss auf die jeweilige Hauptkomponente haben.

3.4.1 Hauptkomponentenanalyse der Messungen in den basalen Epithelschichten

3.4.1.1 Hauptkomponentenanalyse in Abhängigkeit des Präparats

In Abbildung 24 ist der *Scores-Plot* der Messpunkte in den basalen Epithelschichten in Abhängigkeit der einzelnen Präparate zu sehen.

Die Messpunkte der einzelnen Präparate bilden Cluster.

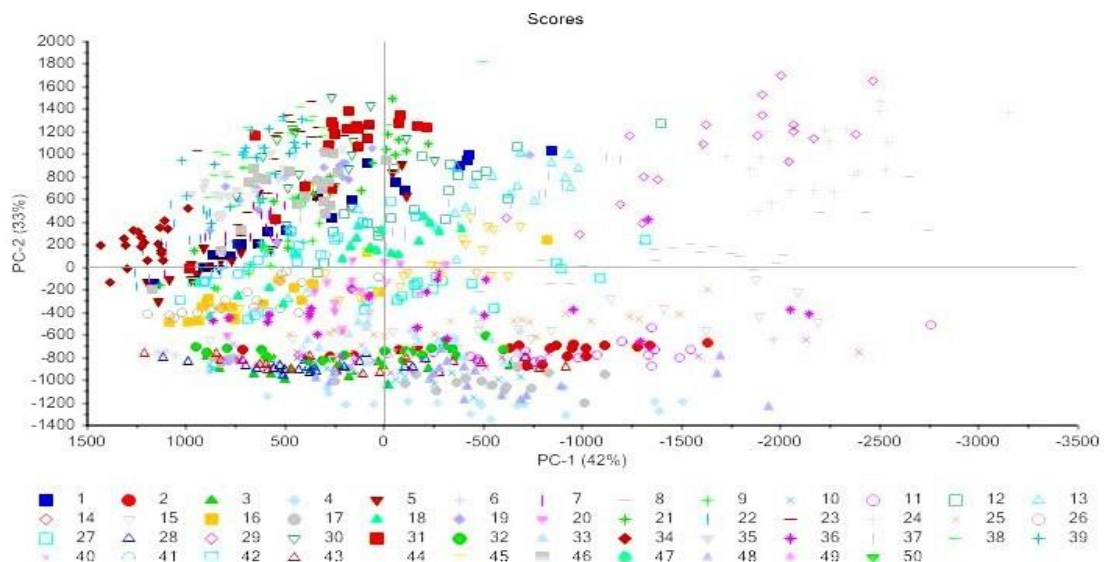


Abbildung 24: *Scores-Plot* der Messpunkte in den basalen Epithelschichten nach Präparat mit erster und zweiter Hauptkomponente

Zu sehen sind alle Präparate, die Präparate 1 bis 10 gehören zur Gruppe der leichtgradigen Dysplasien, die Präparate 11 bis 20 zu der Gruppe der mäßiggradigen Dysplasien, 21 bis 30 zu der Gruppe der schwergradigen Dysplasien, 31 bis 40 zu der Gruppe des dysplasiefreien Plattenepithels und die Präparate 41 bis 50 gehören zu der Gruppe der invasiven Plattenepithelkarzinome.

3.4.1.2 Hauptkomponentenanalyse in Abhängigkeit der histologischen Diagnose

Bei der Darstellung des Ergebnisses der Hauptkomponentenanalyse in Abhängigkeit der histologischen Diagnose (Abbildung 25) bilden die dysplasiefreien Präparate (Studiengruppe I) Cluster vornehmlich rechts oben, leichtgradige und mäßiggradige Dysplasien (Studiengruppe II und III) finden auch größtenteils eine Anhäufung. Die schwergradigen Dysplasien (Studiengruppe IV) sowie die invasiven Plattenepithelkarzinome (Studiengruppe V) zeigen kein eindeutiges Cluster. Zudem kommt ein Cluster, welches alle Studiengruppen enthält, nahe der Basis zur Darstellung.

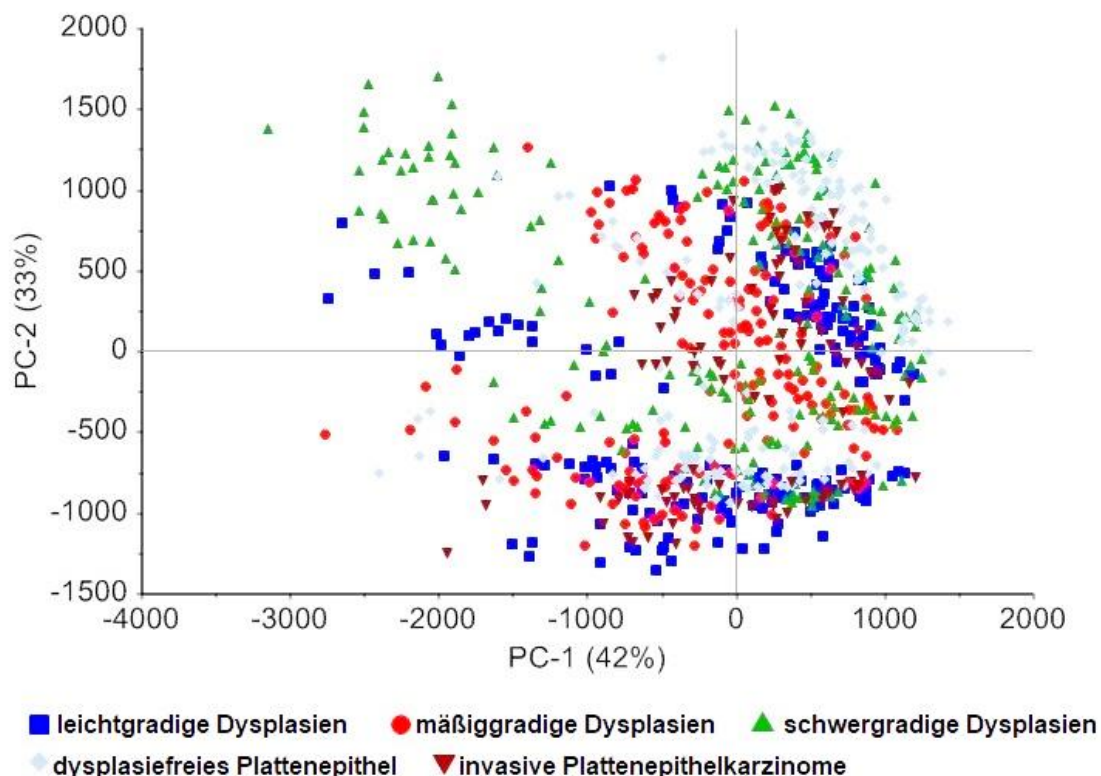
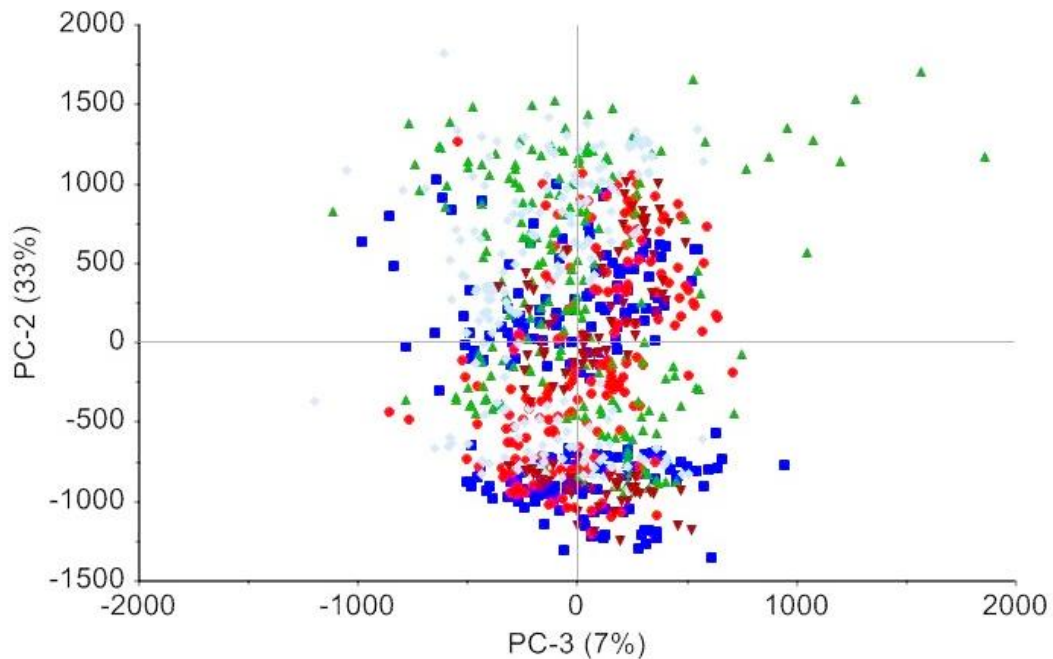


Abbildung 25: Scores-Plot der Messpunkte in den basalen Epithelschichten in Abhängigkeit der histologischen Diagnose mit erster und zweiter Hauptkomponente

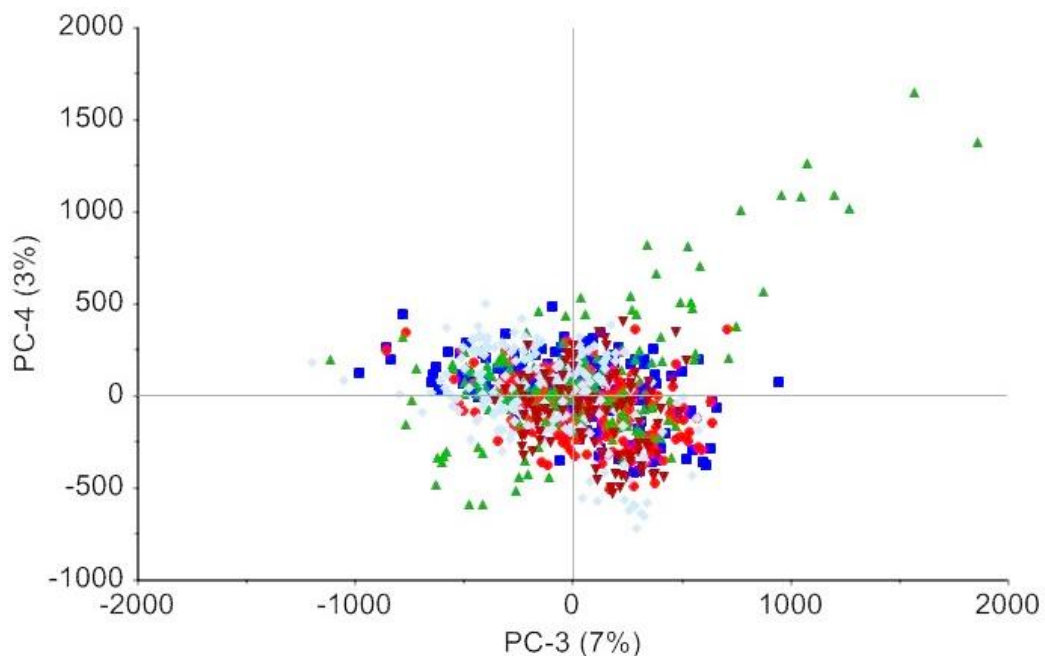
Bei der Darstellung der Ergebnisse der Hauptkomponentenanalyse im Scores-Plot ist in den darauffolgenden Hauptkomponenten keine gute Clusterbildung in Abhängigkeit der histologischen Diagnose zu erkennen. Beispielsweise ist dies anhand der Scores-Plots für die Hauptkomponenten zwei bis vier in Abbildung 26 und Abbildung 27 dargestellt. Sowohl bei Gegenüberstellung der zweiten und dritten Hauptkomponente, der dritten und vierten Komponenten als auch der

höheren Hauptkomponenten sind keine Cluster in Abhängigkeit der histologischen Diagnose erkennbar.



■ leichtgradige Dysplasien ● mäßiggradige Dysplasien ▲ schwergradige Dysplasien
 ◆ dysplasiefreies Plattenepithel ▼ invasive Plattenepithelkarzinome

Abbildung 26: Scores-Plot der Messpunkte in den basalen Epithelschichten in Abhängigkeit der histologischen Diagnose mit zweiter und dritter Hauptkomponente



■ leichtgradige Dysplasien ● mäßiggradige Dysplasien ▲ schwergradige Dysplasien
 ◆ dysplasiefreies Plattenepithel ▼ invasive Plattenepithelkarzinome

Abbildung 27: Scores-Plot der Messpunkte in den basalen Epithelschichten in Abhängigkeit der histologischen Diagnose mit dritter und vierter Hauptkomponente

Die *Loading-Plots* der Hauptkomponenten eins bis sieben weisen *peaks* auf, insbesondere die erste Hauptkomponente bei den Wellenzahlen 1460 cm^{-1} , 1423 cm^{-1} , 1130 cm^{-1} , 1043 cm^{-1} und 1003 cm^{-1} , in der zweiten Hauptkomponente bei den Wellenzahlen 1450 cm^{-1} , 1424 cm^{-1} , 1400 cm^{-1} , 1008 cm^{-1} und 980 cm^{-1} (Abbildung 28 und Abbildung 29).

Mit zunehmender Hauptkomponente sind keine klar definierten *peaks* mehr abgrenzbar, was insbesondere für die Hauptkomponenten fünf und sieben zutrifft (siehe Abbildung 30 bis Abbildung 34). Zudem ergab sich für die Hauptkomponenten drei bis sieben im *Scores-Plot* in Abhängigkeit der histologischen Diagnose keine Clusterbildung der verschiedenen Gruppen. Daher sind die *Loading-Plots* der Hauptkomponenten drei bis sieben für diese Auswertung weniger relevant.

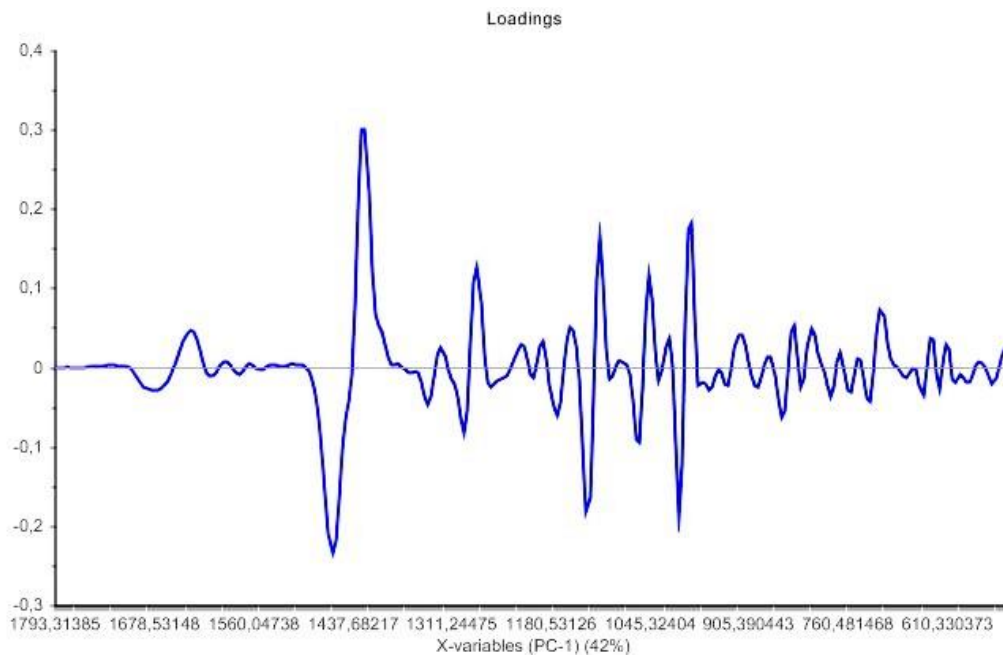


Abbildung 28: *Loading-Plot* der 1. PC nach PCA der Messpunkte in den basalen Epithelschichten kategorisiert nach histologischer Einteilung
Man kann aufgetragen an der x-Ache die Wellenzahl in cm^{-1} und an der y-Achse den statistischen Einfluss, den die Wellenzahl auf die hauptsächlichsten Unterschiede in der ersten Hauptkomponente haben, ablesen. Die größten Ausschläge befinden sich bei den Wellenzahlen 1460 cm^{-1} , 1423 cm^{-1} , 1130 cm^{-1} , 1043 cm^{-1} , 1003 cm^{-1} .

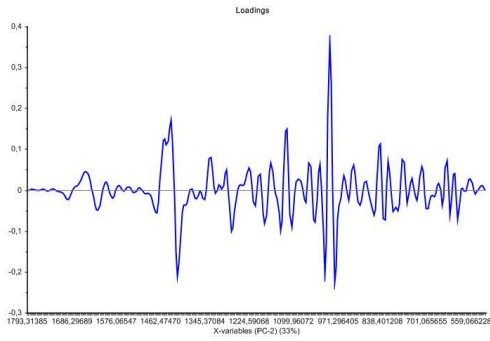


Abbildung 29: *Loading-Plot* der 2. PC nach PCA der Messpunkte in den basalen Epithelschichten

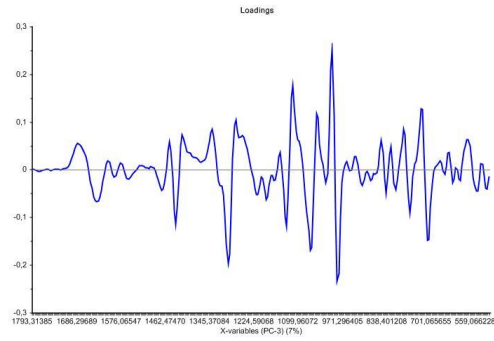


Abbildung 30: *Loading-Plot* der 3. PC nach PCA der Messpunkte in den basalen Epithelschichten

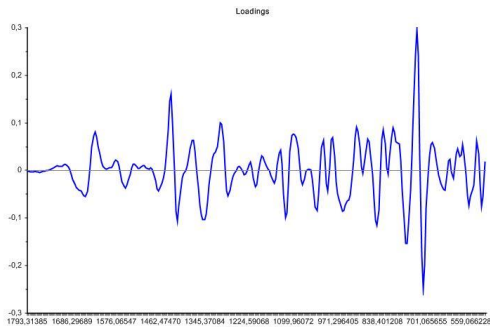


Abbildung 31: *Loading-Plot* der 4. PC nach PCA der Messpunkte in den basalen Epithelschichten

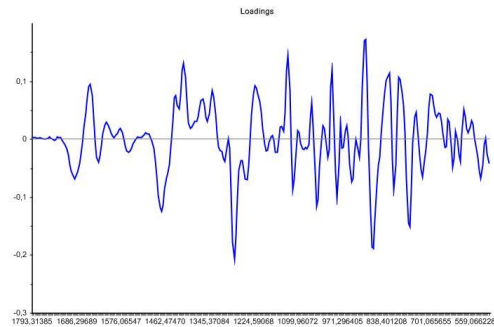


Abbildung 32: *Loading-Plot* der 5. PC nach PCA der Messpunkte in den basalen Epithelschichten

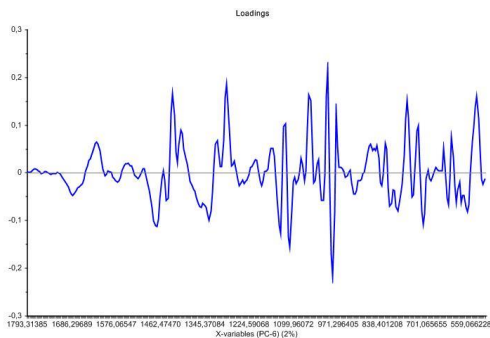


Abbildung 33: *Loading-Plot* der 6. PC nach PCA der Messpunkte in den basalen Epithelschichten

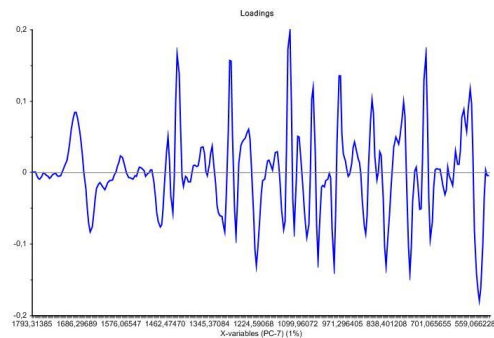


Abbildung 34: *Loading-Plot* der 7. PC nach PCA der Messpunkte in den basalen Epithelschichten

Die Zuordnung der als relevant identifizierten *peaks* zu den biologischen Informationen ist in Tabelle 13 zusammengefasst.

