

Aus der Klinik und Poliklinik für Mund- Kiefer- und Gesichtschirurgie - Plastische Operationen
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Hyperspektralbildgebung zur automatisierten Klassifizierung
von oraler Muskulatur, Fett und Mundschleimhaut unter Verwendung eines 6-
schichtigen light – weight neuronalen Netzwerks**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Zahnmedizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Paul Römer
aus Wiesbaden

Mainz, 2022

Tag der Promotion: *12. Juli 2022*

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	V
1 Einleitung	1
2 Literaturdiskussion	3
2.1 Das orale Plattenepithelkarzinom.....	3
2.2 Potenziell maligne Mundschleimhautveränderungen	4
2.2.1 Orale Leukoplakie.....	5
2.2.2 Oraler Lichen Planus	7
2.3 Diagnostische Maßnahmen.....	9
2.3.1 Inzisionsbiopsie	11
2.3.2 Bürstenbiopsie und Zytologie	12
2.3.3 Optische Verfahren.....	13
2.4 Hyperspectral Imaging (HSI)	16
2.5 Histologie.....	19
2.5.1 Mundschleimhaut.....	19
2.5.2 Fettgewebe	20
2.5.3 Skelettmuskulatur	22
3 Material und Methoden	23
3.1 Geräte.....	23
3.2 Verbrauchsmaterialien.....	23
3.3 Chemikalien.....	23
3.4 Gewebeproben	24
3.5 Verarbeitung der hyperspektralen Bilddaten	26
3.6 Histologie.....	30
3.7 Auswertung der Gewebeproben.....	31
3.8 Statistik.....	33
3.9 Künstliche Neuronale Netzwerke und Deep Learning.....	33
3.10 Auswertung der Daten.....	35
4 Ergebnisse	38
4.1 Spektrale Gewebesignaturen	38
4.2 Künstliches Neuronales Netzwerk.....	39

5	Diskussion	41
5.1	Analyse spektraler Gewebesignaturen.....	42
5.2	Hyperspektralsignaturen der verschiedenen Gewebeklassen	44
5.2.1	Fettgewebe und Mundschleimhaut.....	45
5.2.2	Abweichung der Muskelgruppe	45
5.2.3	Relevante Spektren für die Gewebeerkenennung.....	45
5.3	Ergebnisse des Künstlichen Neuronalen Netzwerks.....	47
6	Zusammenfassung.....	49
7	Literaturverzeichnis	50
8	Anhang	56
8.1	TNM – Klassifikation und Tumorstadien des Mundhöhlenkarzinoms (gem. UICC)	56
8.1.1	T- Klassifikation (Primärtumor)	56
8.1.2	N – Klassifikation (regionäre Lymphknotenmetastasen)	56
8.1.3	M – Klassifikation.....	57
8.1.4	R – Status	57
8.1.5	Grading	57
8.1.6	L (Lymphgefäßinvasion)	57
8.1.7	V (Veneninvasion)	57
8.1.8	Tumorstadien nach UICC – Kriterien.....	58
9	Danksagung.....	59
	Tabellarischer Lebenslauf	60

Abkürzungsverzeichnis

Acc	Accuracy; Genauigkeit
CIS	Carcinoma in situ
CNN	Convolutional Neural Network
DL	Deep Learning
DMS	Deutsche Mundgesundheitsstudie
DNN	Deep Neural Network
engl.	englisch
GNE	Gaumennahterweiterung
GvHD	Graft – versus – host disease
Hb	Hämoglobin
HE	Hämatoxylin/Eosin
HPV	Humanes Papillomvirus
HS	hyperspektral
HSI	Hyperspectral Imaging
KNN	Künstliches neuronales Netzwerk
LP	Lichen ruber planus
ML	Mashine Learning
NIR	nahinfrarot
NSAID	nichtsteroidale Antirheumatika
OLL	Orale lichenoide Läsion
OLP	Oraler Lichen planus
OSCC	Oral squamous cell carcinoma
PECA	Plattenepithelkarzinom
PMV	potenziell maligne Veränderungen
RGB	rot, grün, blau
ROI	Region of Interest
Sens	Sensitivity; Sensitivität
Spec	Specifity; Spezifität
SVM	Support Vector Mashine
THI	Tissue Hemoglobin Index
TWI	Tissue Water Index
UICC	Union international contre le cancer

VIS	visuell sichtbares Licht
WHO	World Health Organization
ρ	Dichte

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Beispiele für spektrale Auflösung: links multispektrale Auflösung mit 7 - 11 Bändern, rechts hyperspektrale Auflösung mit 46 Bändern	16
Abbildung 2 Hyperspektrale Bilddaten, Struktur eines HS-Datenwürfels, Einzelbanddarstellung und spektrale Signatur eines Pixels,	17
Abbildung 3 Auskleidende Mundschleimhaut, nicht verhornt. (A) orales Epithel mit Anteilen submuköser Speicheldrüsen (§), (B) typische Schichtung des Schleimhautepithels	20
Abbildung 4 (A) Weißes, univakuoläres Fettgewebe der Wange mit typischen Fettvakuolen und (B) des Kinns, angeschnittenes Blutgefäß (§)	21
Abbildung 5 (A) Proben quergestreiften Muskels des M. digastricus und (B) des M. masseter	22
Abbildung 6 Entnahmestellen Fettgewebe	25
Abbildung 7 Entnahmestellen Muskelgewebe	25
Abbildung 8 Indikatorlaser bei Messvorgang einer Gewebeprobe	27
Abbildung 9 Schematischer Aufbau der TIVITA [®] -Tissue Hyperspektralkamera.....	27
Abbildung 10 (A) Probe eines quergestreiften Muskels in räumlicher und spektraler Dimension, (B) zweidimensionales Graustufenbild bei 650 nm und (C) Reflexionsgrad einer ausgewählten Region von Interesse (ROI; roter Punkt) von 500nm bis 995 nm D.G.E. Thiem	28
Abbildung 11 Absorptionsspektren von Melanin [1], oxygeniertem- und desoxygeniertem Hämoglobin zwischen 500 nm und 700 nm Wellenlänge [2]	29
Abbildung 12 (A) Histologischer Schnitt eines Muskels, (B) oraler Mundschleimhaut, (C) Wangenfett und (D) Schleimhaut mit angeschnittenen Drüsenanteilen	30
Abbildung 13 (Oben) Beispielhafte Darstellung der Auswertung einer Muskelprobe mit einem zweidimensionalen Graustufenbild bei 705 nm und manuell platzierten Regions of Interest, (unten) der mittlere Reflexionsgrad als Liniendiagramm bei verschiedenen Wellenlängen. .	32
Abbildung 14 Aufbau eines künstlichen Neurons	34
Abbildung 15 Aufbau eines dreischichtigen künstlichen neuronalen Netzes.....	35
Abbildung 16 Neuronale Netzwerkarchitektur implementiert für medizinische Klassifizierung von numerischen Patches mit H2O-Flow.....	36
Abbildung 17 Formeln zur Berechnung der Genauigkeit (Accuracy), Spezifität (Specificity) und Sensitivität (Sensitivity).....	36
Abbildung 18 Trainingsergebnisse und Validierungsverlust für 16.000 Epochen. Validierungsverluste werden als Durchschnitt über alle 6 Schichten angegeben.	37
Abbildung 19 Gemittelte Reflexionswerte der unterschiedlichen Gewebeprobe, aufgetragen gegen die gemessenen Wellenlängen 500 bis 990 nm. Diese wurden in die Untersuchungsgruppen Fett (Gruppe 1, dunkelblau), Muskel (Gruppe 2, grün) und orale Mucosa (Gruppe 3, gelb) unterteilt.	38
Abbildung 20 (Oben) Reflexionsspektren einer Muskelprobe auf weißem- und (unten) schwarzem Untergrund. Links: RGB-Bild, Mitte: Platzierung ROI's, Rechts: Reflexionsmuster	43

Abbildung 21 Absorptionsspektrum des schwarzen Messhintergrunds aus Abb. 20 als Referenz	43
Abbildung 22 (Schwarz) Reflexion einer Muskelprobe auf schwarzem Hintergrund und (orange) Eigenabsorption des schwarzen Messhintergrunds bei 500 bis 1000 nm	46