Hauptkomponente eins erklärt statistisch gesehen 42 % der Unterschiede, Hauptkomponente zwei 33 %.

Tabelle 13: *Peaks* der *Loading-plots* der PCA der Messpunkte in den basalen Epithelschichten
 In der Tabelle sind die entsprechenden Wellenzahlen der relevanten *peaks* der *Loading-Plots* der ersten und zweiten Hauptkomponente dargestellt. Die Zuordnung erfolgte anhand der Publikation „*Raman Spectroscopy of Biological Tissues*“ (Movasaghi *et al.*, 2007).

| Wellenzahl in cm ⁻¹ (PC) | Zugeordnete molekularbiologische Information |
|-------------------------------------|--|
| 1460 (PC 1) | Lipide, Kollagen, DNA |
| 1450 (PC 2) | Lipide, Proteine, Kohlenhydrate |
| 1424 (PC 2) | DNA |
| 1423 (PC 1) | DNA |
| 1400 (PC 2) | Aminosäuren |
| 1130 (PC 1) | Phospholipide |
| 1043 (PC 1) | Kohlenhydrate, Aminosäuren |
| 1008 (PC 2) | Phenylalanin |
| 1003 (PC 1) | Phenylalanin |
| 980 (PC 2) | Proteine, Lipide |

Die *peaks* der *Loading-Plots* sind charakteristisch für Wellenzahlen, welche spezifisch für Bestandteile der DNA sind. Darüber hinaus erfolgte eine Auftrennung der verschiedenen Gruppen anhand von Wellenzahlen, welche Proteinen, Lipiden und Kohlenhydraten zugeordnet werden.

3.4.1.3 Hauptkomponentenanalyse in Abhängigkeit sonstiger Kriterien

Es wurde keine Clusterbildung in der Hauptkomponentenanalyse in Abhängigkeit der Variablen Nikotinabusus, Alkoholverhalten, Vorhandenseins eines gastrooesophagealen Refluxes, Geschlecht oder der Tumorgröße anhand der TNM-Klassifikation in der ersten und zweiten Hauptkomponente beobachtet. Auch ergab sich keine Clusterbildung einer Hauptkomponentenanalyse nach dem Tag der Aufbereitung der histologischen Schnitte (siehe Abbildung 35), dem Tag der Messung am Raman-Spektroskop (siehe Abbildung 36) und dem Alter der Präparate, sodass diese Faktoren als Messungenauigkeiten ausgeschlossen werden konnten.

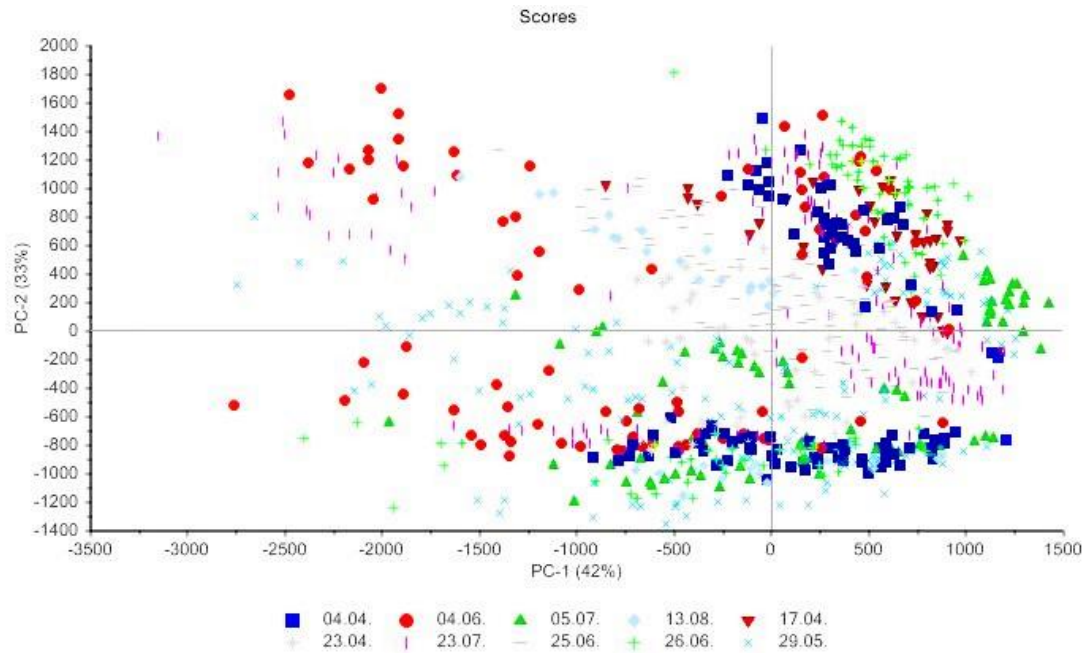


Abbildung 35: *Scores-Plot* der basalen Messpunkte in Abhängigkeit des Datums der Aufbereitung der Paraffin-Schnitte mit erster und zweiter Hauptkomponente. Es ist keine Clusterbildung der verschiedenen Tage, an denen die Präparate aufbereitet wurden, erkennbar.

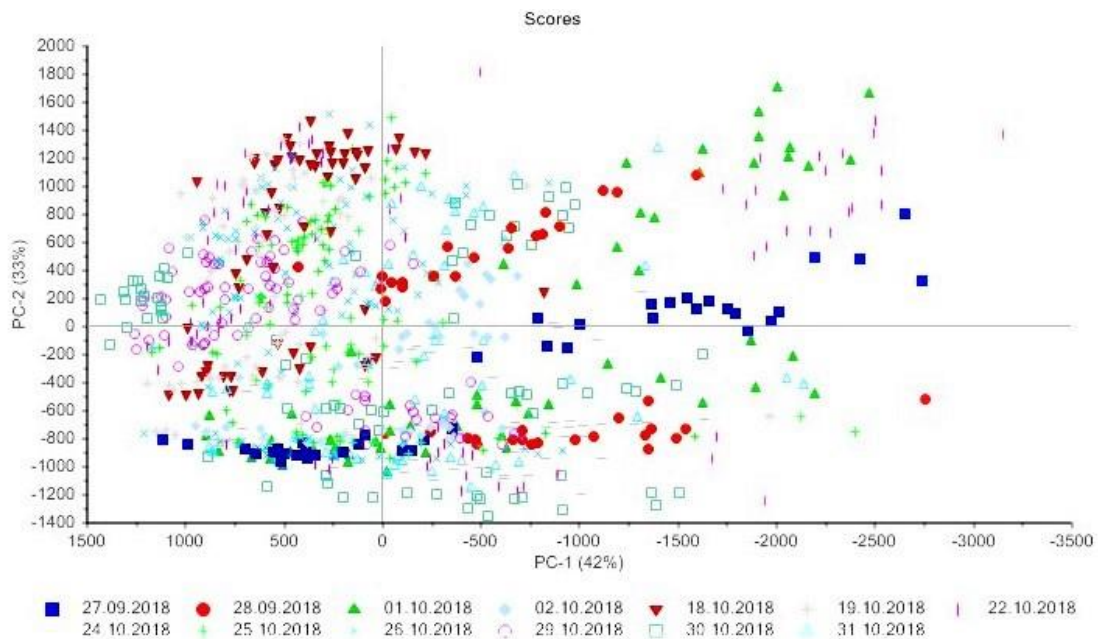


Abbildung 36: *Scores-Plot* der basalen Messpunkte in Abhängigkeit des Datums der Messungen am Raman-Spektroskop mit erster und zweiter Hauptkomponente. Es ist keine Clusterbildung der verschiedenen Tage, an denen die Präparate mithilfe des Raman-Spektroskops vermessen wurden, erkennbar.

3.4.2 Hauptkomponentenanalyse der Messungen im mittleren Epitheldrittel

3.4.2.1 Hauptkomponentenanalyse in Abhängigkeit des Präparats

Es wurde eine Hauptkomponentenanalyse der Messpunkte im mittleren Epitheldrittel in Abhängigkeit der einzelnen Präparate durchgeführt.

Zu sehen ist in Abbildung 37, dass die Messpunkte der einzelnen Präparate Gruppierungen bilden.

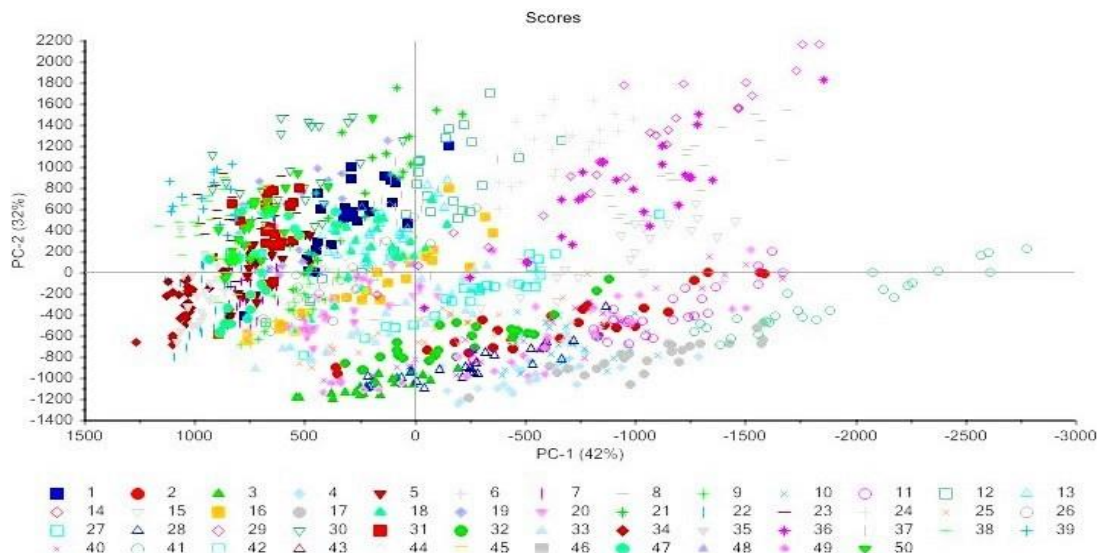


Abbildung 37: Scores-Plot der Messpunkte im mittleren Epitheldrittel nach Präparat

Es zeigen sich Cluster in Abhängigkeit der einzelnen Präparate. Die Präparate 1 bis 10 gehören zu der Gruppe der leichtgradigen Dysplasien, die Präparate 11 bis 20 zu der Gruppe der mäßiggradigen Dysplasien, 21 bis 30 zu der Gruppe der schwergradigen Dysplasien, 31 bis 40 zu der Gruppe des dysplasiefreien Plattenepithels und die Präparate 41 bis 50 gehören zu der Gruppe der invasiven Plattenepithelkarzinome.

3.4.2.2 Hauptkomponentenanalyse in Abhängigkeit der histologischen Diagnose

In Abbildung 38 ist der Scores-Plot für die Hauptkomponentenanalyse der Messpunkte aus dem mittleren Epitheldrittel in Abhängigkeit der ersten und zweiten Hauptkomponente dargestellt. Dort erkennt man ein Cluster sowohl der dysplasiefreien Gruppe als auch der leicht-, mäßig- und schwergradigen Dysplasien. Die invasiven Karzinome finden kein klares Cluster in der gewählten Darstellung.

Stellt man im Scores-Plot die zweite Hauptkomponente der vierten Hauptkomponente gegenüber (Abbildung 39), so ist eine sehr gute Auftrennung in Abhängigkeit der histologischen Diagnose der Gruppe der leicht-, mäßig- und schwergradigen Dysplasien zu erkennen.

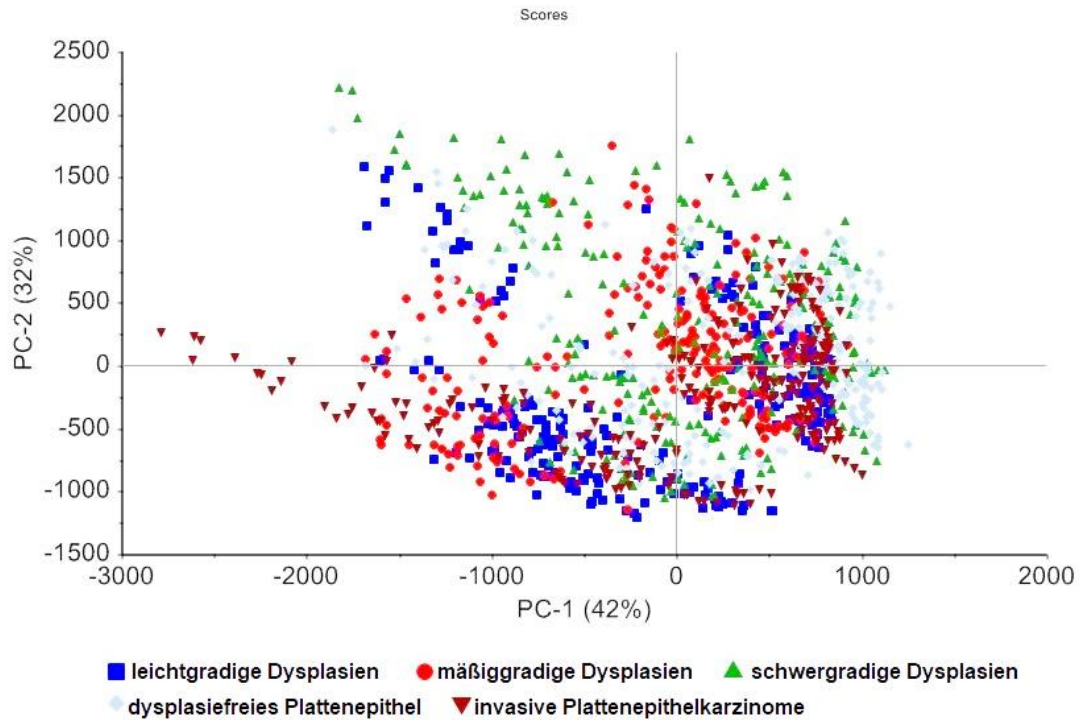


Abbildung 38: Scores-Plot der Messpunkte im mittleren Epitheldrittel in Abhängigkeit der histologischen Diagnose mit erster und zweiter Hauptkomponente

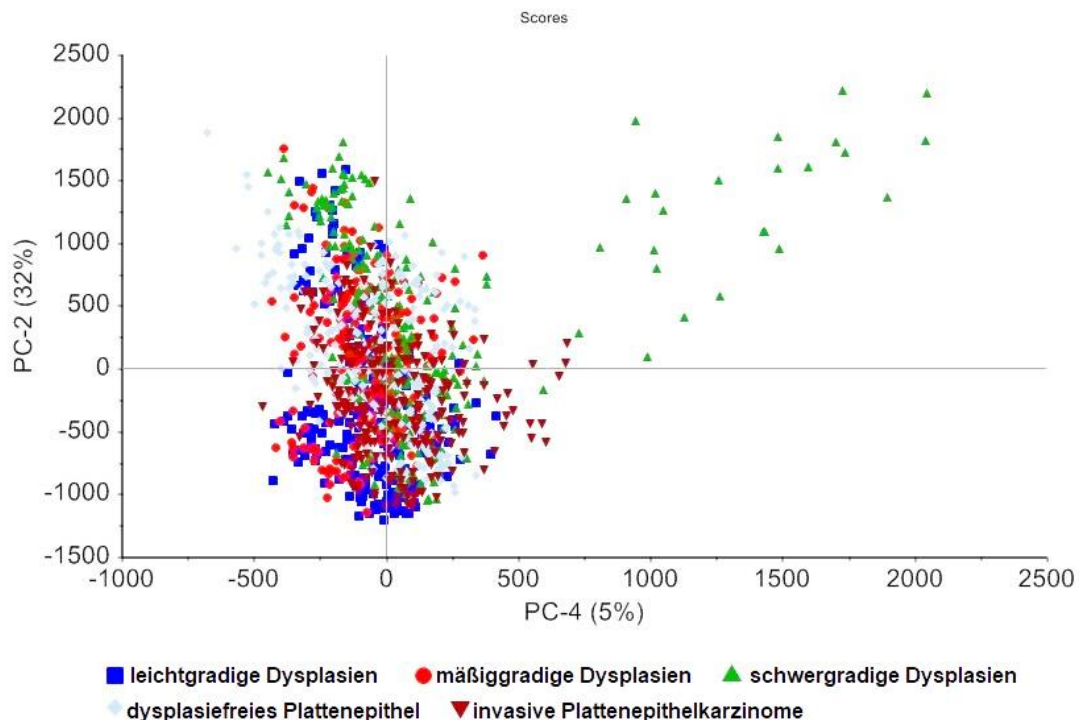


Abbildung 39: Scores-Plot der Messpunkte im mittleren Epitheldrittel in Abhängigkeit der histologischen Diagnose mit zweiter und vierter Hauptkomponente
 Es bilden die Gruppen der leichtgradigen Dysplasien (dunkelblaue Vierecke), Cluster weiter rechts oben etwas diffuser die Gruppe der mäßiggradigen Dysplasien (rote Kreise) und darüber die der Gruppe der schwergradigen Dysplasien (grüne Dreiecke).

In der Darstellung der übrigen Hauptkomponenten im *Scores-Plot* sind in Abhängigkeit der histologischen Diagnose keine Cluster erkenntlich.

Bei der weitergehenden Analyse der *Loading-Plots* können für die erste Hauptkomponente die Wellenzahlen 1465 cm^{-1} , 1424 cm^{-1} , 1130 cm^{-1} , 1112 cm^{-1} und 1003 cm^{-1} , für die zweite Hauptkomponente die Wellenzahlen 1454 cm^{-1} , 1437 cm^{-1} , 1417 cm^{-1} , 996 cm^{-1} und 980 cm^{-1} und für die vierte Hauptkomponente die Wellenzahlen 729 cm^{-1} und 710 cm^{-1} als statistisch relevant für die Unterschiede in den Spektraldaten identifiziert werden (siehe Abbildung 40, Abbildung 41 und Abbildung 43).

Bei dem Vergleich mit dem *Loading-Plot* für die vierte Hauptkomponente, zeigen sich *peaks* an Wellenzahlen, die für DNA-Bestandteile kodieren (Abbildung 43). Die *Loading-Plots* der Hauptkomponente drei und fünf bis sieben sind für diese Auswertung weniger relevant, da sich im *Scores-Plot* in Abhängigkeit der histologischen Diagnose keine Clusterbildung der unterschiedlichen Gruppen zeigt (Abbildung 42, Abbildung 44, Abbildung 45 und Abbildung 46).

Die Zuordnung der relevanten *peaks* in den Wellenzahlen der *Loading-Plots* zu den molekularbiologischen Informationen ist in Tabelle 14 aufgezeigt.

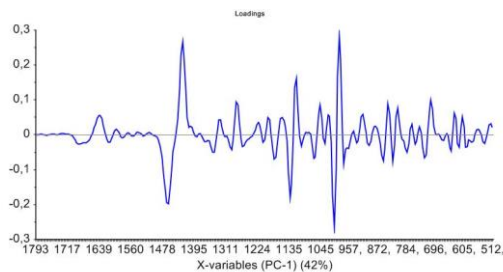


Abbildung 40: *Loading-Plot* der 1. PC nach PCA der Messpunkte im mittleren Epitheldrittel

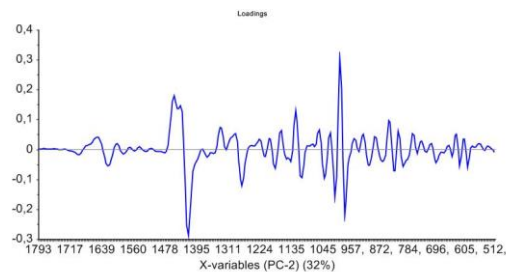


Abbildung 41: *Loading-Plot* der 2. PC nach PCA der Messpunkte im mittleren Epitheldrittel

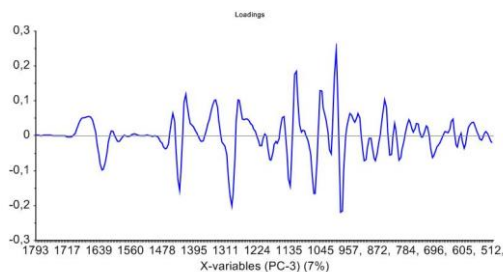


Abbildung 42: *Loading-Plot* der 3. PC nach PCA der Messpunkte im mittleren Epitheldrittel

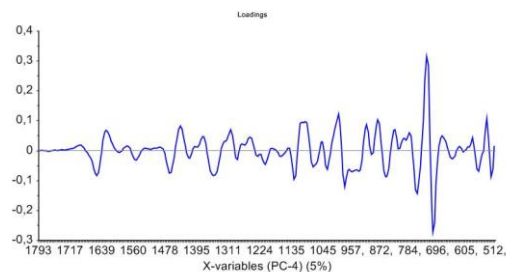


Abbildung 43: *Loading-Plot* der 4. PC nach PCA der Messpunkte im mittleren Epitheldrittel

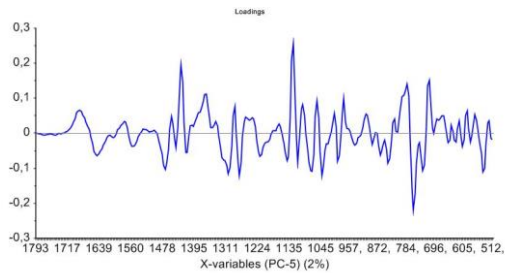


Abbildung 44: *Loading-Plot* der 5. PC nach PCA der Messpunkte im mittleren Epitheldrittel

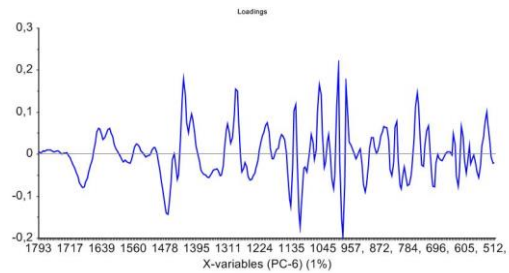


Abbildung 45: *Loading-Plot* der 6. PC nach PCA der Messpunkte im mittleren Epitheldrittel

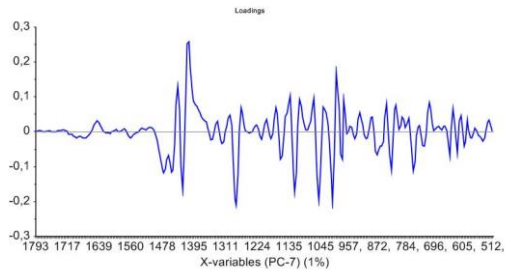


Abbildung 46: *Loading-Plot* der 7. PC nach PCA der Messpunkte im mittleren Epitheldrittel

Tabelle 14: *Peaks* der *Loading-Plots* der PCA der Messpunkte im mittleren Epitheldrittel
 In der Tabelle sind die entsprechenden Wellenzahlen der relevanten *peaks* der *Loading-Plots* der ersten, zweiten und vierten Hauptkomponente dargestellt. Die Zuordnung erfolgte anhand der Publikation „*Raman Spectroscopy of Biological Tissues*“ (Movasaghi *et al.*, 2007).

| Wellenzahl in cm^{-1} (PC) | Zugeordnete molekularbiologische Information |
|-------------------------------------|--|
| 1465 (PC 1) | Lipide |
| 1454 (PC 2) | Kollagen, Phospholipide |
| 1437 (PC 2) | Lipide |
| 1424 (PC 1) | DNA |
| 1417 (PC 2) | Chinone |
| 1130 (PC 1) | Phospholipide |
| 1112 (PC 1) | Saccharid |
| 1003 (PC 1) | Phenylalanin |
| 996 (PC 2) | Ribose |
| 980 (PC 2) | Proteine, Lipide |
| 729 (PC 4) | DNA |
| 710 (PC 4) | DNA |

Hauptkomponente eins erklärt 42 % der Varianz, Hauptkomponente zwei 32 % und Hauptkomponente vier 5 %.

3.4.2.3 Hauptkomponentenanalyse in Abhängigkeit der Progression zu einem invasiven Plattenepithelkarzinom

Im *Scores-Plot* der Hauptkomponenten eins und zwei (Abbildung 47) ist keine Clusterbildung für die Spektren zu erkennen, welche in Proben von Patienten aufgenommen wurden, die im *follow-up* ein invasives Plattenepithelkarzinom der Stimmlippe entwickelt haben im Vergleich zu den Patienten, die im *follow-up* kein invasives Plattenepithelkarzinom entwickelt haben.

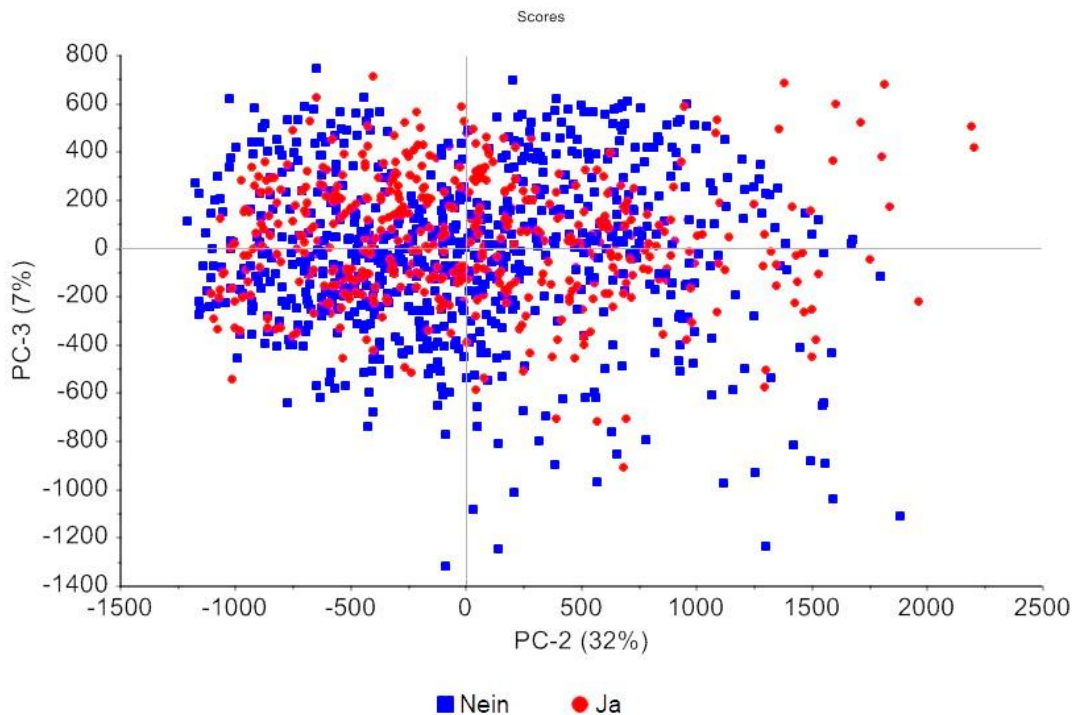


Abbildung 47: *Scores-Plot* der Messpunkte im mittleren Epitheldrittel, ob sich bei Patienten mit einer Veränderung der Stimmlippe ein invasives Plattenepithelkarzinom entwickelt hat mit erster und zweiter Hauptkomponente

3.4.2.4 Hauptkomponentenanalyse in Abhängigkeit sonstiger Kriterien

Es wurde keine Clusterbildung in Abhängigkeit der Variablen Nikotinabusus, Alkoholverhalten, Vorhandenseins eines gastro-oesophagealen Refluxes, Geschlecht oder der Tumorgöße anhand der TNM-Klassifikation in der ersten und zweiten Hauptkomponente beobachtet.

Auch ergab sich keine Clusterbildung im *Scores-Plot* nach dem Tag der Aufbereitung der histologischen Schnitte, dem Tag der Messung am Raman-Spektroskop und dem Alter der Präparate.

3.5 Lineare Diskriminanzanalyse

Mithilfe der linearen Diskriminanzanalyse (LDA) wurden Modelle erstellt, die die Unterschiede in den Spektraldaten in Abhängigkeit von selbst gewählten Variablen analysieren. In dem mathematisch-statistischen Verfahren der LDA wird analysiert, in wie weit die Spektraldaten anhand der spektralen Merkmale (Modell 1: Hauptkomponenten eins bis sieben; Modell 2: Intensitäten der einzelnen Wellenzahlen) zu dem vom Untersucher gewählten abhängigen Variablen zugeordnet werden können. Herangezogen wurden jeweils die Messungen im mittleren Epitheldrittel.

Jeweils zwei verschiedene Datensätze wurden zu der Erstellung eines LDA-Modells verwendet. Die Datenvorverarbeitung wurde in beiden Fällen wie in Kapitel 2.2.8 beschrieben durchgeführt.

Im ersten Modell wurden die Daten der Mittelwertspektren jeder Probe im Wellenzahlenbereich von 1500 bis 600 cm^{-1} , basierend auf den Hauptkomponenten eins bis sieben, verwendet.

Im zweiten Modell wurden die Daten der Einzelspektren jeder Probe im Wellenzahlenbereich von 1650 bis 655 cm^{-1} berücksichtigt.

Die Validität des jeweiligen statistischen Modells wurde anhand folgender statistischer Parameter evaluiert (Berechnung siehe Kapitel 2.2.8). Die Spezifität zeigt das Verhältnis der Proben an, welche richtigerweise nicht der falschen Gruppe zugeordnet werden. Durch Ermittlung der Sensitivität hingegen erhält man das Verhältnis der Spektren, die korrekt zugeordnet werden. Die Genauigkeit gibt an, mit welcher Wahrscheinlichkeit das Spektrum der richtigen Gruppe zugewiesen wird. Die Werte des *Matthews correlation coefficient* (MMC) sowie der Beständigkeit fungieren als Variablen der Vorhersage und befinden sich zwischen -1 und +1, wobei ein größerer Wert eine bessere Vorhersehbarkeit angibt. Der Fehler gibt das Verhältnis der Spektren an, die falsch zugeordnet werden.

3.5.1 Lineare Diskriminanzanalyse der Mittelwertspektren basierend auf den Hauptkomponenten eins bis sieben (Modell 1)

3.5.1.1 Diskriminanz der Gruppe des dysplasiefreien Plattenepithels und der verschiedenen Dysplasiegrade gegenüber invasiven Karzinomen

Zwischen invasiven Karzinomen und Plattenepithel ohne dysplastischen Veränderungen kann gut diskriminiert werden. Sowohl Spezifität als auch Sensitivität und Genauigkeit liegen bei 80 % (siehe Tabelle 15).

Tabelle 15: Lineare Diskriminanzanalyse der Mittelwertspektren der Messpunkte im mittleren Epitheldrittel (Modell 1) der Studiengruppe V (invasive Karzinome) gegenüber Studiengruppe I (keine Dysplasie), II (leichtgradige Dysplasie), III (mäßiggradige Dysplasie) und IV (schwergradige Dysplasie)

| | V vs. I | V vs. II | V vs. III | V vs. IV |
|------------------------------------|---------|----------|-----------|----------|
| Spezifität | 80,00 % | 60,00 % | 88,89 % | 100,00 % |
| Sensitivität | 80,00 % | 70,00 % | 90,00 % | 100,00 % |
| Genauigkeit | 80,00 % | 65,00 % | 89,47 % | 100,00 % |
| „Matthews correlation coefficient“ | 0,60 | 0,30 | 0,79 | 1,00 |
| Fehler | 0,20 | 0,40 | 0,11 | 0,00 |
| Beständigkeit | 0,75 | 0,40 | 0,88 | 1,00 |

Auch zwischen den dysplastischen Veränderungen und invasiven Karzinomen kann aufgrund der Mittelwerte der Raman-Spektren relativ gut differenziert werden, was in Tabelle 15 zu sehen ist. Anhand des gewählten LDA-Modells sind die leichtgradigen Dysplasien gegenüber den Karzinomen nur mäßig abgrenzbar. Die mäßig- und schwergradigen Dysplasien sind gegenüber den invasiven Karzinomen besser abgrenzbar. Die beste Differenzierung kann zwischen invasiven Karzinomen und schwergradigen Dysplasien erzielt werden. Dort liegen Spezifität, Sensitivität und Genauigkeit bei 100 %.

3.5.1.2 Diskriminanz der unterschiedlichen Dysplasiegrade

In Tabelle 16 ist die Diskriminanz der Dysplasiegrade mit unterschiedlicher therapeutischer Konsequenz zusammengefasst. Werden Leukoplakien ohne dysplastische Veränderung des Epithels oder mit leicht- oder mäßiggradigen Dysplasien diagnostiziert, finden in der Regel engmaschige Nachkontrollen statt,

wohingegen schwergradige Dysplasien und das *Carcinoma in situ* in einer zweiten Operation nachreseziert werden.

Tabelle 16: Lineare Diskriminanzanalyse der Mittelwertspektren der Messpunkte im mittleren Epitheldrittel (Modell 1) zwischen Leukoplakien und Dysplasiegraden mit unterschiedlicher therapeutischer Konsequenz (Studiengruppe I+II+III vs. Studiengruppe IV)

| | |
|---|---------|
| Spezifität | 68,97 % |
| Sensitivität | 60,00 % |
| Genauigkeit | 65,31 % |
| „ <i>Matthews correlation coefficient</i> “ | 0,29 |
| Fehler | 0,31 |
| Beständigkeit | 0,51 |

Zwischen diesen Gruppen kann mit dem LDA-Modell mit einer Spezifität von ungefähr 69 % unterschieden werden. Die Werte der Sensitivität und der Genauigkeit liegen etwas darunter bei 60 % respektive circa 65 %.

Die Werte der *MCC*, des Fehlers und der Beständigkeit hingegen erzielen jedoch nur etwas bessere Ergebnisse als eine zufällige Voraussage.

3.5.1.3 Diskriminanz der Progredienz zum invasiven Tumor

Durch die Informationen, die mithilfe der Raman-Spektroskopie ermittelt wurden, kann mit einer Spezifität von ungefähr 77 % vorausgesagt werden, ob sich beim jeweiligen Patienten aus dysplastisch oder keratotisch verändertem Stimmlippenepithel im *follow-up* ein invasives Karzinom dessen entwickelt. Die Werte der Sensitivität (circa 58 %) und der Genauigkeit (circa 69 %) liegen etwas darunter (siehe Tabelle 17).

Tabelle 17: Lineare Diskriminanzanalyse der Mittelwertspektren der Messpunkte im mittleren Epitheldrittel (Modell 1), ob Patienten später an einem invasiven Plattenepithelkarzinom der Stimmlippe erkrankt sind

| | |
|---|---------|
| Spezifität | 76,67 % |
| Sensitivität | 57,89 % |
| Genauigkeit | 69,39 % |
| „ <i>Matthews correlation coefficient</i> “ | 0,35 |
| Fehler | 0,23 |
| Beständigkeit | 0,63 |

3.5.2 Lineare Diskriminanzanalyse aller Einzelspektren (Modell 2)

3.5.2.1 Diskriminanz der Gruppe des dysplasiefreien Plattenepithels und der verschiedenen Dysplasiegrade gegenüber invasiven Karzinomen

Unter Zuhilfenahme der linearen Diskriminanzanalyse kann sehr gut zwischen invasiven Plattenepithelkarzinomen und Plattenepithel ohne dysplastischen Veränderungen differenziert werden. Sowohl Spezifität als auch Sensitivität und Genauigkeit liegen bei 99,20 % (siehe Tabelle 18).

Die Werte der Differenzierung zwischen den verschiedenen Dysplasiegraden und invasiven Karzinomen liegen zwar etwas unterhalb der Werte des Plattenepithels ohne Dysplasien, jedoch kann man auch hier von einer guten Aufteilung sprechen. Mit entsprechenden Werten der Spezifität, Sensitivität und Genauigkeit von jeweils über 95 % (siehe Tabelle 18) werden die Raman-Spektren mit hohen Wahrscheinlichkeiten der richtigen Gruppe zugeordnet. Auch eine niedrige Fehlerquote und hohe Werte des *MCC* und der Beständigkeit lassen auf eine gute Vorhersehbarkeit des Modells zwischen den Studiengruppen I, II, III und IV (Leukoplakien ohne Dysplasien, leicht-, mäßig- und schwergradige Dysplasien) gegenüber der Studiengruppe V (invasive Plattenepithelkarzinome) schließen.