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Trainingsdaten pro Gewebeprobe	39
Tabelle 2 Konfusionsmatrix für die Klassifizierung von Gewebeproben. Tatsächliche Klassen werden zeilenweise und vorhergesagte Klassen spaltenweise angegeben.....	40
Tabelle 3 Ergebnisse der Auswertung von 21 Gewebeklassen mit unabhängigen Testdaten am Prüfpunkt nach 15.577 Epochen. Die Werte werden als klassenabhängige Klassifizierungsergebnisse angegeben (Acc = Genauigkeit, Spec = Spezifität, Sens = Sensitivität)	40

1 Einleitung

Der Nachweis von pathologischen Gewebeeränderungen auf makroskopischer und mikroskopischer Ebene ist die Grundlage einer jeden Malignom-assoziierten Diagnosestellung. Ausgangspunkt jeder Diagnosesicherung ist die Entnahme und mikroskopische Untersuchung einer repräsentativen Gewebeprobe. Abhängig von Ätiologie und betroffener Körperregion unterscheiden sich die Maßnahmen für eben diese Probenentnahme hinsichtlich ihres Ablaufes und ihrer Invasivität. Ein Beispiel hierfür ist die Beurteilung von unklaren Mundschleimhautveränderungen, für die nach wie vor die Skalpellbiopsie in Form einer Inzisions- bzw. Exzisionsbiopsie mit anschließender histopathologischer Gewebeuntersuchung als Goldstandard gilt. Diese hat jedoch Nachteile wie Invasivität, Kostenintensität und eingeschränkte Aussagekraft bei Vorliegen multilokulärer Befunde. Mit dem Ziel einer weniger oder gar vollständig *non-invasiven* Möglichkeit der Diagnostik sind in den letzten Jahren verschiedene Verfahren, darunter die zytologische Bürstenbiopsie [3], in-vivo-Färbung mit Toluidinblau oder 5- Aminolävulinsäure sowie die Verwendung von Gewebeautofluoreszenzen [4] entwickelt worden. Diese weisen Sensitivitäten von 91 % (77 % bis 97 %) sowie Spezifitäten von 91 % und 58 % (22 % bis 87 %) [5] auf, sind allerdings bei multifokalen Läsionen aufgrund einer erhöhten Falsch – negativ Rate nur eingeschränkt anwendbar. Die oben genannten Methoden konnten bisher nicht zu einer nachweisbaren Verbesserung in der Früherkennung oraler Malignome beitragen. Dies spiegeln besonders die weiterhin hohen Inzidenzraten fortgeschrittener oraler Plattenepithelkarzinome (PECA) wider.

Hyperspectral Imaging (HSI) ist eine in der Medizin und vielen anderen Bereichen erfolgreich genutzte kontaktlose, nicht-invasive und strahlenfreie Technik, die eine schnelle Erfassung und unmittelbare Analyse diagnostisch relevanter Informationen ermöglicht [6-11]. In zahlreichen medizinischen Bereichen, darunter beispielsweise bei der Überwachung der Wundheilung [12], der Perfusionskontrolle mikrovaskulärer Transplantate [13, 14] sowie der Beurteilung von *in-sano* Resektionen bei Ösophagus- und Oropharynxkarzinomen [15, 16] konnte die Anwendung von Hyperspectral Imaging bereits erfolgreich demonstriert werden. HSI umfasst konventionelle und spektroskopische Methoden, um sowohl räumliche als auch (hyper-) spektrale Bildinformationen weit über das visuell sichtbare Wellenspektrum (400 und 700 nm) hinaus zu erhalten [17]. Jedem im Bildausschnitt erfassten Pixel lassen sich so spezifische Strahlungsvektoren zuordnen, deren Werte unmittelbar von der chemischen Materialzusammensetzung des bestrahlten Objekts abhängen. Die daraus resultierenden umfangreichen Datensätze können mittels Propagierung durch ein Künstliches Neuronales Netzwerk (KNN) im Rahmen von maschinellen Lern (Machine learning; ML) – Verfahren zur automatisierten Erkennung zuvor festgelegter Parameter genutzt werden.

Diese Form der künstlichen Intelligenz erlaubt es Forschern, Muster und Zusammenhänge in immer größeren und komplexeren Datensätzen automatisch zu detektieren und nach bestimmten Parametern zu analysieren. Moderne Ansätze wie das Deep Learning (DL) erweitern ursprüngliche Verfahren des Machine Learnings und lassen durch autonome Lernprozesse des Systems immer kompliziertere Modelle und Aufgabenstellungen zu.

Deep Learning ist zu einem effektiven Instrument in der medizinischen Datenanalyse geworden. Unter anderem lassen sich vielversprechende Erfolge auf den Gebieten der Gewebeererkennung [18, 19] und der Segmentierung medizinischer Bilddaten zur Diskriminierung pathologischer Gewebeveränderungen [20-22] verzeichnen. Nicht zuletzt die rasante Entwicklung und der stetige Fortschritt in den Bereichen Informatik und computerbasierter Algorithmen hat den erfolgreichen Einsatz von Deep Neural Network (DNN) – Verfahren in der letzten Zeit deutlich vorangetrieben [23, 24]. In der Medizin kommt Deep Learning auch bei der Analyse von Hyperspektralbildern aufgrund deren fortschrittlicher kontaktloser optischer Modalität zum Einsatz [25-27].

In dieser Arbeit wird eine Methode zur automatisierten Erkennung gesunder Gewebeproben der Untersuchungsklassen Fett, Muskel und oraler Schleimhaut, basierend auf deren charakteristischen Hyperspektralsignaturen, dargestellt. Dieser Deep Learning – Ansatz erreichte mit den üblichen Optimierungstechniken auf einfache und zeitsparende Weise Gesamtgenauigkeiten von bis zu 90 %. Auf Grundlage dieser hyperspektralen Datenbank, bestehend aus einer repräsentativen Anzahl an Proben verschiedener Patienten, wären weitere klinische Forschungsansätze, beispielsweise im Bereich der nicht – invasiven, automatisierten Beurteilung von unklaren Mundschleimhautveränderungen, denkbar.

Ziel dieser Arbeit ist es daher, eine umfangreiche HSI – Datensammlung von menschlichem Fett, Muskeln und gesunder Mundschleimhaut zu generieren, die als zukünftige Referenzbibliothek für die Beurteilung pathologischer Gewebezustände durch Auswertung deren spektraler Eigenschaften und hyperspektralen Signaturen mittels Deep Learning Methoden dient.

2 Literaturdiskussion

2.1 Das orale Plattenepithelkarzinom

Das Mundhöhlenkarzinom zählt mit aktuell über 350.000 diagnostizierten Neuerkrankungen pro Jahr zu den 6 häufigsten malignen Tumorerkrankungen weltweit. In Westeuropa beträgt die Inzidenz bei Männern 6,9 und bei Frauen 3,2 pro 100.000 Einwohner [28]. Mit 90 – 95 % repräsentiert das orale Plattenepithelkarzinom (PECA, OSCC) den Großteil der bösartigen Tumorerkrankungen der Mundhöhle und tritt am häufigsten im sechsten und siebten Lebensjahrzehnt auf [29]. Häufige Prädilektionsstellen sind der Zungenrand, der Mundboden und die Alveolarfortsätze [30]. Zu den Hauptrisikofaktoren in der Entstehung zählen das Rauchen und der Alkoholkonsum, wobei insbesondere der Ko-Konsum das Risiko der Karzinomentstehung signifikant potenziert [31]. Einen weiteren Risikofaktor stellt eine Infektion mit dem humanen Papillomvirus (HPV) dar. Hier sei speziell der „high – risk“ Subtyp HPV 16 hervorzuheben, dessen Prävalenz beim oralen Plattenepithelkarzinom schätzungsweise 14,9 % beträgt [32]. Das Staging, die Einstufung des Ausbreitungsgrades maligner Tumorerkrankungen, erfolgt gemäß der von der *Union internationale contre le cancer* (UICC) geführten TNM – Klassifikation (siehe Anhang). Die Auswahl des Therapieregimes beim Mundhöhlenkarzinom richtet sich nebst der Ausdehnung des Primärtumors maßgeblich nach dem Krankheitsstadium, dem Auftreten von Metastasen, dem Alter und Allgemeinzustand des Patienten sowie der zu erwartenden, behandlungsbedingten Morbidität. In kurativer Absicht stellt, sofern möglich, die chirurgische Resektion unter größtmöglichem Erhalt anatomisch funktionaler und ästhetischer Strukturen mit stadienbedingter, adjuvanter oder primärer Radio- und/oder Chemotherapie den derzeitigen therapeutischen Standard dar [33]. Trotz des stetigen Fortschritts chirurgischer, systemischer, wie auch strahlentherapeutischer Verfahren und dem Einsatz interdisziplinärer Therapiekonzepte ist die krankheitsbedingte Mortalität mit einer 5 – Jahres – Überlebensrate von circa 50 % über die letzten Jahrzehnte nahezu konstant [34]. Bei Diagnosesicherung im Frühstadium hingegen kann die Überlebensrate 80 % und mehr betragen [35]. Wichtige, das Stadium und somit die Prognose beeinflussende Faktoren sind neben oben angeführten Aspekten die Infiltrationstiefe des Primarius (> 4 mm), die Perineuralscheideninfiltration, das Grading, das Vorliegen von Lymphknoten- und/oder Fernmetastasen sowie der erreichte Resektionsstatus. Grund für die weiterhin schlechte Prognose und die mit circa 30 % persistierend hohen Rezidivraten [31] ist nicht zuletzt die Tatsache, dass etwa 60 % der Tumorerkrankungen erst in fortgeschrittenen Stadien (Stadium III oder IV) diagnostiziert werden [36]. Dies ist grundlegend dadurch begründet, dass gerade Patienten mit