Tabelle 18: Lineare Diskriminanzanalyse der Einzelspektren der Messpunkte im mittleren Epitheldrittel (Modell 2) der Studiengruppe V (invasive Karzinome) gegenüber Studiengruppe I (keine Dysplasien), II (leichtgradige Dysplasie), III (mäßiggradige Dysplasie) und IV (schwergradige Dysplasie)

| | V vs. I | V vs. II | V vs. III | V vs. IV |
|---|---------|----------|-----------|----------|
| Spezifität | 99,20 % | 96,00 % | 96,89 % | 97,60 % |
| Sensitivität | 99,20 % | 97,60 % | 99,20 % | 99,20 % |
| Genauigkeit | 99,20 % | 96,80 % | 98,11 % | 98,40 % |
| „ <i>Matthews correlation coefficient</i> “ | 0,98 | 0,94 | 0,96 | 0,97 |
| Fehler | 0,01 | 0,04 | 0,03 | 0,02 |
| Beständigkeit | 0,99 | 0,96 | 0,97 | 0,98 |

3.5.2.2 Diskriminanz der unterschiedlichen Dysplasiegrade

Legt man der linearen Diskriminanzanalyse die verschiedenen Dysplasiegrade und Veränderungen des Stimmlippenepithels mit unterschiedlicher therapeutischer Konsequenz zugrunde, erhält man immerhin noch eine Spezifität von 84,83 % und eine Sensitivität von 86,60 % (siehe Tabelle 19). Diese zwei Gruppen lassen sich mit einer Genauigkeit von 85,55 % aufgrund der Informationen des Raman-Spektrums unterscheiden.

Tabelle 19: Lineare Diskriminanzanalyse der Einzelspektren der Messpunkte im mittleren Epitheldrittel (Modell 2) zwischen Leukoplakien und Dysplasiegraden mit unterschiedlicher therapeutischer Konsequenz (Studiengruppe I+II+III vs. Studiengruppe IV)

| | |
|---|---------|
| Spezifität | 84,83 % |
| Sensitivität | 86,60 % |
| Genauigkeit | 85,55 % |
| „ <i>Matthews correlation coefficient</i> “ | 0,71 |
| Fehler | 0,15 |
| Beständigkeit | 0,83 |

3.5.2.3 Diskriminanz der Progredienz zum invasiven Tumor

In Tabelle 20 sieht man die Diskriminanz der Spektraldaten, ob sich beim jeweiligen Patienten aus dysplastisch oder keratotisch verändertem Stimmlippenepithel im *follow-up* ein invasives Karzinom dessen entwickelte. Mit einer Spezifität von 94,93 %, einer Genauigkeit von 93,64 % und noch einer Sensitivität von 89,33 % ist eine Differenzierung sehr gut möglich. Auch die *MCC* und die Beständigkeit sind relativ hoch. So kann mithilfe der Informationen aus dem Raman-Spektrum einer unbekanntem Probe mit einer relativ hohen Wahrscheinlichkeit prognostiziert werden, ob sich beim Patienten später ein invasives Plattenepithelkarzinom entwickelt.

Tabelle 20: Lineare Diskriminanzanalyse der Einzelspektren der Messpunkte im mittleren Epitheldrittel (Modell 2), ob Patienten später an einem invasiven Plattenepithelkarzinom der Stimmlippe erkrankt sind

| | |
|---|---------|
| Spezifität | 94,93 % |
| Sensitivität | 89,33 % |
| Genauigkeit | 93,64 % |
| „ <i>Matthews correlation coefficient</i> “ | 0,83 |
| Fehler | 0,05 |
| Beständigkeit | 0,94 |

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurden Leukoplakien des Stimmlippenepithels ohne Dysplasien, mit leicht-, mäßig- und schwergradigen Dysplasien des Plattenepithels sowie invasive Plattenepithelkarzinome der Stimmlippe anhand ihres Raman-Spektrums klassifiziert. Zudem wurde untersucht, ob anhand der Raman-Spektren des entnommenen Stimmlippengewebes die Prognose des Patienten in Bezug auf das Risiko der Entwicklung eines invasiven Plattenepithelkarzinoms im *follow-up* vorhersagbar ist.

4.1 Limitierungen histopathologischer Klassifikationssysteme hinsichtlich der Prognose

4.1.1 Korrelation maligner Entartung zur Schwere des Dysplasiegrades

Dass dysplastische Veränderungen mit der Entstehung eines invasiven Karzinoms des Stimmlippenepithels assoziiert sind, ist durch zahlreiche Studien belegt (Cuchi *et al.*, 1994; Karatayli-Ozgunsoy *et al.*, 2015; Montgomery und White, 2012; Ricci *et al.*, 2003).

Es besteht jedoch ein Dissens in der vorhandenen Literatur, inwieweit der Grad der Dysplasie eine prognostische Aussagekraft bezüglich des Risikos der Entwicklung eines Malignoms im Verlauf hat.

In einer Studie von Rohde *et al.* wurde beobachtet, dass mit Zunahme des Grades dysplastischer Veränderung des Stimmlippenepithels das maligne Entartungsrisiko positiv korreliert (Rohde *et al.*, 2012). In einer weiteren retrospektiven Studie von Weller *et al.*, die über 900 Fälle dysplastischer Veränderungen der Stimmlippe untersuchte, konnte auch ein Zusammenhang der Entartungswahrscheinlichkeit zum invasiven Plattenepithelkarzinom mit der Schwere der Dysplasie beobachtet werden. Dort wurden maligne Entartungen, ähnlich der Ergebnisse der Studie dieser Dissertation aus schwergradig dysplastischen Veränderungen des Stimmlippenepithels zu ungefähr 30 % beobachtet, bei mäßig- und leichtgradigen Dysplasien zu circa 11 % (Weller *et al.*, 2010).

Diskrepanz zu diesen Daten beobachteten einige Studien ein höheres Entartungsrisiko für mäßiggradige Dysplasien. Beispielsweise beschrieben Zhang und Liu bei mäßiggradig dysplastisch verändertem Stimmlippenepithel ein

höheres malignes Entartungsrisiko verglichen mit schwergradigen Dysplasien. Dort wurde festgestellt, dass aus mäßiggradigen Dysplasien etwas häufiger (20 %) als aus schwergradigen Dysplasien (15 %) ein invasives Plattenepithelkarzinom hervorgeht, wobei ein vergleichsweise kleines Patientenkollektiv untersucht wurde und das *Carcinoma in situ* eine eigenständige Gruppe bildete (Zhang und Liu, 2012).

Ein maßgeblicher Grund für die Diversität der Prognosen hinsichtlich des malignen Entartungsrisikos könnten die unterschiedlichen Operationsmethoden und die Art der Exzision der verschiedenen Dysplasiegrade und des *Carcinoma in situ* sein.

So wurden auch in der Studie, welche dieser Arbeit zugrunde liegt, bei Patienten mit leicht- und mäßiggradigen Dysplasien subtotale Resektionen toleriert, wohingegen bei Patienten mit schwergradigen Dysplasien oder einem *Carcinoma in situ* totale Resektionen durchgeführt wurden.

Die jeweilige Operationstechnik der verschiedenen Studien wirkt sich somit auch auf die divergierenden Progressionsrisiken aus.

Zudem seien rezidivierende Leukoplakien der Stimmlippe, sowie schwergradige Dysplasien als Initialdiagnose erhebliche Risikofaktoren für die Entartung zu einem invasiven Plattenepithelkarzinom (Jabarin *et al.*, 2018).

Gesamt betrachtet wird durch die aktuelle Datenlage indes beschrieben, dass schwergradige Dysplasien mit einem höheren Risiko einer malignen Entartung korrelieren als mäßig- oder leichtgradig dysplastische Veränderungen (Montgomery und White, 2012; Rohde *et al.*, 2012; Spielmann *et al.*, 2010; Weller *et al.*, 2010).

4.1.2 Varianz der Prognosen

Die Prognosen zum Progressionsrisiko der dysplastischen Veränderungen der Stimmlippe zu einem invasiven Plattenepithelkarzinom weichen in unterschiedlichen Studien zum Teil sehr voneinander ab.

Verschiedene wissenschaftliche Arbeiten, die eine maligne Entartung des Stimmlippenepithels bei zuvor diagnostizierten dysplastischen Veränderungen untersuchten, weisen eine uneinheitliche Datenlage auf.

So existieren unterschiedliche Daten für leichtgradige Dysplasien, in denen zwischen null und 30 % der Fälle eine maligne Entartung stattfindet (Blackwell *et al.*, 1995; Nielsen *et al.*, 1986; Plch *et al.*, 1998; Uno *et al.*, 1997). Bei mäßiggradigen Dysplasien reicht das maligne Entartungsrisiko von null bis 44 % (Blackwell *et al.*, 1995; Hellquist *et al.*, 1982; Højslet *et al.*, 1989; Nielsen *et al.*, 1986; Plch *et al.*, 1998; Riera *et al.*, 1987; Uno *et al.*, 1997). Für schwergradige Dysplasien wird eine maligne Entartung in 20 bis 57 % der Fälle prognostiziert (Blackwell *et al.*, 1995; Hellquist *et al.*, 1981; Plch *et al.*, 1998; Riera *et al.*, 1987; Uno *et al.*, 1997).

Aufgrund dieser Varianz der Prognosen ist allein mithilfe der histopathologischen Klassifizierung keine zuverlässige Identifikation der Patienten mit einer schlechten Prognose möglich. Es kann nicht vorausgesagt werden, welche therapeutischen Konsequenzen gezogen werden müssen. Dies hat in der Praxis zur Folge, dass bei einigen Patienten Übertherapien und bei einigen Untertherapien durchgeführt werden.

Insbesondere an der Stimmlippe können sich nur wenige Millimeter größere oder kleinere Resektionen erheblich auf die Stimmfunktion auswirken, weswegen ein Klassifikationssystem erforderlich ist, das die Prognose und die damit einhergehende Therapieradikalität möglichst gut vorhersagt. Damit könnten sowohl Untertherapien, die eine verschlechterte onkologische Prognose mit sich bringen als auch Übertherapien, die in ein schlechteres funktionelles Ergebnis, zum Beispiel hinsichtlich der Stimmqualität, als notwendig münden, vermieden werden. Zudem könnte ein solches System als Kriterium zur Bestimmung des Intervalls der Nachsorge dienen. Patienten mit schlechter Prognose könnten engermaschiger kontrolliert werden als Patienten, die eine gute Prognose hinsichtlich einer malignen Entartung aufweisen.

4.1.3 Objektivierbarkeit und Reproduzierbarkeit

Es ist zu beachten, dass die derzeitige histopathologische Einteilung unterschiedlicher Dysplasiegrade zum Teil auf subjektiven Kriterien beruht, was auch die Vergleichbarkeit der Ergebnisse von verschiedenen Studien beeinflussen könnte (Naggar *et al.*, 2017; Warnakulasuriya, 2001). Damit besteht

das Problem, dass die histopathologische Einteilung nur bedingt reproduzierbar ist (Bosman, 2001).

Wie in Kapitel 1.4.4 beschrieben gibt es verschiedene Klassifikationssysteme, um dysplastische Veränderungen im Plattenepithel der Stimmlippe zu beschreiben, die aktuelle Einteilung der WHO in „*low-grade*“- und „*high-grade*“-Dysplasien (Naggar *et al.*, 2017), die vorherigen Einteilung der WHO in leicht-, mäßig- oder schwergradige Dysplasien (Barnes *et al.*, 2005) oder die „*Ljubljana classification*“, welche zwischen drei oder vier Dysplasiegraden unterscheidet (Gale *et al.*, 2014; Hellquist *et al.*, 1999).

Weniger untersucherbedingte Abweichungen werden bei der Verwendung von einer Klassifizierung mit zwei Dysplasiegraden („*low-grade dysplasias*“/„*high-grade dysplasias*“) beschrieben als bei jenen mit drei Graden dysplastischer Veränderungen (leicht, mäßig und schwergradige Dysplasie) (McLaren *et al.*, 2000).

4.1.4 Fazit

Es ergeben sich zwei grundsätzliche Probleme der histopathologischen Einteilung der Dysplasiegrade.

Zum einen ist die histopathologische Einteilung nicht objektiv und nicht sicher reproduzierbar, zum anderen bilden sich die Prognosen der unterschiedlichen dysplastischen Veränderungen nicht eindeutig in der histopathologischen Diagnose ab.

Diese erheblichen Unterschiede der Prognosen in den verschiedenen Studien erhärten die Annahme, dass allein aufgrund der histopathologischen Einteilung keine verlässlichen Schlüsse hinsichtlich der Progressionsprognose gezogen werden können. Es muss also auf andere Klassifizierungssysteme der Histopathologie oder zusätzliche Methoden zurückgegriffen werden, um Patienten kongruent zu ihrer Prognose einer adäquaten Behandlung zuzuführen.

4.2 Diskussion des Patientenkollektivs

4.2.1 Auswahl der Patienten

Wie bereits in Kapitel 2.2.1 beschrieben, wurden die Patienten, welche dem Studiendesign entsprachen, retrospektiv anhand der Diagnose der ersten Gewebeentnahme ausgewählt.

Bei allen Patientenfällen handelt es sich um jeweilige Erstdiagnosen von Veränderungen der Stimmlippe, die zum Zeitpunkt der Datenerhebung mindestens fünf Jahre zurücklagen. Dies garantiert einen Nachbeobachtungszeitraum der Erkrankung von mindestens fünf Jahren, um eventuelle Rezidive oder Entartungen zu dokumentieren.

Bei Patienten mit der Diagnose einer schwergradigen Dysplasie, die innerhalb eines kurzen Zeitraums ein invasives Plattenepithel entwickelten, ist es wahrscheinlich, dass zum Zeitpunkt der ersten Biopsie bereits ein invasives Karzinom vorlag, dieses aber mittels Biopsie nicht erfasst wurde. Grund hierfür könnte eine zu oberflächliche oder zu weit am Rand gelegene Biopsie der Leukoplakie gewesen sein.

Da jedoch bewusst die histopathologische Erstdiagnose in dieser Arbeit ausschlaggebend für die Einteilung in die verschiedenen Studiengruppen ist, bestand für diese Präparate die Möglichkeit aufgrund der histopathologischen Diagnose einer anderen Gruppe zugeordnet zu werden.

Montgomery und White, welche die Epidemiologie und Prognostik dysplastischer Veränderungen des Stimmlippenepithels in Schottland untersuchten, schlossen in ihrer Studie Patienten mit dysplastischen Veränderungen aus der Auswertung aus, die innerhalb von drei Monaten ein invasives Karzinom entwickelten (Montgomery und White, 2012). In der dieser Dissertation zugrundeliegenden Studie wurden diese Fälle nicht ausselektiert, da es von besonderem Interesse wäre, solche Fälle eventuell mithilfe der Raman-Spektroskopie zu identifizieren, die zuvor falsch klassifiziert wurden, weil in der diagnostizierten Gewebeprobe kein invasives Plattenepithelkarzinom vorhanden war.

4.2.2 Vergleichbarkeit des Patientenkollektives mit der Literatur

Das Ziel des dieser Dissertation zugrundeliegenden Studiendesigns ist nicht darauf ausgelegt, die klinischen Parameter der verschiedenen Patienten an sich zu untersuchen, sondern diese in Zusammenhang mit den Spektraldaten aus der Raman-Spektroskopie zu bringen. Trotz dessen wurde die Patientenkohorte auf epidemiologische Daten untersucht, um zu überprüfen, inwieweit die Patientenkohorte mit der gängigen Literatur vergleichbar ist.

Das mittlere Alter der Patienten mit einer Erstdiagnose einer Veränderung des Stimmlippenepithels dieser Studie von 63,76 Jahren entspricht den erhobenen Daten der gängigen Literatur (Karatayli-Ozgunsoy *et al.*, 2015; Montgomery und White, 2012).

Ebenso kann, kongruent zu den aktuell vorhandenen Daten anderer Studien, in der vorliegenden Arbeit beobachtet werden, dass mehr Männer als Frauen an dysplastischen Veränderungen oder einem Karzinom des Stimmlippenepithels erkranken (Bouquot und Gnepp, 1991; Ricci *et al.*, 2003).

Der Risikofaktor des Rauchens für die Entstehung einer keratotischen oder dysplastischen Veränderung bis hin zu einem Plattenepithelkarzinom der Stimmlippe ist wissenschaftlich durch zahlreiche Studien belegt (Grasl *et al.*, 1990; Müller und Krohn, 1980). Dieser Zusammenhang ist auch beim Patientenkollektiv der hier vorliegenden Studie zu erkennen. Das Patientenkollektiv besteht zu einem sehr hohen Anteil aus ehemaligen oder aktuellen Rauchern. Dennoch ist einschränkend zu bedenken, dass keine standardisierte und skalierte Anamnese des Tabakkonsums stattgefunden hat. Ein Zusammenhang zwischen Alkoholkonsum und der Entstehung einer plattenepithelialen Veränderung der Stimmlippe kann aufgrund der kleinen Kohorte sowie der nicht standardisierten Anamnese mit dieser Arbeit nicht objektiviert werden.

Zusammengefasst kann die Patientenkohorte dieser Studie als repräsentativ betrachtet werden und stellt sich als gut vergleichbar mit der aktuellen Literatur dar.

4.3 Evaluation des experimentellen Setups und der verwendeten Methoden

Im folgenden Kapitel soll das methodische Vorgehen diskutiert und dem Vorgehen anderer Arbeitsgruppen gegenübergestellt werden, um einen Vergleich der Ergebnisse dieser Arbeit und Arbeiten mit anderen Studiendesigns zu ermöglichen.

4.3.1 Aufbereitung der Gewebeschnitte

4.3.1.1 Formalin-Fixierung und Entparaffinierung der Gewebeschnitte

Die Versuche wurden an entparaffinierten, histologischen Schnitten durchgeführt.

Insbesondere bei Untersuchungen von Stimmlippengewebe ist aufgrund der geringen Größe der Gewebeproben und der gewebeschonenden Entnahme zum Erhalt der Stimmfunktion keine eigene Probe aus unbehandeltem Gewebe für die Untersuchungen mit dem Raman-Spektroskop zu rechtfertigen. So wurde auf Gewebe aus Paraffin-Blöcken zurückgegriffen, welches im Institut für Pathologie der Universität Würzburg archiviert wurde. Bei diesen Präparaten war die Diagnostik bereits abgeschlossen.

Ob eine Formalin-Fixierung, die Einbettung in Paraffin und die anschließende Entparaffinierung Auswirkungen auf die Raman-Spektren haben, wird vielseitig diskutiert.

Untersuchungen von malignem und gesundem Lungengewebe, welches zum einen in Formalin fixiert wurde und zum anderen unbehandelt analysiert wurde, konnten zwar einen Einfluss der Formalin-Fixierung auf das Raman-Spektrum dokumentieren, die wichtigen *peaks* zur Differenzierung zwischen gesundem und maligne verändertem Gewebe blieben jedoch erhalten (Huang *et al.*, 2003).

Zudem konnte diese Veränderung durch Waschen der Formalin-fixierten Gewebeproben mit Salzlösungen vor den anschließenden Messungen mit einem Raman-Spektroskop minimiert werden (Huang *et al.*, 2003; Podshyvalov *et al.*, 2005).

Formalin-Fixierung von Gewebe ist eine anerkannte Methodik, um entsprechendes Gewebe vor der Untersuchung mit einem Raman-Spektroskop zu fixieren und beeinflusst das Gewebe nur wenig, sodass die gewonnenen Spektraldaten mit denen einer vitalen Zelle verglichen werden können (Galli *et al.*, 2014; Meade *et al.*, 2010).

Der Einfluss der Einbettung mittels Paraffins und der Vorgang des Entparaffinierens muss ebenfalls als eine mögliche Störgröße für die gewonnenen Spektraldaten beachtet werden.

Krishna *et al.* untersuchten die Differenzierung zwischen gesundem und malignem Ovarialgewebe mithilfe von durch die Raman-Spektroskopie gewonnenen Spektraldaten. Bei Messungen an Präparaten, die zuvor mit Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet wurden, konnte eine gute Differenzierung der Gewebetypen beobachtet werden, nicht jedoch bei Messungen an entparaffinierten Präparaten. Die Entparaffinierung verändere das Gewebe, wodurch sich eine Differenzierung von gesundem und malignem Gewebe schwieriger gestalten (Krishna *et al.*, 2005).

Entgegen der zuvor zitierten Studie etablierte sich das Entparaffinieren von Gewebeschnitten vor Untersuchungen durch die Raman-Spektroskopie (Devpura *et al.*, 2010), weil auch Paraffin ein starkes eigenes Raman-Spektrum aufweist. Residuale *peaks* des Paraffins konnten identifiziert werden (Faolain *et al.*, 2005) und somit konnte trotz einer geringfügigen Veränderung des Gewebes gut zwischen verschiedenen Gewebetypen differenziert werden (Ibrahim *et al.*, 2017).

Infolgedessen konnten entparaffinierte Gewebeschnitte bereits zur Diagnostik mithilfe der Raman-Spektroskopie benutzt werden, um Neuroblastome und Ganglioneurome zu diagnostizieren (Devpura *et al.*, 2013).

Auch laut Depciuch *et al.* konnte bei Untersuchungen von Gewebeschnitten der Lunge ein Einfluss des Entparaffinierens auf das Raman-Spektrum zwar festgestellt werden, die wichtigen Informationen, um das Gewebe zu klassifizieren, blieben jedoch erhalten. Es wurden die *peaks* des Paraffins aus der Auswertung ausgeschlossen und beobachtet, dass die Aufbereitung des Gewebeschnittes mittels Entparaffinieren keinen erheblichen Einfluss auf die Auswertung hatte (Depciuch *et al.*, 2016).

4.3.1.2 Schichtdicke des Gewebeschnittes

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass eine Gewebeschnittdicke von 20 µm notwendig ist, um eine verlässliche Messung im Gewebe zu ermöglichen. Bei kleineren Schichtdicken war der Messfokus zum Teil im Glas des Objektträgers lokalisiert (Moerth, 2017). Auch andere Arbeitsgruppen verwendeten bereits Gewebeschnitte mit dieser Schichtdicke zur Diagnostik mithilfe eines Raman-Spektroskops (Cals *et al.*, 2016).

Was in dem 20 µm dicken Gewebeschnitt allerdings vermessen wurde (Zellkern, Zytoplasma oder andere Zellkompartimente) konnte nicht mit Sicherheit festgestellt werden. Zwar waren auch Zellkerne im nicht gefärbten Schnitt bei 60-facher Vergrößerung mit einem Wasserimmersionsobjektiv erkennbar, jedoch war nicht exakt abschätzbar in welcher Tiefe des 20 µm-Schnittes gemessen wurde.

4.3.1.3 Einfluss des Aufbereitungstages

Das entsprechende Verfahren der Aufbereitung der Gewebeschnitte wurde standardisiert für alle Präparate gleichermaßen durchgeführt. Da schon kleinste Abweichungen im Aufbereitungsverfahren Veränderungen des Raman-Spektrums bewirken könnten, wurde im Rahmen einer internen Qualitätskontrolle eine Hauptkomponentenanalyse in Abhängigkeit des Tages der Aufbereitung der Gewebeschnitte durchgeführt.

Dabei kann im *Scores-Plot* keine Clusterbildung der einzelnen Tage festgestellt werden (siehe Abbildung 35).

Dies kann als Hinweis dienen, dass der Faktor der äußeren Bedingungen am Tag der Aufbereitung des Gewebeschnittes als Messungengenauigkeit keinen Einfluss auf die Auswertung hatte.

4.3.1.4 Auswahl der Objektträger

Problematisch ist, dass Glas ein eigenes Raman-Spektrum aufweist (Kujumzelis, 1935). Dennoch wurde auf Glas als Material des Objektträgers zurückgegriffen, da dieses in der Routinediagnostik weit verbreitet, gut verfügbar und preiswert ist. Zudem besitzen Objektträger aus Glas die für das Verfahren wichtige Transparenz.

Aufgrund der technischen Gegebenheiten des verwendeten Raman-Systems mussten jedoch die Messungen durch das Deckglas hindurch vorgenommen werden und es bestand die Möglichkeit, dass der Mess-Fokus auf das Volumen des Glases der Objektträger projiziert wurde.

Aufgrund dieses Umstandes wurde der Messaufbau so modifiziert, dass sich das Glas möglichst wenig auf das gewonnene Spektrum auswirkt. Es wurden sehr dünne Deckgläser verwendet und der Z-Fokus der Messung so eingestellt, dass die Messung möglichst weit vom Deckglas entfernt durchgeführt wurde. Die

Methodik, dünne Deckgläser und entsprechend dicke Gewebeschnitte zu verwenden, ist der Bachelorarbeit von Agnes Moerth entnommen (Moerth, 2017). Zudem wurden dem Glasspektrum ähnliche Spektren selektiv gelöscht und die entsprechende Messung wiederholt. Die verbliebenen Messungen wurden anhand eines *Line-Plots* validiert. Hierdurch konnte sichergestellt werden, dass es sich um keine Glasspektren, sondern um biologische Informationen des Gewebeschnittes handelt.

4.3.2 Versuchsaufbau am Raman-Spektroskop

4.3.2.1 Orientierung im Präparat

Die entsprechend aufbereiteten Gewebeschnitte wurden, anders als bei gebräuchlichen histologischen Auswertungsmethoden mit der Hämatoxylin-Eosin-Färbung oder der Immunfluoreszenz, vor Vermessung nicht weiter gefärbt, sodass das reine Gewebe ohne Fremdstoffe untersucht werden konnte. Es erfolgte keine Anfärbung des Gewebes, die eine Veränderung des Gewebes zur Folge haben und so möglicherweise einen verfälschenden Einfluss auf die Diagnostik nehmen könnte.

Dieses Verfahren hatte jedoch den Nachteil, dass sich die Orientierung in einem Gewebeschnitt ohne entsprechende Färbung erheblich schwieriger gestaltete als im entsprechenden HE-gefärbten Präparat.

Vorteile solcher „*label-free*“-Methoden sind, dass an der zu untersuchenden Probe keine Veränderung vorgenommen und somit die Probe unbehandelt untersucht werden kann (Chen *et al.*, 2017). Sogenannte „*Labelling*“-Artefakte, wie beispielsweise in der Fluoreszenz-Mikroskopie, werden vermieden (Alfonso-Garcia *et al.*, 2014). Außerdem erübrigt sich bei dieser Methode eine aufwendige Präparation des Gewebes (Butler *et al.*, 2016).

Der größte Nachteil hingegen ist, wie bereits genannt, die schwierigere Orientierung im Vergleich zu „*labelled*“ respektive mittels histologischen Färbemethoden veränderten Proben.

So wurden in dieser Arbeit beide Methoden kombiniert. Man orientierte sich an entsprechenden Charakteristika des HE-Präparats eines konsekutiven Schnittes und suchte eben diese Bereiche im ungefärbten Gewebeschnitt für die Raman-Spektroskopie auf (siehe Kapitel 2.2.7).

4.3.2.2 Zielvolumen der Raman-Spektroskopie

Das Zielvolumen wird durch gerätebedingte Installationen des jeweiligen Spektroskop-Aufbaus vorgegeben. In diesem Fall betrug das Zielvolumen des Raman-Spektroskops, mit dem die Messungen dieser Dissertation zugrundeliegender Studie durchgeführt wurden, zwei μm^3 .

Andere Arbeitsgruppen arbeiteten mit einem größeren Zielvolumen. In diesem Fall kann man homogenere Spektraldaten erwarten, denn Zellkompartimente oder Auffälligkeiten einzelner Zellen beeinflussen das Spektrum in einem schwächeren Ausmaß. Unter einem größeren Zielvolumen leidet jedoch die räumliche Auflösung.

Ziel dieser Arbeit war es, die spektroskopischen Eigenschaften des Gewebes in Relation zur Histopathologie zu ermitteln und einzelne Gewebeabschnitte zu charakterisieren. Es kann somit nicht mit der Raman-Spektroskopie von Einzelzellen verglichen werden.

Im Vergleich zu Arbeiten mit höheren Zielvolumina, weist die Vermessung von Gewebeschnitten mit kleinerem Zielvolumen per se eine gewisse Heterogenität auf, da je kleiner das Zielvolumen ist, desto unterschiedlichere Zellkompartimente können vermessen werden. So können bei kleinerem Zielvolumen zum Teil Zellkerne, Zytoplasma, andere Zellkompartimente oder Interzellularräume vermessen werden.

4.3.2.3 Einfluss des Messtages

Aufgrund der Anfälligkeit der Methodik der Raman-Spektroskopie für äußere Bedingungen, wie zum Beispiel Raumtemperatur oder Luftfeuchtigkeit, wurde mithilfe einer Hauptkomponentenanalyse in Abhängigkeit des Messtages durch das Raman-Spektroskop eine interne Qualitätskontrolle durchgeführt.

Eine Darstellung dieses Ergebnisses der Hauptkomponentenanalyse in Abhängigkeit des Messtages ergibt im *Scores-Plot* keine Clusterbildung in Abhängigkeit der einzelnen Messtage (siehe Abbildung 36). Dies spricht gegen einen Einfluss der äußeren Gegebenheiten des Messtages auf die Ergebnisse der Hauptkomponentenanalyse.

4.3.2.4 Eignung der Raman-Spektroskopie zur Differenzierung unterschiedlichen Gewebes

Dass es generell möglich ist, mit den Spektraldaten der Raman-Spektroskopie zwischen zwei unterschiedlichen Geweben zu differenzieren, belegen zahlreiche Studien.

In einer Studie, in welcher Plattenepithelkarzinome und Adenokarzinome des Gebärmutterhalses Gegenstand der Untersuchung waren, konnte mit einer Hauptkomponentenanalyse in Verbindung mit einer „*Support Vector Machine*“ zwischen diesen Karzinomen mithilfe der Spektraldaten aus der Raman-Spektroskopie differenziert werden (Zheng *et al.*, 2019).

Auch eine Unterscheidung zwischen maligne entartetem Plattenepithelgewebe der Stimmlippe und gesundem Stimmlippenepithel wurde bereits mehrfach beschrieben (Lau *et al.*, 2005; Teh *et al.*, 2009).

Darüber hinaus wurde die Raman-Spektroskopie bereits als ergänzendes Diagnostikinstrument während Endoskopien des Magens getestet und es besteht prinzipiell die Möglichkeit, in Echtzeit zwischen Karzinomen und gesundem Gewebe zu unterscheiden (Lin *et al.*, 2016).

Zudem können durch die Methode der Raman-Spektroskopie intraoperativ Resektionsränder beurteilt werden, um eine sichere Entfernung tumorösen oder dysplastisch veränderten Gewebes im Gesunden zu gewährleisten und damit einen Residualtumor zu verhindern, was eine deutlich bessere Prognose für den Patienten bedeuten würde (Mannelli *et al.*, 2019). Zu diesem Vorgehen gibt es aktuell jedoch nur eine Studie. Die Etablierung dieser Methodik steht noch am Anfang ihrer Entwicklung.

Die Unterscheidung zwischen unterschiedlichen Gewebetypen ist durch Spektraldaten der Raman-Spektroskopie möglich. Unbekanntes Gewebe durch Spektraldaten der Raman-Spektroskopie zu klassifizieren bedarf jedoch mehr prospektiver Studien, die bisher selten durchgeführt wurden.

4.3.2.5 Weitere Studiendesigns

Sämtliche Versuche, ohne Wasserimmersionsobjektiv und umgedrehten Objektträgern zu arbeiten, ergaben keine sinnvollen Ergebnisse, da eine geräteinterne Glaskorrektur im Raman-Spektroskop bereits vorinstalliert war.

Zudem wurde eine Versuchsreihe nicht weiterverfolgt, in der jeweils 50 Messpunkte mit dem Raman-Spektroskop pro Präparat gesetzt wurden.

In der Gruppe der leichtgradigen Dysplasien wurde dabei im unteren Drittel des Plattenepithels gemessen. Die Präparate der Gruppe der mäßiggradigen Dysplasien wurden in den unteren zwei Dritteln des Epithels, vornehmlich im mittleren Drittel, vermessen und in den Präparaten der Gruppe der schwergradigen Dysplasien wurden die Messpunkte über die gesamte Breite des Plattenepithel verteilt gesetzt, vornehmlich im oberen Drittel des Plattenepithels. Die Kontrollgruppe mit dem Plattenepithel aufgelagerten Keratosen wurde in dieser Versuchsreihe im Bereich bereits ausdifferenzierter Epithelzellen im mittleren Drittel des Plattenepithels vermessen, wohingegen bei Präparaten der Gruppe V in Bereichen des invasiven Karzinoms gemessen wurde, also, falls noch vorhanden, unterhalb der Basalmembran.

Eine Hauptkomponentenanalyse unter diesem Design ergab keine verwertbaren Ergebnisse, weshalb das Studiendesign so verändert wurde, dass jeweils dieselben Bereiche miteinander verglichen wurden (siehe Kapitel 2.2.7).

4.4 Diskussion der Ergebnisse der Datenanalyse mit multivariaten Methoden

4.4.1 Datenvorbereitung

Der Datensatz wurde auf den Wellenzahlenbereich zwischen 1800 und 500 cm^{-1} eingegrenzt. Dieser Wellenzahlenbereich ist hauptsächlich durch biologische Informationen gekennzeichnet (Movasaghi *et al.*, 2007; Talari *et al.*, 2015).

Ansätze außerhalb dieses Bereiches zu messen, um malignes und gesundes Gewebe voneinander zu unterscheiden (Holler *et al.*, 2017) wurden nicht durchgeführt, da das verwendete Raman-System speziell für Messungen in einem Wellenzahlenbereich zwischen 1800 und 500 cm^{-1} ausgelegt ist.

Darüber hinaus wurde eine Glättung der Daten mithilfe der Ableitung Savitzky-Golay durchgeführt, um Rauschen zu minimieren, wobei relative Höchst- und Kleinstwerte sowie Varianzen erhalten bleiben. Mit dieser Ableitung wurde die deutlichste Differenzierung der unterschiedlichen Gruppen erzielt. Auch andere Arbeitsgruppen verwendeten diesen Filter bereits zur Bearbeitung

der Rohdaten und einer Optimierung der Auswertung (Chen *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2018; Tangwen und Jiawen, 2017).

4.4.2 Analyse der Mittelwertspektren

Um einen groben Überblick über Unterschiede der verschiedenen Raman-Spektren zu erhalten, wurde eine Analyse der jeweiligen Mittelwertspektren durchgeführt.

Die Ergebnisse dieser Auswertung ergeben Unterschiede der Intensitäten der verschiedenen Mittelwertspektren an unterschiedlichen *peaks*.

Sowohl die Auswertung der Mittelwertspektren der Messpunkte in den basalen Epithelschichten als auch derer im mittleren Epitheldrittel weisen Intensitätsunterschiede an *peaks* auf, die mit Lipiden assoziiert werden, was mit dem veränderten Lipid-Metabolismus während der Karzinogenese in Zusammenhang stehen könnte (Long *et al.*, 2018).

Auch eine Abstufung der Intensitäten bei der Wellenzahl 1117 cm^{-1} (Glucose) von schwergradigen Dysplasien über invasive Plattenepithelkarzinome, die übrigen Dysplasiegrade, bis hin zum dysplasiefreien Plattenepithel deuten auf den veränderten Glucose-Stoffwechsel in maligne verändertem beziehungsweise dysplastischem Epithel hin (Shaw, 2006).

Mithilfe der Analyse der Mittelwertspektren können Intensitätsunterschiede an den Wellenzahlen 1328 cm^{-1} , 1084 cm^{-1} und 729 cm^{-1} festgestellt werden, die für Bestandteile der DNA kodieren. Diese können anhand der gedrängteren Anordnung der Epithelzellen mit höherer Proliferationsrate, einer Änderung der Kern-Zytoplasma-Relation zugunsten des Zellkerns sowie einer Vergrößerung desselben in dysplastisch oder maligne verändertem Gewebe erklärt werden.

Die Auswertung der Raman-Mittelwertspektren wird in verschiedenen Publikationen angewandt. Sie dient meist dem Zweck, einen groben Überblick zu schaffen. So werden zum Beispiel Wellenzahlen identifiziert, in denen sich die Spektren maßgeblich unterscheiden, um die gewonnenen Erkenntnisse dann in eine detailliertere Auswertung einfließen zu lassen (Jenkins *et al.*, 2016).

Li *et al.* untersuchten mithilfe der Raman-Spektroskopie gesundes und dysplastisches Gewebe sowie invasive Karzinome des oralen Plattenepithels. Dort ergaben sich nach Auswertung der Mittelwertspektren, ähnlich der

Ergebnisse dieser Dissertation zugrundeliegender Studie, Unterschiede der verschiedenen Gruppen an Wellenzahlen, die mit DNA und Proteinen assoziiert werden (Li *et al.*, 2017).

Eine Klassifizierung der Gewebeproben ausschließlich aufgrund des Mittelwertspektrums erfolgte nicht, weshalb weitere Auswertungsmethoden angewendet werden mussten.

4.4.3 Hauptkomponentenanalyse

4.4.3.1 Probenspezifität

Bei einer Hauptkomponentenanalyse in Abhängigkeit der einzelnen Gewebeproben bilden die verschiedenen Messungen der jeweiligen Präparate Gruppierungen. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Spektren innerhalb eines Präparats ähnliche spektrale Informationen aufweisen. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Spektraldaten probenspezifisch sind.

4.4.3.2 Klassifizierbarkeit der unterschiedlichen Studiengruppen

Die vorbereiteten Daten wurden mithilfe einer Hauptkomponentenanalyse in Abhängigkeit verschiedener Variablen auf eine Clusterbildung untersucht. Es wurde dabei versucht, die histologische Einteilung der Leukoplakien ohne Dysplasien, der leicht-, mäßig- und schwergradigen Dysplasiegrade und der invasiven Plattenepithelkarzinome nachzuvollziehen.

Bei den Messungen in den basalen Epithelschichten kann eine Clusterbildung in Abhängigkeit der ersten und zweiten Hauptkomponente der dysplasiefreien Präparate sowie der Präparate mit leicht- und mäßiggradigen Dysplasien dokumentiert werden.

Bei den Messpunkten im mittleren Epitheldrittel hingegen sind Clusterbildungen der dysplasiefreien Präparate und der Präparate mit leicht-, mäßig- und schwergradigen Dysplasien erkennbar.

Die invasiven Plattenepithelkarzinome bilden sowohl bei den Messungen in den basalen Epithelschichten als auch bei den Messungen im mittleren Epitheldrittel keine Cluster.