entsprechendem Risikoprofil das Angebot von Vorsorgeuntersuchungen wie auch generell regelmäßige (Zahn-)Arztbesuche in der Regel nicht wahrnehmen. Ferner können mangelnde Kontrollen durch Haus- und Zahnärzte und die mögliche Fehldeutung von potenziell malignen Mundschleimhautläsionen zu einer verspäteten Diagnosestellung beitragen. Daher ist zu schlussfolgern, dass besonders hinsichtlich der Prognose eine frühe Erkennung und invasionsarme, patientenfreundliche Diagnostik pathologischer Mundschleimhautveränderungen als suffiziente sekundäre Präventionsmaßnahme unerlässlich ist.

2.2 Potenziell maligne Mundschleimhautveränderungen

Das orale Plattenepithelkarzinom manifestiert sich häufig auf dem Boden vorbestehender, oftmals chronischer Mundschleimhautveränderungen. Besondere Aufmerksamkeit gilt demnach neben Patienten mit bekannten, krankheitstypischen Risikofaktoren (Rauchen und/oder chronischem Alkoholkonsum), auch jenen mit prädisponierenden Mundschleimhautveränderungen. Derartig morphologisch alterierte Gewebe und Vorläuferläsionen, deren Auftreten möglicherweise das Risiko einer malignen Entartung erhöhen kann, wurden bereits 1978 von der Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization; WHO) unter dem Begriff „*Orale Präkanzerosen*“ zusammengefasst. Seit dem Jahr 2005 werden diese Mundschleimhautläsionen auch als „*potenziell maligne Veränderungen (PMV)*“ beschrieben. Schätzungen der WHO zufolge liegt die weltweite Prävalenz potenziell maligner Schleimhautveränderungen bei etwa 4,5 %, mit deutlicher Dominanz in den Entwicklungsländern [37].

Zu den potenziell malignen Schleimhautveränderungen zählen:

- Leukoplakie,
- Erythroplakie,
- Orale Lichen planus (OLP),
- Orale lichenoidale Läsion (OLL),
- Orale submuköse Fibrose,
- Aktinische Cheilitis,
- Immunsuppression / Graft – versus – host disease (GvHD) und
- Diskoide Lupus Erythematoses.

Der Großteil oben genannter, potenziell maligner Mundschleimhautveränderungen imponiert in Form von weißlichen, lokal begrenzten oder ubiquitär vorkommenden Läsionen. Ursächlich für das weiße Erscheinungsbild ist eine Verbreiterung des Hornepithels (Hyperkeratinisierung) und/oder der Stachelzellschicht (Akanthose). Nicht selten kommt es zu einer hydropischen (ödematösen) Schwellung von Epithelzellen. Eine eher rötliche Zeichnung der Mundschleimhaut deutet im Allgemeinen auf eine Ausdünnung der Epithelschicht (Atrophie) hin [38]. Eine besondere Schlüsselrolle bei der Detektion und korrekten Behandlung einer bestehenden unklaren oralen Schleimhautveränderung trägt hier der behandelnde Zahnarzt. Dies ist gerade angesichts der Tatsache, dass sich viele PMV in ihrem klinischen Erscheinungsbild stark ähneln, kein triviales Unterfangen und erfordert eine nuancierte visuelle Begutachtung und korrekte differenzialdiagnostische Einordnung des verdächtigen Befundes zur adäquaten Bewertung des individuell vorliegenden Entartungsrisikos. Laut aktueller AWMF – Leitlinie (Stand: März 2021) [33], sind alle unklaren Schleimhautveränderungen, welche länger als zwei Wochen bestehen, weiterführend therapier- bzw. abklärungsbedürftig. In der mitteleuropäischen zahnärztlichen Praxis sind besonders die Leukoplakie und der orale Lichen planus mit geschätzten Prävalenzen von 1 sowie 1,1 % relevant und sollen nun im Folgenden näher erläutert werden [39].

2.2.1 Orale Leukoplakie

Der Terminus der „oralen Leukoplakie“ wird von der WHO als eine „vorwiegend weiße Läsion der Mundschleimhaut, die nicht als eine andere definierbare Läsion charakterisiert werden kann und mit keinem physikalischen oder chemischen Auslöser außer Tabakkonsum in Verbindung gebracht wird“ [40], beschrieben und stellt folglich eine Ausschlussdiagnose dar.

Die Prävalenz der oralen Leukoplakie unterliegt starken regionalen Schwankungen und liegt weltweit zwischen 0,2 und 5 % [41]. In Deutschland zeigte die Deutsche Mundgesundheitsstudie III (DMS III) eine Prävalenz von 2,3 % in der männlichen und 0,9 % in der weiblichen Bevölkerung auf [42]. Klinisch können sich orale Leukoplakien isoliert oder multipel in Form von weißlichen, nicht abwischbaren Plaques in allen Bereichen der Mundhöhle manifestieren. Überwiegend sind dabei die Wangenschleimhaut, die Mukosa des Alveolarfortsatzes, der Mundboden, die Zunge, die Lippen und der Gaumen betroffen [40]. Es lässt sich ein homogener, für gewöhnlich asymptomatischer Typ der Leukoplakie von inhomogenen Formen abgrenzen. Diese treten vorwiegend als weiße oder weiß – rötliche Schleimhautveränderungen auf und lassen so ferner folgende Erscheinungsbilder differenzieren: *unregelmäßig flache Erythroplakie* mit roten Anteilen, *noduläre Erythroplakie* bei Bestehen von knotigen Gewebeverdickungen und *proliferativ verruköse Leukoplakie* mit

exophytischen Ausläufern. Diese Formen der inhomogenen Leukoplakie verursachen oftmals Beschwerden wie Schmerzen oder Brennen der Mundschleimhaut. Histopathologisch sind benigne, dysplasiefreie Hyper- oder Parakeratosen sowie Akanthosen, Zellatrophien und die Präsenz von Entzündungszellen charakteristisch, ebenso sind auch Hyper- und Parakeratosen mit dysplastischen Anteilen, Carcinoma in situ (CIS), oder invasive Karzinomformationen möglich [43].

Die Ätiologie der oralen Leukoplakie ist bis heute nicht abschließend geklärt, es wird jedoch davon ausgegangen, dass besonders das Rauchen und der Genuss von Kautabak die Hauptursachen in der Entstehung darstellen [44, 45]. Das Risiko einer malignen Transformation ist nicht zuletzt aufgrund der sehr heterogenen Studienlage schwer bis nicht quantifizierbar. Laut der einschlägigen Literatur liegt diese je nach Quelle zwischen 0,6 und 18 % [46]. Im Vergleich von inhomogener und homogener Leukoplakie wird das maligne Transformationsrisiko für erstere als fünffach erhöht eingestuft [47]. Besteht eine erosive Form mit erythroplaken Anteilen, so ist die Transformationsrate um weitere 14 bis 50 % gesteigert [48]. Wichtigstes Kriterium zur Einschätzung des Entartungsrisikos leukoplaker Mundschleimhautläsionen sind grundsätzlich das Vorhandensein und der Grad intraepithelialer Dysplasien, deren Auftreten auf 17 bis 39 % geschätzt wird [49]. Ergänzend haben sich eine lange Bestehensdauer, insbesondere bei Nichtrauchern, ein Befunddurchmesser größer als 200 mm² und Lokalisationen an Zunge, Mundboden oder Weichgaumen als prädisponierend für eine maligne Entartung herausgestellt [38].