Mithilfe der Hauptkomponentenanalyse kann eine Klassifizierbarkeit durch Spektraldaten der Raman-Spektroskopie mit Messungen in den basalen Epithelschichten der dysplasiefreien Präparate und der Präparate mit leicht- und

mäßiggradigen Dysplasien, mit Messungen im mittleren Epitheldrittel zusätzlich der schwergradigen Dysplasien objektiviert werden.

Im *Scores-Plot* der Hauptkomponentenanalyse, ob Patienten ein invasives Plattenepithelkarzinom entwickelten oder nicht, kann keine Clusterbildung festgestellt werden.

Diese Methodik allein lässt also keine Rückschlüsse auf die Prognose der jeweiligen Patienten mit dysplastisch verändertem Stimmlippenepithel zu.

Die Wellenzahlen die einen statistischen Einfluss auf die Auftrennung dieser Hauptkomponentenanalyse waren, lassen auf eine Veränderung des Metabolismus der Epithelzellen (Lipid-Stoffwechsel, Veränderung des Kohlenhydrat-Haushaltes, Proteinbiosynthesen) und eine andere Zusammensetzung von Bestandteilen der DNA schließen (vergleiche auch Kapitel 4.4.2).

Am unteren Rand der graphischen Auswertung der *Scores-Plots* in Abhängigkeit der histologischen Diagnose der basalen Messpunkte und der Messpunkte im mittleren Epitheldrittel kumulieren einige Präparate (siehe Abbildung 25 und Abbildung 38).

Um herauszufinden, warum sich diese Gruppe am unteren Rand des Schaubildes absondert, wurde mittels klinischer Parameter und den Daten der Aufbereitung oder Messungen am Raman-Spektroskop versucht, eine Auftrennung eben dieser Gruppe zu erreichen und eventuelle Fehler am Mess- oder Aufbereitungstag der verschiedenen Gewebeschnitte festzustellen.

Eine genaue Differenzierung der für die Abspaltung der Gruppierung am unteren Rand des Schaubildes verantwortlichen Parameter zeigte sich nicht.

Bei der Hauptkomponentenanalyse der Messpunkte im mittleren Epitheldrittel kann außerdem beim Vergleich der zweiten und vierten Hauptkomponente eine signifikante Clusterbildung in Abhängigkeit des Dysplasiegrades beobachtet werden. Die für die Auftrennung statistisch relevanten Wellenzahlen, die in den *Loading-Plots* dargestellt werden, sind charakteristisch für Bestandteile der DNA. Dies kann damit begründet werden, dass sich die histologische Einteilung der Dysplasiegrade darauf bezieht, bis in welches Epitheldrittel dysplastische Veränderungen diagnostiziert werden. So wurden bei leichtgradigen Dysplasien

bei Messungen im mittleren Epitheldrittel Abschnitte vermessen, die keine vermehrten Zellteilungen und somit keinen erhöhten Anteil an DNA aufwiesen. Bei mäßiggradigen Dysplasien konnte *per definitionem* in Abschnitten mit oder ohne erhöhte mitotische Aktivität gemessen worden sein, je nachdem wie weit die dysplastische Veränderung in Richtung luminal fortgeschritten war. Hingegen wurde bei schwergradigen Dysplasien in allen Fällen in einem Abschnitt gemessen, in welchem vermehrt Zellteilungen stattgefunden haben.

Mithilfe der Hauptkomponentenanalyse ist es alles in allem möglich, die Studiengruppen des dysplasiefreien Plattenepithels sowie der leicht-, mäßig- und schwergradigen Dysplasien, nicht jedoch die Gruppe der invasiven Plattenepithelkarzinome zu klassifizieren.

4.4.3.3 Eignung der Hauptkomponentenanalyse zur Klassifikation von mehr als zwei Gruppen

Mithilfe einer Hauptkomponentenanalyse zwischen nur zwei unterschiedlichen Geweben zu differenzieren ist statistisch leichter als zwischen drei oder mehr Untersuchungsgruppen zu diskriminieren, wie in der dieser Dissertation zugrundeliegenden Studie versucht wurde (siehe auch Kapitel 4.3.2.4).

Eine Studie von Li *et al.* evaluierte die Differenzierung der unterschiedlichen Dysplasiegrade des oralen Plattenepithels mittels Daten aus der Raman-Spektroskopie. Es wurde die Differenzierungsmöglichkeit von drei unterschiedlichen Gruppen untersucht. Es konnte dabei sehr gut zwischen einem oralen Plattenepithelkarzinom und leicht- sowie schwergradigen Dysplasien des Plattenepithels unterschieden werden (Li *et al.*, 2017). Die Forschungsgruppe um Li *et al.* konnte mittels der eingesetzten Methodik jedoch nicht zwischen den einzelnen Dysplasiegraden untereinander unterscheiden.

Mathematisch stellt die Unterscheidung zwischen fünf Gruppen ein schwierigeres Problem dar, als die Unterscheidung zwischen zwei Gruppen. Statistisch für fünf Gruppen Besonderheiten zu finden, an denen eine sichere Zuordnung zu einer Gruppe möglich ist, beschreibt somit eine größere Herausforderung.

Es besteht weiterhin ein Forschungsbedarf hinsichtlich der Differenzierung von mehr als zwei Untersuchungsgruppen, wie zum Beispiel von leicht-, mäßig- und schwergradigen Dysplasien.

Eine Lösungsstrategie kann die Zuhilfenahme weiterer Auswertungsmethoden wie ein hierarchisches Clustermodell sein, um deutlichere Ergebnisse in der Differenzierung von mehr als zwei Untersuchungsgruppen zu erzielen.

4.4.4 Lineare Diskriminanzanalyse

4.4.4.1 Klassifizierbarkeit der unterschiedlichen Studiengruppen

Es wurde nach der Auswertung der Hauptkomponentenanalyse versucht, mithilfe einer linearen Diskriminanzanalyse zwischen den verschiedenen Studiengruppen zu unterscheiden.

Mit dieser Methodik können signifikante Ergebnisse erzielt werden. Die verschiedenen Dysplasiegrade, Keratosen und invasiven Karzinome können der richtigen histologischen Diagnose mit hoher Sensitivität und Spezifität zugeordnet werden.

Im ersten Modell wurde die LDA mit den Mittelwertspektren jeder Probe, basierend auf der ersten bis zur siebten Hauptkomponente, durchgeführt.

Mit dem Verwenden der Mittelwertspektren gehen durch die Reduzierung des Datensatzes zwar einige Daten verloren, dies trägt allerdings zu einer Homogenisierung des Datensatzes bei. Durch die Reduktion der Datensätze von mehreren Einzelspektren auf ein Mittelwertspektrum wird dieses Modell vereinfacht und dadurch weniger fehleranfällig. Die Bildung von Kovarianzen wird reduziert.

Das zweite LDA-Modell kann in allen Analysen deutlichere Werte erzielen. In diesem Modell wurden alle Einzelspektren der Proben berücksichtigt.

Konkret finden sich sehr gute Differenzierungen zwischen invasiven Karzinomen und allen anderen Studiengruppen (dysplasiefreies, leicht-, mäßig- und schwergradig dysplastisch verändertes Stimmlippenepithel).

Durch die Verwendung aller Einzelspektren fließen mehr Informationen in das Modell ein als in das erste Modell. Dies führt zu einem aussagekräftigeren Modell aufgrund des größeren Datensatzes. Jedoch zeichnet sich dieses Modell durch eine höhere Fehleranfälligkeit aus. Durch die Verwendung von mehr Daten können hier auch Kovarianzen dazu führen, dass die verschiedenen Gruppen klassifizierbar sind.

Die Klassifikation der verschiedenen Studiengruppen mithilfe einer linearen Diskriminanzanalyse wurde erfolgreich evaluiert.

Alles in allem beruhen die mathematischen Modelle der linearen Diskriminanzanalyse jedoch auf einem retrospektiven Datensatz, der noch mit prospektiven Studien zu validieren ist.

4.4.4.2 Identifikation von Patienten mit Progression zu einem invasiven Karzinom

Es konnte mit relativ hoher Sicherheit, aufgrund der aus der Raman-Spektroskopie gewonnenen Informationen, festgestellt werden, ob die dysplastische oder keratotische Veränderung des Plattenepithels im 5-Jahres-*follow-up* maligne entartet und sich zu einem invasiven Plattenepithelkarzinom entwickelt.

Dieser Zusammenhang konnte bislang aufgrund histologischer Einteilung nur unzureichend hergestellt werden.

Mit einer Genauigkeit von ungefähr 94 % kann mithilfe der linearen Diskriminanzanalyse in Modell 2 prognostiziert werden, ob der Patient später an einem invasiven Plattenepithelkarzinom erkrankt. Wenn sich dies in weiteren Versuchen bestätigt, könnten sich Konsequenzen für die Therapie ergeben. So könnte beispielsweise durch Informationen aus der Raman-Spektroskopie als gefährlich eingestuftes dysplastisches oder keratotisch verändertes Stimmlippengewebe früher oder großzügiger reseziert werden.

Patienten mit diagnostiziertem pathologisch verändertem Stimmlippengewebe, das Tendenz zur Entartung aufweist, könnten in ein engmaschigeres Nachsorge-System eingepflegt werden. Dies könnte durch diese Methode identifizierten Risikopatienten helfen, mögliche Entartungen zu einem invasiven Plattenepithelkarzinom zu verhindern oder zumindest frühzeitig zu erkennen.

Anhand der Daten aus der Raman-Spektroskopie kann versucht werden, die dysplastischen Veränderungen nach dem Risiko der Entwicklung eines invasiven Plattenepithelkarzinoms im Verlauf zu klassifizieren.

Grundsätzlich kann mithilfe der Klassifizierung mit Spektraldaten aus der Raman-Spektroskopie eine Verbesserung der gegenwärtigen histopathologischen

Klassifizierung erzielt werden und Patienten mit einer schlechten Prognose können besser identifiziert werden.

4.5 Ausblick

Die Raman-Spektroskopie wird in Zukunft *in vivo* großes Potential haben, als diagnostisches Mittel Verwendung zu finden, auch wenn in der Entwicklung und Optimierung entsprechender klinisch einsetzbarer Instrumente noch erhebliche Entwicklungsarbeit zu leisten sein wird (Hanlon *et al.*, 2000).

Vorteil dieser nicht invasiven Methode ist die gewebeschonende Vorgehensweise (Hughes *et al.*, 2010), welcher bei Resektionen im Bereich der Stimmlippen zum Erhalt der Stimmqualität enorme Bedeutung zukommt.

Um die Anwendung der Raman-Spektroskopie erfolgreich in die klinische Arbeit zu integrieren, müsste ein standardisiertes Setup der Messungen etabliert werden. Es muss sichergestellt sein, dass die Spektraldaten nur biologische Informationen des Gewebes widerspiegeln.

Darüber hinaus müssen entsprechende Messstellen mit der klassischen Histologie korreliert werden, um das Vermessen des richtigen Areals im Gewebe zu garantieren, damit eben dysplastische Veränderungen oder maligne entartete Veränderungen des Epithels vermessen werden.

Bisher liegen nur wenige Studien vor, die Spektraldaten der Raman-Spektroskopie mit klinischen Aspekten korrelieren.

Hierzu bedarf es noch prospektiver Studien, klinischer Testung und Evaluation des Verfahrens, um den Erhalt von Mehrinformation gegenüber histopathologischen Methoden sicherzustellen. Nicht zuletzt, um den erhöhten Kosten- und Zeitaufwand der Methode zu rechtfertigen.

5. Zusammenfassung

Leukoplakien der Stimmlippe können verschiedene histopathologische Diagnosen wie beispielsweise Hyper- oder Parakeratosen, dysplastische Prozesse oder invasive Karzinome des Epithels zugrunde liegen.

Bisher werden klinisch detektierte Leukoplakien nach Probeexzision und histologischer Aufarbeitung anhand verschiedener histomorphologischer Klassifikationssysteme, wie zum Beispiel dem System der WHO oder dem „*Ljubljana classification*“-System, eingeordnet.

Hinsichtlich der Aussagekraft in Bezug auf die Prognose einer Entwicklung eines invasiven Plattenepithelkarzinoms sind die genannten Systeme jedoch eingeschränkt.

In der Raman-Spektroskopie wird das zu untersuchende Gewebe mit einem Laser bestrahlt. Die beim Durchdringen des Materials entstehende Raman-Streuung ist charakteristisch für verschiedene Moleküle und Bindungen. So kann mithilfe dieser Methodik auf die molekularbiologische Zusammensetzung des Gewebes geschlossen werden.

In dieser Arbeit wurde die Klassifikation verschiedener Dysplasiegrade des Stimmlippenepithels mittels Spektraldaten aus der Raman-Spektroskopie nachvollzogen und erörtert, ob aus den gewonnenen Informationen auf das Risiko der Entstehung eines invasiven Plattenepithelkarzinoms geschlossen werden kann.

Durch den Vergleich der Mittelwertspektren dysplasiefreier, dysplastischer und maligne entarteter Gewebeproben sowie der Methodik einer Hauptkomponentenanalyse kann auf eine unterschiedliche Zusammensetzung der Studiengruppen an Bestandteilen der DNA, Proteine, Lipide und Kohlenhydrate geschlossen werden.

Unter Verwendung einer linearen Diskriminanzanalyse wurden Modelle erstellt, um die Klassifizierbarkeit der verschiedenen Studiengruppen nachzuvollziehen. Außerdem wurden die Modelle auf die Aussagekraft einer Prognose hinsichtlich einer möglichen Karzinomentwicklung überprüft.

Durch diese Modelle können gute Differenzbarkeiten durch die Spektraldaten der einzelnen Studiengruppen untereinander erreicht werden

(Genauigkeit 65 - 100 %). Zudem kann mit hoher Spezifität (77 %, 95 %), Sensitivität (58 %, 98 %) und Genauigkeit (69 %, 94 %) prognostiziert werden, ob sich beim jeweiligen Patienten ein invasives Plattenepithelkarzinom der Stimmlippe entwickeln wird.

Um die erlangten Erkenntnisse zu validieren und das Verfahren in den klinischen Alltag zu integrieren, bedarf es jedoch prospektiver Studien.

6. Verzeichnisse

6.1 Literaturverzeichnis

Addicks, K., Knoche, H., Themann, H. und Müller, K. H. (2013). **Histologie und Histopathologie: Kurzlehrbuch für medizinisch-technische Assistenten**, Springer Berlin Heidelberg.

Alfonso-Garcia, A., Mittal, R., Lee, E. S. und Potma, E. O. (2014). **Biological imaging with coherent Raman scattering microscopy: a tutorial**. *Journal of Biomedical Optics* 19, 1-14, 14.

Altmeyer, P., Buhles, N. und Bacharach-Buhles, M. (2002). **Springer-Enzyklopädie Dermatologie, Allergologie, Umweltmedizin: mit 566 Tabellen**, Springer.

Antoniv, V. F., Popaduyk, V. I. und Antoniv, T. V. (2017). **[Ionizing radiation and laryngeal cancer]**. *Vestn Otorinolaringol* 82, 19-23, doi: 10.17116/otorino201782219-23.

Arendt, M., Blome, H., Bonk, L., Beth-Hübner, M., Demers, F., Duell, M., Gabriel, S., Guldner, K., Karsten, H., Kretschmann, U., Leven, A., Mattenklott, M., Münch, J., Rottmann, J., Schmidt, I. und Schneider, J. (2013). **Faserjahre (BK-Report 1/2013)**, Deutsche Gesetzliche Unfallversicherung (DGUV), Berlin.

Barnes, L., Eveson, J., Reichart, P. und Sidransky, D. (2005). **Pathology and genetics of head and neck tumours**, IARC Press, Lyon.

Bechtelsheimer, H., Bohle, A., Dhom, G., Eder, M., Fischer, R., Gedigk, P., Hedinger, C., Helpap, B., Hort, W. und Lennert, K. (2013). **Lehrbuch der allgemeinen Pathologie und der pathologischen Anatomie**, Springer Berlin Heidelberg.

Blackwell, K. E., Fu, Y.-S. und Calcaterra, T. C. (1995). **Laryngeal dysplasia. A clinicopathologic study**. *Cancer* 75, 457-463, doi: 10.1002/1097-0142(19950115)75:2<457::Aid-cnrcr2820750208>3.0.Co;2-9.

Böcker, W. und Aguzzi, A. (2008). **Pathologie**, Elsevier, Urban & Fischer, München [u.a.].

- Bonhin, R. G., Carvalho, G. M., Guimaraes, A. C., Chone, C. T., Crespo, A. N., Altemani, A. M. und Amstalden, E. M. (2014). **Histologic correlation of expression of Ki-67 in squamous cell carcinoma of the glottis according to the degree of cell differentiation.** *Braz J Otorhinolaryngol* 80, 290-295, doi: 10.1016/j.bjorl.2014.05.016.
- Bosman, F. T. (2001). **Dysplasia classification: pathology in disgrace?** *The Journal of Pathology* 194, 143-144, doi: 10.1002/1096-9896(200106)194:2<143::Aid-path883>3.0.Co;2-z.
- Bouquot, J. E. und Gnepp, D. R. (1991). **Laryngeal precancer: a review of the literature, commentary, and comparison with oral leukoplakia.** *Head Neck* 13, 488-497.
- Brierley, J. D., Gospodarowicz, M. K. und Wittekind, C. (2016). **TNM Classification of Malignant Tumours**, Wiley.
- Butler, H. J., Ashton, L., Bird, B., Cinque, G., Curtis, K., Dorney, J., Esmonde-White, K., Fullwood, N. J., Gardner, B., Martin-Hirsch, P. L., Walsh, M. J., McAinsh, M. R., Stone, N. und Martin, F. L. (2016). **Using Raman spectroscopy to characterize biological materials.** *Nat Protoc* 11, 664-687, doi: 10.1038/nprot.2016.036.
- Cals, F. L., Koljenovic, S., Hardillo, J. A., Baatenburg de Jong, R. J., Bakker Schut, T. C. und Puppels, G. J. (2016). **Development and validation of Raman spectroscopic classification models to discriminate tongue squamous cell carcinoma from non-tumorous tissue.** *Oral Oncol* 60, 41-47, doi: 10.1016/j.oraloncology.2016.06.012.
- Cals, F. L. J., Bakker Schut, T. C., Caspers, P. J., Baatenburg de Jong, R. J., Koljenovic, S. und Puppels, G. J. (2018). **Raman spectroscopic analysis of the molecular composition of oral cavity squamous cell carcinoma and healthy tongue tissue.** *Analyst* 143, 4090-4102, doi: 10.1039/c7an02106b.
- Cardiff, R. D., Miller, C. H. und Munn, R. J. (2014). **Manual hematoxylin and eosin staining of mouse tissue sections.** *Cold Spring Harb Protoc* 2014, 655-658, doi: 10.1101/pdb.prot073411.
- Chalmers, J. und Griffiths, P. (2002). **Handbook of Vibrational Spectroscopy, 5 volumes set**, Wiley.

- Chan, J. K. C. (2014). **The Wonderful Colors of the Hematoxylin–Eosin Stain in Diagnostic Surgical Pathology**. *International Journal of Surgical Pathology* 22, 12-32, doi: 10.1177/1066896913517939.
- Chen, J. und Long, S. (2014). **Tea and coffee consumption and risk of laryngeal cancer: a systematic review meta-analysis**. *PLoS One* 9, e112006, doi: 10.1371/journal.pone.0112006.
- Chen, K., Zhang, H., Wei, H. und Li, Y. (2014). **Improved Savitzky-Golay-method-based fluorescence subtraction algorithm for rapid recovery of Raman spectra**. *Appl Opt* 53, 5559-5569, doi: 10.1364/ao.53.005559.
- Chen, X., Liu, Y., Huang, J., Liu, W., Huang, J., Zhang, Y. und Fu, W. (2017). **Label-free techniques for laboratory medicine applications**. *Frontiers in Laboratory Medicine* 1, 82-85, doi: <https://doi.org/10.1016/j.flm.2017.06.003>.
- Coca-Pelaz, A., Rodrigo, J. P., Takes, R. P., Silver, C. E., Paccagnella, D., Rinaldo, A., Hinni, M. L. und Ferlito, A. (2013). **Relationship between reflux and laryngeal cancer**. *Head Neck* 35, 1814-1818, doi: 10.1002/hed.23208.
- Colthup, N. (2012). **Introduction to infrared and Raman spectroscopy**, Elsevier.
- Crow, P., Stone, N., Kendall, C. A., Uff, J. S., Farmer, J. A. M., Barr, H. und Wright, M. P. J. (2003). **The use of Raman spectroscopy to identify and grade prostatic adenocarcinoma in vitro**. *British Journal Of Cancer* 89, 106, doi: 10.1038/sj.bjc.6601059.
- Cuchi, A., Bombi, J. A., Avellaneda, R., Cardesa, A. und Traserra, J. (1994). **Precancerous lesions of the larynx: clinical and pathologic correlations and prognostic aspects**. *Head Neck* 16, 545-549.
- Darier, F.-J. (1923). **Précis de Dermatologie**, Masson & Co, Paris.
- Depciuch, J., Kaznowska, E., Szmuc, K., Zawlik, I., Cholewa, M., Heraud, P. und Cebulski, J. (2016). **Comparing paraffined and deparaffinized breast cancer tissue samples and an analysis of Raman spectroscopy and infrared methods**. *Infrared Physics & Technology* 76, 217-226, doi: <https://doi.org/10.1016/j.infrared.2016.02.006>.

- Devpura, S., Thakur, J. S., Poulik, J. M., Rabah, R., Naik, V. M. und Naik, R. (2013). **Raman spectroscopic investigation of frozen and deparaffinized tissue sections of pediatric tumors: neuroblastoma and ganglioneuroma.** *Journal of Raman Spectroscopy* 44, 370-376, doi: 10.1002/jrs.4223.
- Devpura, S., Thakur, J. S., Sarkar, F. H., Sakr, W. A., Naik, V. M. und Naik, R. (2010). **Detection of benign epithelia, prostatic intraepithelial neoplasia, and cancer regions in radical prostatectomy tissues using Raman spectroscopy.** *Vibrational Spectroscopy* 53, 227-232, doi: <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2010.03.009>.
- Dudenredaktion (2015). **Duden - Deutsches Universalwörterbuch,** Dudenverlag.
- Ellis, D. I. und Goodacre, R. (2006). **Metabolic fingerprinting in disease diagnosis: biomedical applications of infrared and Raman spectroscopy.** *Analyst* 131, 875-885.
- Faolain, E. O., Hunter, M. B., Byrne, J. M., Kelehan, P., Lambkin, H. A., Byrne, H. J. und Lyng, F. M. (2005). **Raman spectroscopic evaluation of efficacy of current paraffin wax section dewaxing agents.** *J Histochem Cytochem* 53, 121-129, doi: 10.1177/002215540505300114.
- Feldman, A. T. und Wolfe, D. (2014). **Tissue processing and hematoxylin and eosin staining.** *Methods Mol Biol* 1180, 31-43, doi: 10.1007/978-1-4939-1050-2_3.
- Gale, N., Blagus, R., El-Mofty, S. K., Helliwell, T., Prasad, M. L., Sandison, A., Volavšek, M., Wenig, B. M., Zidar, N. und Cardesa, A. (2014). **Evaluation of a new grading system for laryngeal squamous intraepithelial lesions—a proposed unified classification.** *Histopathology* 65, 456-464, doi: doi:10.1111/his.12427.
- Galli, R., Uckermann, O., Koch, E., Schackert, G., Kirsch, M. und Steiner, G. (2014). **Effects of tissue fixation on coherent anti-Stokes Raman scattering images of brain.** *J Biomed Opt* 19, 071402, doi: 10.1117/1.Jbo.19.7.071402.
- Gheit, T., Abedi-Ardekani, B., Carreira, C., Missad, C. G., Tommasino, M. und Torrente, M. C. (2014). **Comprehensive analysis of HPV expression in laryngeal squamous cell carcinoma.** *J Med Virol* 86, 642-646, doi: 10.1002/jmv.23866.

- Gilson, T. R. und Hendra, P. J. (1970). **Laser Raman spectroscopy**, Wiley-Interscience, London [u.a.].
- Grasl, M. C., Neuwirth-Riedl, K., Vutuc, C., Horak, F., Vorbeck, F. und Banyai, M. (1990). **Risk of vocal chord dysplasia in relation to smoking, alcohol intake and occupation**. *Eur J Epidemiol* 6, 45-48.
- Gremlich, H.-U. und Yan, B. (2000). **Infrared and Raman spectroscopy of biological materials**, CRC Press.
- Hanlon, E., Manoharan, R., Koo, T. W., Shafer, K., Motz, J., Fitzmaurice, M., Kramer, J., Itzkan, I., Dasari, R. und Feld, M. (2000). **Prospects for in vivo Raman spectroscopy**. *Physics in Medicine & Biology* 45, R1.
- Hellquist, Cardesa, Gale, Kambic und Michaels (1999). **Criteria for grading in the Ljubljana classification of epithelial hyperplastic laryngeal lesions. A study by members of the Working Group on Epithelial Hyperplastic Laryngeal Lesions of the European Society of Pathology**. *Histopathology* 34, 226-233, doi: doi:10.1046/j.1365-2559.1999.00581.x.
- Hellquist, H., Lundgren, J. und Olofsson, J. (1982). **Hyperplasia, keratosis, dysplasia and carcinoma in situ of the vocal cords--a follow-up study**. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 7, 11-27.
- Hellquist, H., Olofsson, J. und Grontoft, O. (1981). **Carcinoma in situ and severe dysplasia of the vocal cords. A clinicopathological and photometric investigation**. *Acta Otolaryngol* 92, 543-555, doi: 10.3109/00016488109133294.
- Hirano, M., Kiyokawa, K., Kurita, S. und Sato, K. (1986). **Posterior Glottis: Morphological Study in Excised Human Larynges**. *Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology* 95, 576-581, doi: 10.1177/000348948609500607.
- Hoesli, R. C., Orringer, D. A., McHugh, J. B. und Spector, M. E. (2017). **Coherent Raman Scattering Microscopy for Evaluation of Head and Neck Carcinoma**. *Otolaryngol Head Neck Surg* 157, 448-453, doi: 10.1177/0194599817700388.
- Højslet, P.-E., Nielsen, V. M. und Palvio, D. (1989). **Premalignant lesions of the larynx A follow-up study**. *Acta oto-laryngologica* 107, 150-155.

- Holler, S., Mansley, E., Mazzeo, C., Donovan, M. J., Sobrero, M. und Miles, B. A. (2017). **Raman Spectroscopy of Head and Neck Cancer: Separation of Malignant and Healthy Tissue Using Signatures Outside the "Fingerprint" Region.** *Biosensors (Basel)* 7, doi: 10.3390/bios7020020.
- Huang, J., Shi, T., Gong, B., Li, X., Liao, G. und Tang, Z. (2018). **Fitting an Optical Fiber Background with a Weighted Savitzky-Golay Smoothing Filter for Raman Spectroscopy.** *Appl Spectrosc* 72, 1632-1644, doi: 10.1177/0003702818785884.
- Huang, Z., McWilliams, A., Lam, S., English, J., McLean, D. I., Lui, H. und Zeng, H. (2003). **Effect of formalin fixation on the near-infrared Raman spectroscopy of normal and cancerous human bronchial tissues.** *Int J Oncol* 23, 649-655.
- Hughes, O. R., Stone, N., Kraft, M., Arens, C. und Birchall, M. A. (2010). **Optical and molecular techniques to identify tumor margins within the larynx.** *Head & Neck* 32, 1544-1553, doi: 10.1002/hed.21321.
- Ibrahim, O., Maguire, A., Meade, A., Flint, S., Toner, M., Byrne, H. und Lyng, F. (2017). **Improved protocols for pre-processing Raman spectra of formalin fixed paraffin preserved tissue sections.** *Analytical Methods* 9, 4709-4717.
- Ilin, Y., Choi, J. S., Harley, B. A. C. und Kraft, M. L. (2015). **Identifying States along the Hematopoietic Stem Cell Differentiation Hierarchy with Single Cell Specificity via Raman Spectroscopy.** *Analytical Chemistry* 87, 11317-11324, doi: 10.1021/acs.analchem.5b02537.
- Isenberg, J. S., Crozier, D. L. und Dailey, S. H. (2008). **Institutional and Comprehensive Review of Laryngeal Leukoplakia.** *Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology* 117, 74-79, doi: 10.1177/000348940811700114.
- Jabarin, B., Pitaro, J., Marom, T. und Muallem-Kalmovich, L. (2018). **Dysplastic Changes in Patients with Recurrent Laryngeal Leukoplakia: Importance of Long-Term Follow-Up.** *Isr Med Assoc J* 20, 623-626.
- Jenkins, C. A., Lewis, P. D., Dunstan, P. R. und Harris, D. A. (2016). **Role of Raman spectroscopy and surface enhanced Raman spectroscopy in colorectal cancer.** *World journal of gastrointestinal oncology* 8, 427-438, doi: 10.4251/wjgo.v8.i5.427.

- Karatayli-Ozgursoy, S., Pacheco-Lopez, P., Hillel, A. T., Best, S. R., Bishop, J. A. und Akst, L. M. (2015). **Laryngeal dysplasia, demographics, and treatment: a single-institution, 20-year review**. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg* 141, 313-318, doi: 10.1001/jamaoto.2014.3736.
- Kempf, W., Hantschke, M., Kutzner, H. und Burgdorf, W. (2015). **Dermatopathologie**, Springer Berlin Heidelberg.
- Kneipp, K., Moskovits, M. und Kneipp, H. (2007). **Surface-enhanced Raman scattering**. *Physics Today* 60, 40.
- Kramer, I. R., Lucas, R. B., Pindborg, J. J. und Sobin, L. H. (1978). **Definition of leukoplakia and related lesions: an aid to studies on oral precancer**. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 46, 518-539.
- Krishna, C. M., Sockalingum, G. D., Venteo, L., Bhat, R. A., Kushtagi, P., Pluot, M. und Manfait, M. (2005). **Evaluation of the suitability of ex vivo handled ovarian tissues for optical diagnosis by Raman microspectroscopy**. *Biopolymers* 79, 269-276, doi: 10.1002/bip.20346.
- Kujumzelis, T. G. (1935). **Raman-Spektren von Gläsern**. *Zeitschrift für Physik* 97, 561-569, doi: 10.1007/bf01333898.
- Lau, D. P., Huang, Z., Lui, H., Anderson, D. W., Berean, K., Morrison, M. D., Shen, L. und Zeng, H. (2005). **Raman spectroscopy for optical diagnosis in the larynx: preliminary findings**. *Lasers Surg Med* 37, 192-200, doi: 10.1002/lsm.20226.
- Leitlinienprogramm Onkologie, Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe und AWMF (2018). **Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Larynxkarzinoms**. URL: <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/larynxkarzinom/> [Stand:03.09.2018].
- Li, B., Gu, Z. Y., Yan, K. X., Wen, Z. N., Zhao, Z. H., Li, L. J. und Li, Y. (2017). **Evaluating oral epithelial dysplasia classification system by near-infrared Raman spectroscopy**. *Oncotarget* 8, 76257-76265, doi: 10.18632/oncotarget.19343.
- Li, X., Gao, L., Li, H., Gao, J., Yang, Y., Zhou, F., Gao, C., Li, M. und Jin, Q. (2013). **Human papillomavirus infection and laryngeal cancer risk: a systematic review and meta-analysis**. *J Infect Dis* 207, 479-488, doi: 10.1093/infdis/jis698.

- Lin, K., Zheng, W., Lim, C. M. und Huang, Z. (2016). **Real-time in vivo diagnosis of laryngeal carcinoma with rapid fiber-optic Raman spectroscopy**. *Biomed Opt Express* 7, 3705-3715, doi: 10.1364/boe.7.003705.
- Loader, J. (1970). **Basic laser Raman spectroscopy**, Heyden, London.
- Long, J., Zhang, C.-J., Zhu, N., Du, K., Yin, Y.-F., Tan, X., Liao, D.-F. und Qin, L. (2018). **Lipid metabolism and carcinogenesis, cancer development**. *American journal of cancer research* 8, 778.
- Lüllmann-Rauch, R. (2012). **Taschenlehrbuch Histologie**, Thieme, Stuttgart [u.a.].
- Magalhaes, F. L., Machado, A. M. C., Paulino, E., Sahoo, S. K., de Paula, A. M., Garcia, A. M., Barman, I., Soares, J. S. und Mamede, M. (2018). **Raman spectroscopy with a 1064-nm wavelength laser as a potential molecular tool for prostate cancer diagnosis: a pilot study**. *J Biomed Opt* 23, 1-6, doi: 10.1117/1.Jbo.23.12.121613.
- Mallis, A., Jelastopulu, E., Mastronikolis, N. S., Naxakis, S. S., Kourousis, C. und Papadas, T. A. (2011). **Laryngeal cancer and passive smoking: the neglected factor?** *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology* 268, 727-731, doi: 10.1007/s00405-010-1403-z.
- Mannelli, G., Comini, L. V. und Piazza, C. (2019). **Surgical margins in oral squamous cell cancer: intraoperative evaluation and prognostic impact**. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 27, 98-103, doi: 10.1097/moo.0000000000000516.
- McLaren, K. M., Burnett, R. A., Goodlad, J. R., Howatson, S. R., Lang, S., Lee, F. D., Lessells, A. M., Ogston, S., Robertson, A. J., Simpson, J. G., Smith, G. D., Tavadia, H. B. und Walker, F. (2000). **Consistency of histopathological reporting of laryngeal dysplasia. The Scottish Pathology Consistency Group**. *Histopathology* 37, 460-463.
- Meade, A. D., Clarke, C., Draux, F., Sockalingum, G. D., Manfait, M., Lyng, F. M. und Byrne, H. J. (2010). **Studies of chemical fixation effects in human cell lines using Raman microspectroscopy**. *Anal Bioanal Chem* 396, 1781-1791, doi: 10.1007/s00216-009-3411-7.

- Moerth, A. (2017). **Raman-Spektroskopie zur nicht invasiven Analyse von gesundem, dysplastischem und tumorösem Gewebe der Stimmlippen**. Bachelorarbeit, Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
- Montgomery, J. und White, A. (2012). **A decade of laryngeal dysplasia in Paisley, Scotland**. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 269, 947-951, doi: 10.1007/s00405-011-1684-x.
- Movasaghi, Z., Rehman, S. und Rehman, I. U. (2007). **Raman Spectroscopy of Biological Tissues**. *Applied Spectroscopy Reviews* 42, 493-541, doi: 10.1080/05704920701551530.
- Müller, K.-M. und Krohn, B. R. (1980). **Smoking habits and their relationship to precancerous lesions of the larynx**. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 96, 211-217, doi: 10.1007/bf00405505.
- Naggar, A. K. e.-., Chan, J. K. C. und Grandis, J. R. (2017). **WHO classification of head and neck tumours**, International Agency for Research on Cancer, Lyon.
- Nakano, T. (1998). **Intermediate epithelium**. *Kaibogaku Zasshi* 73, 87-92.
- Namyslowski, G., Scierski, W., Nozynski, J. K. und Zembala-Nozynska, E. (2004). **Morphometric characteristics of cell nuclei of the precancerous lesions and laryngeal cancer**. *Med Sci Monit* 10, Cr241-245.
- Nielsen, V. M., Højslet, P. und Palvio, D. (1986). **Reinke's oedema: a premalignant condition?** *The Journal of Laryngology & Otology* 100, 1159-1162.
- O'Dea, D., Bongiovanni, M., Sykiotis, G. P., Ziros, P. G., Meade, A. D., Lyng, F. M. und Malkin, A. (2018). **Raman spectroscopy for the preoperative diagnosis of thyroid cancer and its subtypes: An in vitro proof-of-concept study**. *Cytopathology*, doi: 10.1111/cyt.12636.
- Pantel, M. und Guntinas-Lichius, O. (2012). **Larynxkarzinom**. *HNO* 60, 32-40, doi: 10.1007/s00106-011-2423-8.

- Peller, M., Katalinic, A., Wollenberg, B., Teudt, I. U. und Meyer, J.-E. (2016). **Epidemiology of laryngeal carcinoma in Germany, 1998–2011.** *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology* 273, 1481-1487, doi: 10.1007/s00405-016-3922-8.
- Plch, J., Par, I., Navratilova, I., Blahova, M. und Zavadil, M. (1998). **Long term follow-up study of laryngeal precancer.** *Auris Nasus Larynx* 25, 407-412.
- Podshyvalov, A., Sahu, R. K., Mark, S., Kantarovich, K., Guterman, H., Goldstein, J., Jagannathan, R., Argov, S. und Mordechai, S. (2005). **Distinction of cervical cancer biopsies by use of infrared microspectroscopy and probabilistic neural networks.** *Appl Opt* 44, 3725-3734, doi: 10.1364/ao.44.003725.
- Probst, R. R. O., Grevers, G. und Iro, H. (2008). **Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde,** Thieme, Stuttgart [u.a.].
- Rahman, F., Rao, N. N., Tippu, S. R., Patil, S., Agarwal, S. und Srivastava, S. (2013). **The expression of laminin-5 in severe dysplasia/carcinoma in situ and early invasive squamous cell carcinoma: an immunohistochemical study.** *Minerva Stomatol* 62, 139-146.
- Raitiola, J. und Pukander, H. (2000). **Symptoms of Laryngeal Carcinoma and their Prognostic Significance.** *Acta Oncologica* 39, 213-216, doi: 10.1080/028418600430798.
- Raman, C. V. und Krishnan, K. S. (1928). **A New Type of Secondary Radiation.** *Nature* 121, 501, doi: 10.1038/121501c0.
- Ramroth, H., Ahrens, W., Dietz, A. und Becher, H. (2011). **Occupational asbestos exposure as a risk factor for laryngeal carcinoma in a population-based case-control study from Germany.** *Am J Ind Med* 54, 510-514, doi: 10.1002/ajim.20963.
- Ren, J., Yang, H., Lyu, D., Zou, J., Zheng, Y. T. und Wang, H. Y. (2017). **[Clinical and pathological analyses of 154 patients with white lesion of vocal cord].** *Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi* 52, 381-384, doi: 10.3760/cma.j.issn.1673-0860.2017.05.012.
- Ricci, G., Molini, E., Faralli, M. und Simoncelli, C. (2003). **Retrospective study on precancerous laryngeal lesions: long-term follow-up.** *Acta Otorhinolaryngol Ital* 23, 362-367.