Wenngleich auch die meisten Leukoplakien nicht maligne transformieren, ist die Identifikation von Risikopatienten und deren engmaschiger und systematischer Recall obligat. In jedem Falle ist bei Vorliegen einer histologisch gesicherten Leukoplakie im Sinne der Primärprävention eine Vermeidung oben genannter ätiologischer Faktoren dringend angezeigt.

2.2.2 Oraler Lichen Planus

Der orale Lichen planus (OLP) beschreibt das sich oral manifestierende Pendant zum dermalen Lichen ruber planus (LP). Dabei handelt es sich um eine nicht kontagiöse, chronisch entzündliche Erkrankung der Mundschleimhaut mit bislang nicht abschließend gekläarter Ätiologie und potenziell malignem Transformationspotenzial. In 65 % der Fälle tritt der Lichen planus an Schleimhäuten auf, nur etwa 20 % betreffen zusätzlich die Haut mit Prädilektionsstellen an Beuge- und Streckseiten der Unterarme und Unterschenkel [50]. Mit einer Prävalenz zwischen 0,1 und 4 % stellt der orale Lichen planus eine weitere, die zahnärztliche Praxis häufig betreffende Mundschleimhautveränderung dar [51]. Typischerweise tritt dieser im Alter zwischen 30 und 60 Jahren auf. Frauen sind etwa doppelt so häufig betroffen wie Männer [52].

Pathophysiologisch handelt es sich beim oralen Lichen planus um eine autoimmun assoziierte, T – Zell vermittelte, inflammatorische Gewebereaktion, deren genaue Signalwege noch nicht vollständig verstanden sind [53]. Bis zum jetzigen Zeitpunkt konnten keine allgemein gültigen spezifischen Auslöser des OLP definiert werden, sodass vor allem genetische Komponenten diskutiert werden. Lediglich in wenigen einzelnen Fällen ist es möglich, konkrete Trigger zu benennen. Dazu zählen neben den bekannten relevanten Risikofaktoren des oralen Plattenepithelkarzinoms Stress, medikamentöse Therapie mit nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAID's), Betablockern und ACE – Hemmern, Traumata oder Infektionen, beispielsweise mit dem Epstein – Barr – Virus, Herpes simplex, Helicobacter pylori, Hepatitisviren oder dem Humanen Papillomviren [54].

Klinisch lassen sich plaqueartige Läsionen sowie papulöse, retikuläre, atrophische, bullöse und erosive Erscheinungsformen des oralen Lichen planus unterscheiden, die jeweils isoliert oder in Kombination auftreten können. Am häufigsten betroffen sind, oftmals bilateral, die posteriore Wangen- und Lippenschleimhaut, gefolgt von Zunge, Gingiva und Lippenrot. Läsionen an Gaumen, Mundboden und Oberlippe werden seltener beobachtet [55]. Die Diagnose eines oralen Lichen planus erfolgt anhand der typischen klinischen Merkmale und ergänzend mittels histopathologischer Befundung eines repräsentativen Biopsats. Klinisches Charakteristikum ist die so genannte Wickham – Streifung. Dabei handelt es sich um ein Phänomen weißlicher, nicht abwischbarer Streifen der Schleimhauteffloreszenzen aufgrund oben beschriebener epithelialer Hyperkeratosen. Histopathologisch ähnelt der orale Lichen Planus der kutanen Variante. Kennzeichnende Merkmale sind Hyperkeratosen mit verbreitertem Stratum spinosum, eine bandförmige Schicht lymphozytären Infiltrats, degenerative Liquefizierung der Basalschicht, Fehlen oder sägezahnartiges Erscheinungsbild epithelialer Reteleisten sowie Präsenz von so genannten Civattekörperchen, die aus einer Kolloidschicht degenerierter Keratinozyten bestehen [56]. Konträr zu den histologischen

Kennzeichen der Leukoplakie zählt der zytomorphologische Nachweis von Dysplasien nicht zu den Diagnosekriterien des OLP [57].

Abzugrenzen vom oralen Lichen planus ist die orale lichenoidale Reaktion (OLR), die hinsichtlich ihrer Pathogenese und histologischem Phänotyp dem oralen Lichen planus zwar ähnelt, in ihrer Ätiologie jedoch oftmals identifizierbare Trigger bietet. Häufig handelt es sich dabei um eine Sensibilisierung bzw. Hypersensitivität gegenüber Bestandteilen zahnärztlicher Werkstoffe, im Wesentlichen dem Füllungsmaterial Amalgam [30, 38].

Das maligne Transformationspotenzial des oralen Lichen planus wird kontrovers diskutiert, da repräsentative prospektive Beobachtungsstudien bislang nicht vorliegen. Deshalb beruht die aktuelle Datenlage auf retrospektiven Follow - up - Studien, deren Resultate sich aufgrund des uneinheitlichen Studiendesigns und dem heterogenen Patientenkollektiv teilweise stark unterscheiden [58]. Drei unabhängige, prospektive Studien mit streng definierten diagnostischen Kriterien konnten allerdings ein signifikant gesteigertes Risiko maligner Entartung gegenüber gesunden Schleimhautarealen belegen [59-61]. Über einen Beobachtungszeitraum von 0,5 bis 20 Jahren variierte das Risiko einer malignen Transformation unabhängig der therapeutischen Maßnahmen zwischen 0,4 und 5 % [53], wobei Patienten mit erosiven und erythematösen Läsionen das höchste Risikoprofil zugesprochen wurde [56].

Die therapeutischen Maßnahmen reichen abhängig vom klinischen Phänotyp des OLP und der Beschwerdeintensität von engmaschigen klinischen Verlaufskontrollen über topische- oder systemische Corticosteroidtherapie bis hin zu medikamentöser Immunsuppression, CO₂ – Lasertherapie und chirurgischer Befundexzision. Im Falle einer lichenoiden Läsion sollte in jedem Fall die vermutete auslösende Komponente beseitigt werden. Exazerbierende Faktoren wie mechanische Traumata, beispielsweise durch schlecht sitzenden Zahnersatz oder scharfe Zahnkanten sollten ebenfalls beseitigt werden [53].

2.3 Diagnostische Maßnahmen

Die regelmäßige, systematische Inspektion der Mundhöhle gilt als effektives Mittel zur Früherkennung oraler Pathologien. Erfahrungsgemäß untersucht der behandelnde Zahnarzt die Mundhöhle, wodurch ihm eine entscheidende Rolle bei der Erkennung und differenzialdiagnostischen Bewertung malignomsuspekter Mundschleimhautveränderungen zuteil wird. Studien belegen eine signifikant höhere 5 – Jahres – Überlebensrate in Patientengruppen, die in regelmäßigem Recall bei klinischen Untersuchungen mit visueller Inspektion und digitaler Palpation der Mundhöhle untersucht wurden [62, 63].

Weiterführende, dem Zahnarzt zur Verfügung stehende, diagnostische Maßnahmen sind:

- Inzisions- und Exzisionsbiopsie,
- Bürstenbiopsie und Zytologie sowie
- Optische Verfahren.

Die frühzeitige Erkennung malignomverdächtiger Mundschleimhautveränderungen kann somit signifikant den Behandlungserfolg, die Überlebensrate und letztlich die Lebensqualität des Patienten steigern. Um wirksame Präventionsmaßnahmen langfristig etablieren zu können, bedarf es darüber hinaus flächendeckender, der gesamten Bevölkerung zur Verfügung stehender Angebote. In Deutschland besteht, verglichen mit anderen Ländern, ein vergleichsweise umfangreiches, durch die gesetzlichen Krankenkassen finanziertes Programm zahnärztlicher Vorsorgeuntersuchungen. Zu den Kassenleistungen, auf die Erwachsene Anspruch haben, zählen unter anderem halbjährliche Kontrolluntersuchungen beim Zahnarzt, jährliche Entfernungen von Zahnstein und harten Belägen und seit 2004 - in zweijährigen Intervallen - auch die Erhebung des parodontalen Screening Indexes (PSI). Ergänzend wird in Deutschland durch Führen eines Bonusheftes und infolge höherer Bezuschussung bei etwaig notwendigem Zahnersatz ein zusätzlicher Anreiz geschaffen, Vorsorgeuntersuchungen regelmäßig und gewissenhaft wahrzunehmen. Durch diese Maßnahmen sind mithin suffiziente gesetzliche Rahmenbedingungen für eine effektive Primärprävention geschaffen. Ergebnisse repräsentativer Studien zeigen eine statistische Wahrscheinlichkeit (Sensitivität) von 97 %, im Rahmen der klinischen Untersuchung ein Karzinom korrekt als solches einzustufen. Die Wahrscheinlichkeit hingegen, ein Karzinom bei falsch – negativer Beurteilung zu übersehen, liegt bei etwa 15 % (Spezifität von 85 %) [30]. Dies bestätigt die Relevanz regelmäßiger Vorsorgeuntersuchungen. Die Erfahrung zeigt jedoch, dass insbesondere jenes Patientenkollektiv mit ausgeprägtem Risikoprofil (chronischer Nikotin- und Alkoholkonsum) diese Angebote häufig nicht wahrnimmt und sich

der klinischen Vor- und Nachsorge entzieht. Dies erklärt auch, dass etwa 60 % der Tumorerkrankungen erst in späten Stadien (Stadium III oder IV) diagnostiziert werden [36]. Weiterhin stellt die größte Einschränkung der klinisch-visuellen Befundung die Schwierigkeit dar, gutartige Schleimhautveränderungen korrekt von Hochrisikoläsionen und anderen potenziell malignen Gewebezuständen zu unterscheiden. Dies kann bei untersucherbedingter Fehldeutung entsprechender Vorläuferläsionen ebenfalls zu einer Verzögerung der Diagnosestellung beitragen [64, 65].

Werden im Rahmen oben genannter Vorsorgeuntersuchungen unklare Schleimhautläsionen erkannt, ist es Aufgabe des behandelnden Zahnarztes, unter Berücksichtigung möglicher Differenzialdiagnosen das potenzielle Entartungsrisiko korrekt einzuschätzen und, wenn nötig, weiterführende diagnostische Maßnahmen einzuleiten. Gemäß aktueller AWMF S3 – Leitlinie zur Diagnostik und Therapie des oralen Plattenepithelkarzinoms (Stand: März 2021) und Sk2 – Leitlinie zu Diagnostik und Management von Vorläuferläsionen des oralen Plattenepithelkarzinoms (Stand: September 2019) gelten alle Läsionen, die nach zweiwöchiger Beobachtung oder Therapie keine Regredienz zeigen und in ihrer Ätiologie diagnostisch nicht eindeutig nachvollziehbar sind, als verdächtig [33, 66].

Klinische Malignitätskriterien sind [66]:

- Hyperkeratosen,
- Inhomogenität,
- Erosion,
- Blutung bei Berührung oder mechanischer Irritation,
- Neuauftreten ohne eindeutige Ursache und unbekannter Bestehensdauer sowie
- Teleangiektasien.

Bei Vorliegen jener Charakteristika und hinreichendem Verdacht, orientierend an den oben genannten Kriterien, stellt die histologische Untersuchung einer repräsentativen Biopsie den Goldstandard zur Sicherung der Diagnose und pathologischen Entität dar. Der Zeitpunkt der Biopsie sollte so gewählt werden, dass eine Verzögerung der Diagnosesicherung unter Berücksichtigung des Zeitbedarfs einer histopathologischen Aufarbeitung so gering wie möglich gehalten wird [66]. Studien haben gezeigt, dass eine Verzögerung der Behandlung eines oralen Plattenepithelkarzinoms um mehr als 30 Tage die Mortalität im Verlauf signifikant erhöht. Um die Überlebensrate von Patienten mit chirurgisch zu therapierenden

Mundhöhlenkarzinomen im Frühstadium nicht negativ zu beeinflussen, konnte ein Therapieverzug von höchstens 20 Tagen als maximal tolerierbarer definiert werden [67].

Daraus lässt sich schlussfolgern, dass innerhalb dieser richtungsweisenden Phase präoperative Diagnostika, darunter histopathologische Analysen und weiterführende Staging – Untersuchungen, wie auch gegebenenfalls die Anbindung an ein onkologisches Fachzentrum und die Therapieplanung, weitgehend abgeschlossen sein sollten, um eine bestmögliche Gesamtprognose zu gewährleisten.

Die Abklärung einer unklaren Schleimhautveränderung kann auf verschiedenen Wegen erfolgen. Mit dem Wunsch nach invasionsärmeren Möglichkeiten der Diagnostik wurden in den letzten Jahren verschiedene Verfahren entwickelt, deren Vor- und Nachteile im Folgenden näher beleuchtet werden sollen. Ziel dieser Arbeit ist es, die Grundlage für eine *non invasive* Diagnosetechnik und unterstützende Risikobeurteilung potenziell maligner Veränderungen und persistierenden Schleimhautläsionen anhand der Analyse ihrer hyperspektralen Gewebesignaturen zu schaffen.

2.3.1 Inzisionsbiopsie

Die Inzisionsbiopsie ist die anteilige Gewebeentnahme eines verdächtigen Befundes mit darauffolgend histopathologischer Aufbereitung und Untersuchung. Idealerweise handelt es sich zwecks einfacherer Befundeinordnung dabei um ein Biopsat, welches sowohl Anteile des suspekten, als auch Teile angrenzenden, makroskopisch als gesund erscheinenden Normalgewebes beinhaltet. Diese Form der Biopsie weist eine diagnostische Konkordanz von bis zu 88,9 % zwischen klinischer Fragestellung und pathologischen Befundergebnissen auf und ist bei einem verbleibenden falsch-negativ Bewertungsrisiko <10 %, ausgesprochen zuverlässig [68]. Nennenswerte Nachteile der Skalpellbiopsie sind die Invasivität, Kostenintensität und die eingeschränkte Repräsentativität bei multifokalen Befunden.

Die vollständige Entfernung einer Schleimhautläsion im Sinne einer diagnostischen Exzisionsbiopsie bietet aufgrund eines reichlicheren Probeumfangs zwar mehr Zuverlässigkeit, sollte jedoch je nach Umfang aufgrund der gesteigerten Morbidität sorgfältig gegen die alternative Mehrfachbiopsie abgewogen werden. Ebenso besteht im Falle einer Exzisionsbiopsie das Risiko, dass mögliche Malignome unvollständig reseziert- und harmlose Befunde übertherapiert werden [69]. Retrospektive Beobachtungsstudien konnten hinsichtlich der Art der Biopsie (Inzisions- oder Exzisionsbiopsie) keinen Einfluss auf die Überlebensrate von Patienten mit oralen Plattenepithelkarzinomen darlegen, sodass die Inzisionsbiopsie weiterhin als das valide Standardverfahren in der Diagnosesicherung malignomverdächtiger Mundschleimhautläsionen gilt [70].

2.3.2 Bürstenbiopsie und Zytologie

Um dem Wunsch einer unkomplizierten und im Vergleich zur chirurgischen Skalpellbiopsie weniger invasiv, zeit- und kostenintensiven Screeningmethode zur Früherkennung von Kzinomen und minimalinvasiven Verlaufskontrolle persistenter Mundschleimhautläsionen gerecht zu werden, wurden in den vergangenen Jahren unter anderem Verfahren wie die Exfoliationszytologie und Bürstenbiopsie etabliert. Dabei handelt es sich um ein zytodiagnostisches Verfahren, bei dem zu untersuchende Zellen mittels rigider Nylonbürsten aus Epithelschichten und Zellverbänden abgeschilfert- und anschließend auf Objektträger aufgebracht und fixiert werden [3]. Aufgrund der ausgeprägten Verhornung des oralen Schleimhautepithels sind zur Gewinnung einer repräsentativen Zellanzahl, insbesondere der tiefer gelegenen, zur objektiven Bewertung von Malignitätskriterien entscheidenden Zellschichten, ausreichend wiederholte Rotationen der Abstrichbürste ($> 10 \times$) mit entsprechender Eindringtiefe der Bürstenfilamente erforderlich. Das Auftreten von kleinen, punktförmigen Blutungen nach der mechanischen Biopsiegewinnung signalisiert eine ausreichende Eindringtiefe. Die Auswertung des gewonnenen Präparates erfolgt im Anschluss an die Zellfärbung entweder zytologisch durch einen Pathologen oder computergestützt mittels automatisierter Bild-zytometrischer Analyse. Ergänzend sind auch die quantitative Bestimmung von Aneuploidien und DNA – Gehalt der Zellen möglich [71]. Unabhängig vom gewählten Analyseverfahren liegen Sensitivität und Spezifität dieser zytologischen Untersuchungen laut einer Metaanalyse von 2015 bei circa 91 % [72].