- Riede, U.-N. und Bianchi, L. (2004). **Allgemeine und spezielle Pathologie**, Thieme, Stuttgart.
- Riera, J. V., Suárez, C. N., de Bustos Pedrero, C. und Alvarez, C. M. (1987). **Premalignant lesions of the larynx: pathological prognostic factors**. *The Journal of otolaryngology* 16, 367-370.
- Robert-Koch-Institut und Gesellschaft-der-epidemiologischen-Krebsregister-in-Deutschland-e.V. (2017). **Krebs in Deutschland für 2013/2014**. 11. Ausgabe.
- Rohde, M., Grontved, A. M., Krogdahl, A. und Godballe, C. (2012). **Aggressive elimination of precancerous lesions of the vocal cords to avoid risk of cancer**. *Dan Med J* 59, A4399.
- Schiebler, T. H. und Korf, H.-W. (2007). **Anatomie**, Steinkopff, [Heidelberg].
- Schünke, M., Schulte, E. und Schumacher, U. (2015). **Prometheus - Lernatlas der Anatomie**, Thieme, Stuttgart [u.a.].
- Scierski, W., Namyslowski, G., Nozynski, J. und Zembala-Nozynska, E. (2003). **[Nuclear shape assessment of the cells in precancerous lesions and laryngeal cancer]**. *Otolaryngol Pol* 57, 855-859.
- Shaw, R. J. (2006). **Glucose metabolism and cancer**. *Current Opinion in Cell Biology* 18, 598-608, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2006.10.005>.
- Smekal, A. (1923). **Zur quantentheorie der dispersion**. *Naturwissenschaften* 11, 873-875.
- Smith, E. und Dent, G. (2005). **Modern Raman spectroscopy**, Wiley, Chichester [u.a.].
- Speight, P. M. (2007). **Update on Oral Epithelial Dysplasia and Progression to Cancer**. *Head and Neck Pathology* 1, 61-66, doi: 10.1007/s12105-007-0014-5.
- Spielmann, P. M., Palmer, T. und McClymont, L. (2010). **15-Year review of laryngeal and oral dysplasias and progression to invasive carcinoma**. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 267, 423-427, doi: 10.1007/s00405-009-1013-9.

- Stenersen, T. C., Hoel, P. S. und Boysen, M. (1991). **Carcinoma in situ of the larynx: an evaluation of its natural clinical course**. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 16, 358-363.
- Stiblar-Martincic, D. (1997). **Histology of laryngeal mucosa**. *Acta Otolaryngol Suppl* 527, 138-141.
- Strutt, J. W. (1871). **XV. On the light from the sky, its polarization and colour**. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science* 41, 107-120.
- Tae, K., Jin, B. J., Ji, Y. B., Jeong, J. H., Cho, S. H. und Lee, S. H. (2011). **The role of laryngopharyngeal reflux as a risk factor in laryngeal cancer: a preliminary report**. *Clin Exp Otorhinolaryngol* 4, 101-104, doi: 10.3342/ceo.2011.4.2.101.
- Talari, A. C. S., Movasaghi, Z., Rehman, S. und Rehman, I. U. (2015). **Raman spectroscopy of biological tissues**. *Applied Spectroscopy Reviews* 50, 46-111.
- Tangwen, Y. und Jiawen, Z. (2017). **Biological tissues identification from their spectral signals acquired by a Raman needle**. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc 2017*, 2279-2282, doi: 10.1109/embc.2017.8037310.
- Teh, S. K., Zheng, W., Lau, D. P. und Huang, Z. (2009). **Spectroscopic diagnosis of laryngeal carcinoma using near-infrared Raman spectroscopy and random recursive partitioning ensemble techniques**. *Analyst* 134, 1232-1239, doi: 10.1039/b811008e.
- Uno, Y., Saito, R., Hamaya, K. und Nose, S. (1997). **Epithelial hyperplasia of the larynx a clinical follow-up study**. *Auris Nasus Larynx* 24, 309-314.
- Van der Laan, B., Baris, G., Gregor, R. T., Hilgers, F. und Balm, A. (1995). **Radiation-induced tumours of the head and neck**. *The Journal of Laryngology & Otology* 109, 346-349.
- Vassileiou, A., Vlastarakos, P. V., Kandiloros, D., Delicha, E., Ferekidis, E., Tzagaroulakis, A. und Nikolopoulos, T. P. (2012). **Laryngeal cancer: smoking is not the only risk factor**. *B-ent* 8, 273-278.

- Wang, A., Han, J., Guo, L., Yu, J. und Zeng, P. (1994). **Database of Standard Raman Spectra of Minerals and Related Inorganic Crystals**. Applied Spectroscopy 48, 959-968.
- Warnakulasuriya, S. (2001). **Histological grading of oral epithelial dysplasia: revisited**. J Pathol 194, 294-297, doi: 10.1002/1096-9896(200107)194:3<294::Aid-path911>3.0.Co;2-q.
- Waschke, J., Böckers, T. M. und Paulsen, F. (2015). **Anatomie**, Elsevier, Urban & Fischer, München.
- Weichselbaum, R. R., Hallahan, D. E., Sukhatme, V., Dritschilo, A., Sherman, M. L. und Kufe, D. W. (1991). **Biological consequences of gene regulation after ionizing radiation exposure**. J Natl Cancer Inst 83, 480-484, doi: 10.1093/jnci/83.7.480.
- Weller, M. D., Nankivell, P. C., McConkey, C., Paleri, V. und Mehanna, H. M. (2010). **The risk and interval to malignancy of patients with laryngeal dysplasia; a systematic review of case series and meta-analysis**. Clinical Otolaryngology 35, 364-372, doi: 10.1111/j.1749-4486.2010.02181.x.
- Welsch, U., Deller, T. und Kummer, W. (2014). **Lehrbuch Histologie**, Elsevier, Urban & Fischer, München.
- Wittekind, C. (2017). **TNM - Klassifikation maligner Tumoren**, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany.
- Xie, C., Mace, J., Dinno, M. A., Li, Y. Q., Tang, W., Newton, R. J. und Gemperline, P. J. (2005). **Identification of Single Bacterial Cells in Aqueous Solution Using Confocal Laser Tweezers Raman Spectroscopy**. Analytical Chemistry 77, 4390-4397, doi: 10.1021/ac0504971.
- Yu, H., Li, X., Wang, Y., Yang, H., Guo, X., Pan, Z. und Jiang, X. (2009). **[Clinic and pathological analysis the larynx leukoplakia in 74 cases]**. Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi 23, 688-689.
- Zhang, H. K. und Liu, H. G. (2012). **Is severe dysplasia the same lesion as carcinoma in situ? 10-Year follow-up of laryngeal precancerous lesions**. Acta Otolaryngol 132, 325-328, doi: 10.3109/00016489.2011.642812.

Zheng, C., Qing, S., Wang, J., Guodong, L., Li, H., Xiaoyi, L., Ma, C., Tang, J. und Yue, X. (2019). **Diagnosis of cervical squamous cell carcinoma and cervical adenocarcinoma based on Raman spectroscopy and support vector machine.** Photodiagnosis Photodyn Ther, doi: 10.1016/j.pdpdt.2019.05.029.

6.2 Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: Glottis in Respiationsstellung | 4 |
| Abbildung 2: Gesundes Plattenepithel der Stimmlippe, HE-gefärbt in zehnfacher Vergrößerung | 5 |
| Abbildung 3: Leichtgradige Dysplasie des Stimmlippenepithels mit Hyperparakeratose der Stimmlippe, HE-gefärbt in 20-facher Vergrößerung | 7 |
| Abbildung 4: Mäßiggradige Dysplasie des Stimmlippenepithels mit Hyperparakeratose der Stimmlippe, HE-gefärbt in 20-facher Vergrößerung | 7 |
| Abbildung 5: Schwergradige Dysplasie des Stimmlippenepithels ohne invasive Komponente, HE-gefärbt in 20-facher Vergrößerung..... | 8 |
| Abbildung 6: Invasives, plattenepitheliales Karzinom der Stimmlippe, HE-gefärbt in zehnfacher Vergrößerung..... | 11 |
| Abbildung 7: Schematische Darstellung des verwendeten Raman-Spektroskops | 15 |
| Abbildung 8: Kalibrieren des Raman-Spektroskops | 27 |
| Abbildung 9: Orientierung in den Gewebeschnitten mit Lichtmikroskop und Raman-Spektroskop | 28 |
| Abbildung 10: 20 Messpunkte nahe der Basalmembran und 25 Messpunkte im mittleren Drittel des Epithels..... | 29 |
| Abbildung 11: Tabakkonsum geordnet nach Studiengruppe | 33 |
| Abbildung 12: Nikotinabusus in <i>py</i> geordnet nach Studiengruppe mit Standardabweichung | 34 |
| Abbildung 13: Alkoholkonsum geordnet nach Studiengruppe | 35 |
| Abbildung 14: Durchschnittlicher Beobachtungszeitraum geordnet nach Studiengruppe mit Standardabweichung | 37 |
| Abbildung 15: Anzahl der durchschnittlichen operativen Eingriffe nach Studiengruppe geordnet mit Standardabweichung | 38 |
| Abbildung 16: Durchschnittliche Zeit von erster Vorstellung bis zum histologischen Nachweis eines invasiven Plattenepithelkarzinoms mit Standardabweichung | 39 |
| Abbildung 17: Leukoplakie ohne dysplastische Veränderung des Stimmlippenepithels (Präparat I.7) der Stimmlippe mit Hyperparakeratose, HE-gefärbt in 20-facher Vergrößerung..... | 40 |
| Abbildung 18: Leichtgradige Dysplasie des Stimmlippenepithels mit Hyperparakeratose (Präparat II.5) der Stimmlippe, HE-gefärbt in 20-facher Vergrößerung | 41 |
| Abbildung 19: Mäßiggradige Dysplasie des Stimmlippenepithels mit Hyperkeratose (Präparat III.3) der Stimmlippe, HE-gefärbt in 20-facher Vergrößerung | 42 |
| Abbildung 20: Schwergradige Dysplasie des Stimmlippenepithels ohne Keratosen (Präparat IV.5) der Stimmlippe, HE-gefärbt in 20-facher Vergrößerung | 43 |

| | |
|---|----|
| Abbildung 21: Invasives, wenig differenziertes, nicht verhorntes Plattenepithelkarzinom (Präparat V.8) der Stimmlippe, HE-gefärbt in 20-facher Vergrößerung | 44 |
| Abbildung 22: Mittelwertspektren der Messungen in den basalen Epithelschichten in Abhängigkeit der histologischen Diagnose | 46 |
| Abbildung 23: Mittelwertspektren der Messungen im mittleren Epitheldrittel in Abhängigkeit der histologischen Diagnose | 48 |
| Abbildung 24: <i>Scores-Plot</i> der Messpunkte in den basalen Epithelschichten nach Präparat mit erster und zweiter Hauptkomponente | 49 |
| Abbildung 25: <i>Scores-Plot</i> der Messpunkte in den basalen Epithelschichten in Abhängigkeit der histologischen Diagnose mit erster und zweiter Hauptkomponente | 50 |
| Abbildung 26: <i>Scores-Plot</i> der Messpunkte in den basalen Epithelschichten in Abhängigkeit der histologischen Diagnose mit zweiter und dritter Hauptkomponente | 51 |
| Abbildung 27: <i>Scores-Plot</i> der Messpunkte in den basalen Epithelschichten in Abhängigkeit der histologischen Diagnose mit dritter und vierter Hauptkomponente | 51 |
| Abbildung 28: <i>Loading-Plot</i> der 1. PC nach PCA der Messpunkte in den basalen Epithelschichten kategorisiert nach histologischer Einteilung | 52 |
| Abbildung 29: <i>Loading-Plot</i> der 2. PC nach PCA der Messpunkte in den basalen Epithelschichten..... | 53 |
| Abbildung 30: <i>Loading-Plot</i> der 3. PC nach PCA der Messpunkte in den basalen Epithelschichten..... | 53 |
| Abbildung 31: <i>Loading-Plot</i> der 4. PC nach PCA der Messpunkte in den basalen Epithelschichten..... | 53 |
| Abbildung 32: <i>Loading-Plot</i> der 5. PC nach PCA der Messpunkte in den basalen Epithelschichten..... | 53 |
| Abbildung 33: <i>Loading-Plot</i> der 6. PC nach PCA der Messpunkte in den basalen Epithelschichten..... | 53 |
| Abbildung 34: <i>Loading-Plot</i> der 7. PC nach PCA der Messpunkte in den basalen Epithelschichten..... | 53 |
| Abbildung 35: <i>Scores-Plot</i> der basalen Messpunkte in Abhängigkeit des Datums der Aufbereitung der Paraffin-Schnitte mit erster und zweiter Hauptkomponente | 55 |
| Abbildung 36: <i>Scores-Plot</i> der basalen Messpunkte in Abhängigkeit des Datums der Messungen am Raman-Spektroskop mit erster und zweiter Hauptkomponente..... | 55 |
| Abbildung 37: <i>Scores-Plot</i> der Messpunkte im mittleren Epitheldrittel nach Präparat | 56 |
| Abbildung 38: <i>Scores-Plot</i> der Messpunkte im mittleren Epitheldrittel in Abhängigkeit der histologischen Diagnose mit erster und zweiter Hauptkomponente | 57 |

| | |
|--|----|
| Abbildung 39: <i>Scores-Plot</i> der Messpunkte im mittleren Epitheldrittel in Abhängigkeit der histologischen Diagnose mit zweiter und vierter Hauptkomponente | 57 |
| Abbildung 40: <i>Loading-Plot</i> der 1. PC nach PCA der Messpunkte im mittleren Epitheldrittel | 58 |
| Abbildung 41: <i>Loading-Plot</i> der 2. PC nach PCA der Messpunkte im mittleren Epitheldrittel | 58 |
| Abbildung 42: <i>Loading-Plot</i> der 3. PC nach PCA der Messpunkte im mittleren Epitheldrittel | 58 |
| Abbildung 43: <i>Loading-Plot</i> der 4. PC nach PCA der Messpunkte im mittleren Epitheldrittel | 58 |
| Abbildung 44: <i>Loading-Plot</i> der 5. PC nach PCA der Messpunkte im mittleren Epitheldrittel | 59 |
| Abbildung 45: <i>Loading-Plot</i> der 6. PC nach PCA der Messpunkte im mittleren Epitheldrittel | 59 |
| Abbildung 46: <i>Loading-Plot</i> der 7. PC nach PCA der Messpunkte im mittleren Epitheldrittel | 59 |
| Abbildung 47: <i>Scores-Plot</i> der Messpunkte im mittleren Epitheldrittel, ob sich bei Patienten mit einer Veränderung der Stimmlippe ein invasives Plattenepithelkarzinom entwickelt hat mit erster und zweiter Hauptkomponente | 60 |

6.3 Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 1: Zytologische Merkmale der verschiedenen Dysplasiegrade nach WHO-Einteilung 2005 (Barnes <i>et al.</i> , 2005) | 7 |
| Tabelle 2: Liste verwendeter Gewebeproben mit histopathologischen Diagnosen des Patienten | 19 |
| Tabelle 3: Liste verwendeter Geräte mit Hersteller | 20 |
| Tabelle 4: Liste verwendeter Software mit Entwickler | 20 |
| Tabelle 5: Liste verwendeter Chemikalien mit Hersteller | 21 |
| Tabelle 6: Liste verwendeter Verbrauchsmaterialien mit Hersteller | 21 |
| Tabelle 7: Liste verwendeter Labormaterialien mit Hersteller | 22 |
| Tabelle 8: Liste verwendeter Lösungen mit Komponenten und Mischungsverhältnis | 22 |
| Tabelle 9: Formeln der errechneten Parameter der linearen Diskriminanzanalyse | 31 |
| Tabelle 10: Lokalisationen der verdächtigen Veränderungen | 36 |
| Tabelle 11: Visuelle, qualitative Analyse der Mittelwertspektren der Messpunkte in den basalen Epithelschichten | 46 |
| Tabelle 12: Visuelle, qualitative Analyse der Mittelwertspektren der Messpunkte im mittleren Epitheldrittel | 48 |
| Tabelle 13: <i>Peaks</i> der <i>Loading-plots</i> der PCA der Messpunkte in den basalen Epithelschichten | 54 |
| Tabelle 14: <i>Peaks</i> der <i>Loading-Plots</i> der PCA der Messpunkte im mittleren Epitheldrittel | 59 |

| | |
|--|----|
| Tabelle 15: Lineare Diskriminanzanalyse der Mittelwertspektren der Messpunkte im mittleren Epitheldrittel (Modell 1) der Studiengruppe V (invasive Karzinome) gegenüber Studiengruppe I (keine Dysplasie), II (leichtgradige Dysplasie), III (mäßiggradige Dysplasie) und IV (schwergradige Dysplasie) | 62 |
| Tabelle 16: Lineare Diskriminanzanalyse der Mittelwertspektren der Messpunkte im mittleren Epitheldrittel (Modell 1) zwischen Leukoplakien und Dysplasiegraden mit unterschiedlicher therapeutischer Konsequenz (Studiengruppe I+II+III vs. Studiengruppe IV) | 63 |
| Tabelle 17: Lineare Diskriminanzanalyse der Mittelwertspektren der Messpunkte im mittleren Epitheldrittel (Modell 1), ob Patienten später an einem invasiven Plattenepithelkarzinom der Stimmlippe erkrankt sind | 64 |
| Tabelle 18: Lineare Diskriminanzanalyse der Einzelspektren der Messpunkte im mittleren Epitheldrittel (Modell 2) der Studiengruppe V (invasive Karzinome) gegenüber Studiengruppe I (keine Dysplasien), II (leichtgradige Dysplasie), III (mäßiggradige Dysplasie) und IV (schwergradige Dysplasie) | 65 |
| Tabelle 19: Lineare Diskriminanzanalyse der Einzelspektren der Messpunkte im mittleren Epitheldrittel (Modell 2) zwischen Leukoplakien und Dysplasiegraden mit unterschiedlicher therapeutischer Konsequenz (Studiengruppe I+II+III vs. Studiengruppe IV) | 65 |
| Tabelle 20: Lineare Diskriminanzanalyse der Einzelspektren der Messpunkte im mittleren Epitheldrittel (Modell 2), ob Patienten später an einem invasiven Plattenepithelkarzinom der Stimmlippe erkrankt sind..... | 66 |

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die diese Arbeit ermöglicht und zu ihrem Gelingen beigetragen haben.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinem Betreuer Dr. Till Meyer, der mir zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite stand und meinem Doktorvater PD Dr. med. Stephan Hackenberg.

Zudem möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Lehrstuhls „Tissue Engineering“ für die Beantwortung jeglicher Fragen und Hilfestellungen beim Erarbeiten des experimentellen Setups bedanken, insbesondere bei Dr. Maria Steinke und Heike Oberwinkler.

Ich möchte mich auch beim Pathologischen Institut der Universität Würzburg für die Bereitstellung der Gewebeproben sowie die Einführung in die Histologie der Dysplasien durch Dr. Christopher Beck recht herzlich bedanken.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, die mich während dieser Zeit unterstützt und immer wieder motiviert haben.

Lebenslauf