Vorteile der Bürstenbiopsie sind ihre einfache Handhabung sowie die minimalinvasive Vorgehensweise. Im Gegensatz zur invasiven Skalpellbiopsie werden allerdings keine integralen Zellverbände, sondern nur einzelne Zellen zur histologischen Untersuchung gewonnen. Bei aktuell mangelnder Evidenz in Bezug auf korrekte Früherkennung von oralen Vorläuferläsionen und/oder Karzinomen bietet die bürstenzytologische Untersuchung zum jetzigen Zeitpunkt keinen adäquaten Ersatz zur herkömmlichen Skalpellbiopsie. Sie kann jedoch als ergänzendes diagnostisches Verfahren bei Läsionen unklarer Dignität, die primär nicht die Indikation einer invasiven Biopsie erfüllen, beispielsweise im Rahmen einer Verlaufskontrolle, Anwendung finden [66].

2.3.3 Optische Verfahren

Nicht – invasive, optische Methoden der Frühdiagnostik basieren auf den physikalisch – chemischen Besonderheiten der *Chemolumineszenz* und *Autofluoreszenz* biologischer Substanzen. Lumineszenz beschreibt die Emission elektromagnetischer Strahlung bestimmter Wellenlängen eines physikalischen Systems infolge externer Energiezufuhr. Die von außen zugeführte Energie versetzt das zur Lumineszenz befähigte System in einen angeregten Zustand, bei dem Elektronen auf ein höheres Energieniveau angehoben (promoviert) werden. Abhängig vom zugrundeliegenden Mechanismus der Anregung lassen sich verschiedene Arten der Lumineszenz, darunter Elektrolumineszenz, Chemilumineszenz, Photolumineszenz, Thermolumineszenz und Sonolumineszenz unterscheiden [73].

Im Falle von Chemilumineszenz basiert der oben beschriebene Anregungsmechanismus auf einer chemischen Reaktion. Dieser Effekt findet unter anderem auch in der Forensik und Kriminalistik Anwendung, wo man sich im Rahmen der Spurensicherung die Reaktion der chemischen Verbindung Luminol mit Blutbestandteilen unter Emission von bläulichem Licht zunutze macht. Von medizinischem Interesse ist Chemilumineszenz beispielsweise bei optischen Verfahren zur Detektion entarteter Zellen. Potenziell maligne Epithelzellen mit erhöhtem DNA – Gehalt und gesteigerter Mitoserate können so durch vermehrte Anreicherung chemischer Substanzen wie Essigsäure oder Toluidinblau unter Belichtung mit bestimmten Wellenlängen durch Lumineszenz visuell sichtbar gemacht werden [4].

In der klinischen Anwendung von Chemilumineszenz wird die Mundschleimhaut nach Vorbehandlung mit 1 %iger Essigsäure mit einer speziellen Lichtquelle illuminiert. Unter Beleuchtung mit Wellenlängen von 430 bis 580 nm erscheint gesundes Epithel bläulich, während sich abnorme Keratinisierungen der Mundschleimhaut eher weißlich darstellen sollen. Mit Systemen wie ViziLite® (Zila Pharmaceuticals, Inc., Phoenix, AZ, USA) konnten Sensitivitäten zwischen 77,3 % und 100 %, sowie Spezifitäten von 27,8 % erreicht werden [74]. Die ergänzende Anwendung von Toluidinblau konnte die Spezifität zwar auf etwa 69 % steigern [4], gleichwohl lässt die derzeitige noch unzureichende Datenlage laut aktueller Sk2 – Leitlinie zur „*Diagnostik und Management von Vorläuferläsionen des oralen Plattenepithelkarzinoms in der Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde*“ keine Empfehlung zur routinemäßigen Anwendung im Bereich der Früherkennung oraler Karzinome und deren Vorläuferläsionen zu [66]. Alleinige Intravitalfärbungen mit Toluidinblau stellten sich trotz hoher Sensitivitäten aufgrund der in der Literatur als äußerst variabel beschriebenen Treffsicherheiten als nicht ausreichend verlässlich heraus [75, 76].

Im Gegensatz zur Lumineszenz handelt es sich bei Fluoreszenz um eine Form spontaner Lichtemission nach Anregung durch elektromagnetische Strahlung mit spezifischen

Wellenlängen. Analog zum oben beschriebenen Mechanismus werden in diesem Fall Elektronen durch zuvor absorbierte Photonen auf ein energetisch höherwertiges Orbital promoviert und geben beim Übergang auf ihr energetisches Ausgangsniveau Energie in Form von Wärme und Photonen ab. Das Verfahren der Autofluoreszenz nutzt dabei das natürliche Vorkommen sogenannter Fluorochrome in biologischen Geweben. Diese Moleküle sind in der Lage, einstrahlendes Licht einer bestimmten Wellenlänge zu absorbieren und in Teilen als längerwellige Strahlung zu remittieren. Dabei sind Farbe und Intensität des emittierten Lichts charakteristisch für das jeweilige fluoreszierende Molekül. Häufigster Vertreter dieser Primärfluoreszenz ist der im Pflanzenreich vorkommende Farbstoff Chlorophyll, der aus einem Porphyrinring mit zahlreichen Doppelbindungen besteht und bei Anregung mit grünem Licht stark rot fluoreszierend imponiert [77].

Eine weitere, nicht – invasive Methode zur Untersuchung der Mundschleimhaut bieten Autofluoreszenz – Geräte wie VELscope® (LED Apteryx, Akron, OH, USA) oder das Sapphire® - System (Den-Mat Holdings, Santa Maria, CA, USA). Das VELscope® - Gerät arbeitet mit einer 120W – Bogenlampe, die blaues Licht mit einer Wellenlänge zwischen 400 und 460 nm emittiert. Dieses gefilterte Licht trifft auf die zu untersuchende Mundschleimhaut und führt dort zur Anregung natürlich vorkommender endogener Autofluoreszenzsubstanzen, sogenannter Fluorochrome, die gemäß dem Prinzip der Primärfluoreszenz in der Lage sind, einen Teil des eintreffenden Lichts zu remittieren. Eine Reihe von Fluoreszenzfiltern und dichroitischen Spiegeln gewährleistet einen coaxialen retrograden Strahlengang des remittierten Lichts, welches dann durch das Handgerät erfasst werden kann. Gesundes Epithel erscheint durch das Gerät grünlich fluoreszierend. Aufgrund des spezifischen Absorptionsverhaltens von DNA und einem Fluoreszenzverlust an zerstörtem Stromakollagen imponieren dys- und anaplastische Gewebe dunkel [78].

Entsprechend einer Metaanalyse wird die Sensitivität dieses auf Autofluoreszenz basierten Verfahrens auf 30 – 100 % geschätzt und die Spezifität mit Werten zwischen 15,3 und 100 % angegeben [74]. Zu berücksichtigen sind hier jedoch die geringen Fallzahlen und die ausgeprägte Variabilität der ermittelten Sensitivitäten und Spezifitäten, sodass nicht sicher davon ausgegangen werden kann, dass ein solches System in der Lage ist, insbesondere in Bezug auf Hochrisiko-Läsionen, suffizient zwischen benignen und malignen Schleimhautveränderungen zu differenzieren. In entsprechender Fachliteratur konnte jedoch durchaus gezeigt werden, dass Autofluoreszenz durch visuelles Hervorheben von Mundschleimhautläsionen deren Erkennung vereinfacht und den Behandler so bei Lokalisation und Festlegung der Ausdehnung des Befundes unterstützen kann [79].

Trotz ihrer uneingeschränkten Verfügbarkeit konnten neuartige Screeningmethoden wie die Intravitalfärbung mit Toluidinblau, der Einsatz der Bürstenbiopsie und zytologischer

Untersuchungen sowie die Verwendung moderner optischer Verfahren wie der Autofluoreszenz nicht zu einer nachweisbaren Verbesserung der Früherkennung von Malignomen führen. Dies belegen im Besonderen die gleichbleibend hohen Inzidenzraten oraler Plattenepithelkarzinome in fortgeschrittenen Stadien, sodass die aktuelle S3 – Leitlinie zur *Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms* aufgrund fehlender wissenschaftlicher Evidenz und unter Berufung auf aktuelle Übersichtsarbeiten [35] kein effektives Screening – Programm mit oben genannten Methoden zum Nachweis oder zur Früherkennung von Malignomen im Kopf – Hals – Bereich empfiehlt [33].

2.4 Hyperspectral Imaging (HSI)

Der Begriff „Hyperspektralbildgebung“ wurde erstmals 1985 von Goetz et al. im Zusammenhang mit bildgebenden Spektrometrieverfahren zur Erdfernerkundung beschrieben. Die von Goetz et al. beschriebene Spektrometrietechnik nutzte den mehrdimensionalen Charakter des aufgenommenen Spektraldatensatzes durch viele schmale, zusammenhängende Spektralbänder im sichtbaren und im von der Sonne reflektierten Infrarotbereich zur genaueren, kontaktlosen Untersuchung der Beschaffenheit der Erdoberfläche anhand hyperspektraler Datensätze [80].

Die einfachste Aufnahmeform bildgebender Verfahren stellt ein Farbfilm mit drei Bändern (rot, grün, blau; RGB) dar. Je höher die Anzahl der Bänder und je schmaler deren Bandbreite ist, desto höher ist die spektrale Auflösung eines Sensors. Es lassen sich anhand dieser Eigenschaft panchromatische Systeme mit je einem Spektralkanal von multispektralen Systemen mit zwei bis circa 10 Kanälen und Hyperspektralsysteme, welche zehn bis weit über hundert Spektralkanäle besitzen können, unterscheiden (Abbildung 1) [81].

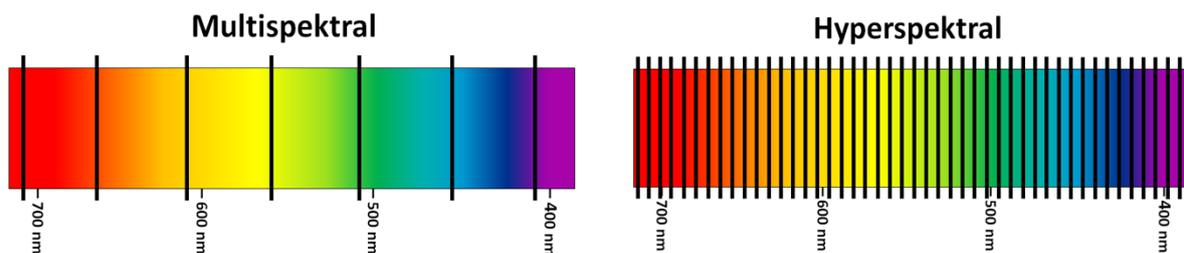


Abbildung 1 Beispiele für spektrale Auflösung: **links** multispektrale Auflösung mit 7 - 11 Bändern, **rechts** hyperspektrale Auflösung mit 46 Bändern

Das Prinzip der hyperspektralen Bildverarbeitung (Hyperspectral imaging, HSI) kombiniert konventionelle Bildgebung mit modernen Spektroskopieverfahren und ist damit in der Lage, neben dem für das menschliche Auge visuell sichtbare RGB (rot, grün, blau) – Spektrum zwischen 400 und 700 nm, auch elektromagnetische Wellenlängen von > 740 nm und deren spektrale Informationen zu detektieren [17]. Hyperspektrale Bildgebung basiert auf dem Grundsatz, dass jedes Material ein für sich charakteristisches Maß an Lichtreflexion, Absorption und Streuung verursacht. Durch das von der Hyperspektralkamera erfasste Gesamtspektrum ist es so möglich, verschiedene Materialien und Stoffe anhand ihrer spezifischen spektralen Signaturen zu identifizieren. Die jedem einzelnen HS – Pixel zugeordneten Vektoren von Strahlungswerten lassen neben Rückschlüssen auf chemische Materialzusammensetzungen auch Aussagen über deren genaue Lokalisation zu [82]. Hyperspektrale Sensorsysteme erzeugen bei Auftreffen elektromagnetischer

Wellenstrahlung eine dreidimensionale Datenstruktur, einen so genannten *Hyperspectral cube* (HS – cube). Dieser Datenwürfel enthält neben räumlichen Informationen der ersten beiden Dimensionen auch die spektralen Informationen der dritten Dimension [17]. Jedes Pixel des erzeugten Datenwürfels beinhaltet die lokal bezogenen Informationen in Form einer komplexen spektralen Signatur, die in ihrer Länge der Anzahl der Spektralbänder des HS – Würfels entspricht. Abbildung 2 veranschaulicht, wie sich infolgedessen anhand der gewonnenen Daten zu jeder erfassten Wellenlänge ein charakteristisches Graustufenbild mit den räumlichen Bildinformationen, ähnlich einem Voxel, korrelieren lässt.

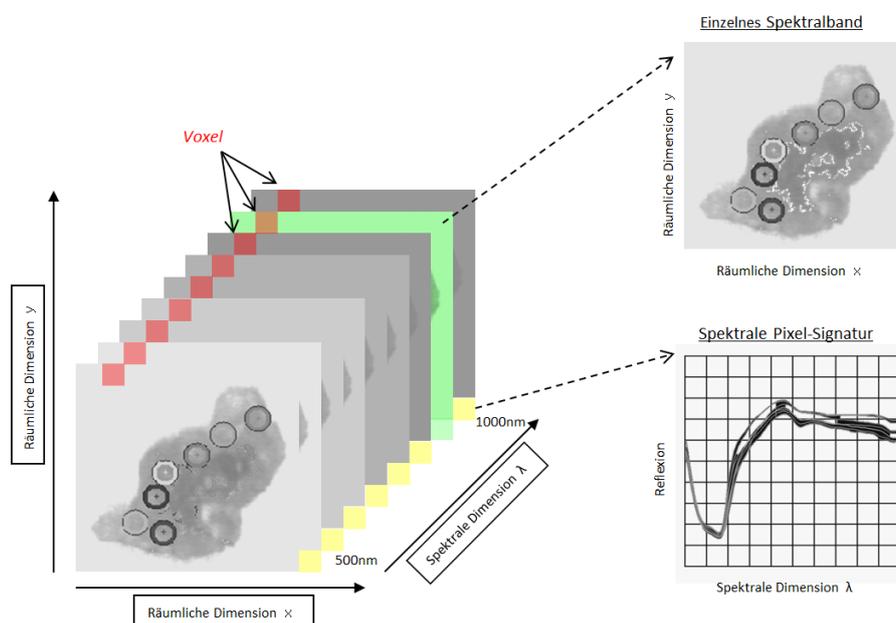


Abbildung 2 Hyperspektrale Bilddaten, Struktur eines HS-Datenwürfels, Einzelbanddarstellung und spektrale Signatur eines Pixels,

Das Verfahren der hyperspektralen Bildgebung findet bereits im Rahmen der Qualitätskontrollen von Lebensmitteln, im Besonderen der von Fleischprodukten [82], Anwendung. Andere Einsatzbereiche sind unter anderem die oben beschriebene Erdfernerkundung [80, 83]. Aufgrund ihrer *non – invasiven*, kontaktlosen und strahlungsfreien Eigenschaften bietet das Hyperspectral imaging im medizinischen Sektor einen neuen, innovativen Ansatz bei der Identifikation und Erforschung von Krankheiten. In der Literatur beschriebene medizinische Anwendungsgebiete der Hyperspektraltechnik sind beispielsweise die Verlaufsbeurteilung von Wunden [12, 84-87], die intraoperative Visualisierung von Blutgefäßen zu deren zuverlässigeren Lokalisation und Differenzierung [88], sowie als ergänzendes Hilfsmittel bei der Erkennung intestinaler Ischämien während

viszeralchirurgischer Eingriffe [89]. Einen weiteren, prioritären Forschungsbereich stellt das perioperative Monitoring mikrovaskulär anastomosierter Lappenplastiken [13, 14, 90] dar. Unter Berücksichtigung der Erkenntnis, dass jedes Material und Gewebe über ein spezifisches spektrales Reflexions- und Absorptionsmuster verfügt, ist es aktuellen Studien gelungen, charakteristische Spektralsignaturen (spectral signatures) von Tumor- und Normalgewebe zu identifizieren und diese zur Gewebediskriminierung zu nutzen. Anhand der beschriebenen Methodik ließen sich durch den Einsatz der Hyperspektralbildgebung, verglichen mit Normalgewebe, signifikante Abweichungen in den spektralen Signaturen von maligne transformiertem Gewebe, unter anderem im Gehirn [91, 92], Gastrointestinaltrakt [93-95], Cervix, Colon [96, 97], Prostata im Mäusemodell [98] und Oesophagus [16, 99] nachweisen.

Im Bereich der Kopf – Hals – Onkologie sind besonders die Detektion von Malignomen durch Analyse hyperspektraler Bilddaten mithilfe automatisierter, künstlicher neuronaler Netzwerke und Deep Learning Mechanismen von hochaktueller Bedeutung. Halicek und Lu et al. konnten an einem Kollektiv von 50 Patienten im Rahmen chirurgischer Tumorsektionen im Kopf – Hals – Bereich 88 Gewebeproben mittels Hyperspektralbildgebung analysieren. Ein trainiertes künstliches neuronales Netzwerk konnte Tumorgewebe mit 81 % Sensitivität, 78 % Spezifität und insgesamt 80 % Genauigkeit eigenständig identifizieren [100]. Weitere Arbeiten konnten in ähnlichen Ansätzen mit Hilfe von künstlichen neuronalen Netzwerken und Support Vector Machines (SVMs) eine Klassifizierung und Diskriminierung verschiedener Tumorzelltypen (darunter Colon, Mamma, Pankreas, Gallengang und epithelassoziierte Tumore) mit Genauigkeiten von durchschnittlich 73 bis 88,9 % leisten [101]. Alleinstellungsmerkmale des Hyperspectral imaging sind neben den multifunktionellen Einsatzmöglichkeiten in Forschung und Klinik der nichtinvasiven und kontaktlosen Workflow, unter Verzicht ionisierender Strahlung und jedweder Form der Gewebemarkierung.

Das Ziel der vorliegenden Studie war es, mithilfe der Hyperspektralbildgebung, möglichst viele Proben der untersuchten Gewebeklassen *Fett*, *Muskel* und *oraler Schleimhaut* anhand ihrer charakteristischen Hyperspektralsignaturen, automatisiert durch ein künstliches neuronales Netzwerk zu klassifizieren. Hierdurch soll die methodische Machbarkeit nachgewiesen werden, eine „Hyperspektraldatenbank“ soll zukünftig die Grundlage und Referenz für weiterführende Untersuchungen und Forschungsvorhaben in Hinblick auf die hyperspektrale Differenzierung pathologischer und gesunder Gewebeklassen sein. In Zukunft wäre hierdurch eine non – invasive, kontaktlose Analyse und ergänzende Risikobeurteilung von unklaren Schleimhautveränderungen, Resektionsrändern und Nachresektaten auf Grundlage sowohl in – vivo, als auch ex – vivo erhobener hyperspektraler Gewebesignaturen möglich.

2.5 Histologie

2.5.1 Mundschleimhaut

Die die Mundhöhle bedeckende Schleimhaut, lateinisch *Tunica mucosa oris*, lässt sich funktionell in die Bereiche der auskleidenden, mastikatorischen und spezialisierten Mundschleimhaut unterteilen und erscheint im gesunden Zustand makroskopisch rosafarben und durchfeuchtet. In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich Proben auskleidender Mundschleimhaut, hauptsächlich aus den Bereichen des *Planum buccale*, des Mundbodens und der Zungenunterseite sowie des Weichgaumens zur weiteren Analyse entnommen.

Die in diesen Bereichen vorliegende Schleimhaut weist, verglichen mit Schleimhaut aus anderen Bereichen der Mundhöhle, ein dickeres Epithel zwischen 0,1 und 0,5 mm, längere Reteleisten und ein lockeres Corium auf. Entgegen der meisten Schleimhäute aus dem Gastrointestinaltrakt besteht die auskleidende Mundschleimhaut aus mehrschichtigem, unverhorntem Plattenepithel und zeigt im histologischen Schnitt einen charakteristischen, vierschichtigen Aufbau aus *Stratum basale*, *Stratum spinosum*, *Stratum intermedium* und *Stratum superficiale* [102]. Die Zellen des *Stratum basale* imponieren histologisch in säulenartig angeordneter, kubischer bis hochprismatischer Form. Diese nicht vollständig differenzierten, der Basallamina aufliegenden Epithelzellen bestehen aus adulten Stammzellen mit hoher mitotischer Aktivität, von denen die kontinuierliche Erneuerung des Epithels ausgeht. Über Hemidesmosomen sind diese Zellen mit der Basallamina verankert. Das angrenzende *Stratum spinosum* ist in der Regel mehrere Zellschichten dick und bildet eine Zone, in der neue Epithelzellen differenzieren. Im *Stratum intermedium* finden sich glykogenreiche Zellen mit zunehmend pyknotischen Zellkernen, deren Anzahl zum *Stratum superficiale* hin zunimmt.

In den meisten Bereichen der Mundhöhle ist eine Submukosa nicht oder nur in geringem Maße vorhanden und dient als Bindegewebskompartiment in erster Linie der Befestigung der *Lamina propria* an darunter gelegenen Knochen oder Skelettmuskeln. Ausnahmen bilden *Planum buccale*, Lippen und Teile des Gaumens, in denen eine submuköse Bindegewebschicht vorhanden ist. In dieser Schicht befinden sich zahlreiche Blutgefäße, Nerven und Lymphgefäße, wie auch Fettgewebe und kleinere Speicheldrüsen (Abbildung 3) [103].

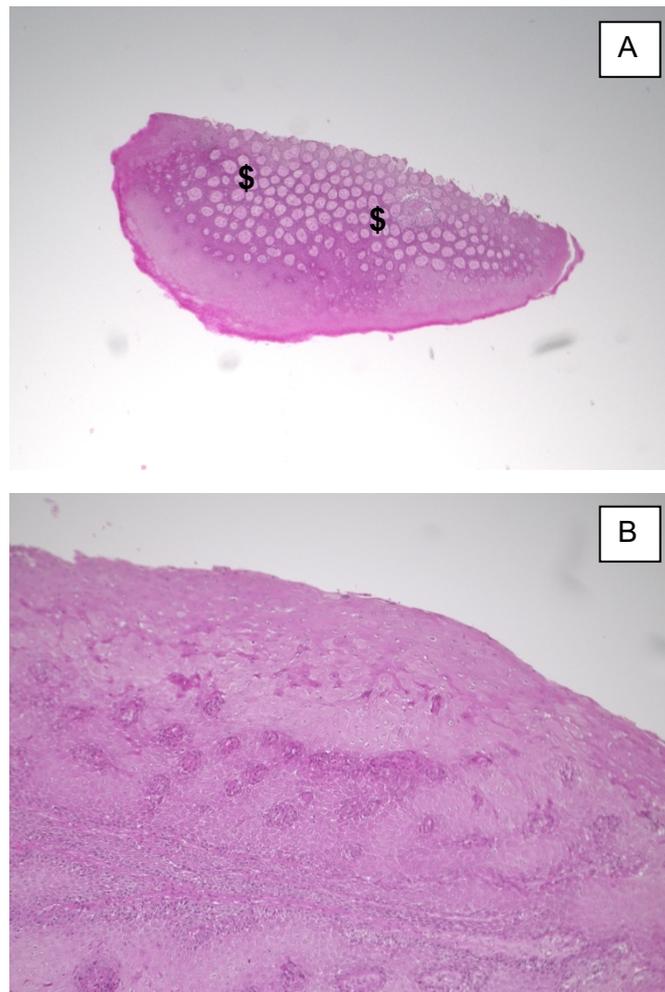


Abbildung 3 Auskleidende Mundschleimhaut, nicht verhornt. **(A)** orales Epithel mit Anteilen submuköser Speicheldrüsen (\$), **(B)** typische Schichtung des Schleimhautepithels

2.5.2 Fettgewebe

Fettgewebe ist eine besondere Form des Bindegewebes und kommt fast im gesamten Körper, eingelagert in das lockere Bindegewebe, vor. Zu seinen Hauptaufgaben zählen die Energiespeicherung in Form von Triacylglyceriden, die Wärmedämmung des Körpers, sowie mechanische- und stoffwechselphysiologische Funktionen. Es lassen sich zwei Formen des Fettgewebes unterscheiden: braunes, plurivakuoläres- und weißes, univakuoläres Fettgewebe. In dieser Studie wurden lediglich Proben univakuolären, weißen Fettgewebes analysiert, die aus der Kopf – Hals – Region entnommen wurden. Im histologischen Schnitt zeichnet sich weißes Fettgewebe durch eine hexagonale, siegelringähnliche Konfiguration der einzelnen Adipozyten aus. Die ausgereiften Fettzellen besitzen einen großen zentralen,

membranlosen Fetteinschluss, der das Zytoplasma und den abgeplatteten Zellkern an den Rand der Zellen verdrängt, wo sie von einer Basallamina mit retikulären Kollagenfasern umhüllt werden. Im histologischen Routinepräparat wird das Fett vollständig aus dem Gewebe herausgelöst, sodass ein ungefärbter Hohlraum in der Zelle entsteht, der als (Fett-)Vakuole bezeichnet wird (Abbildung 4) [104].

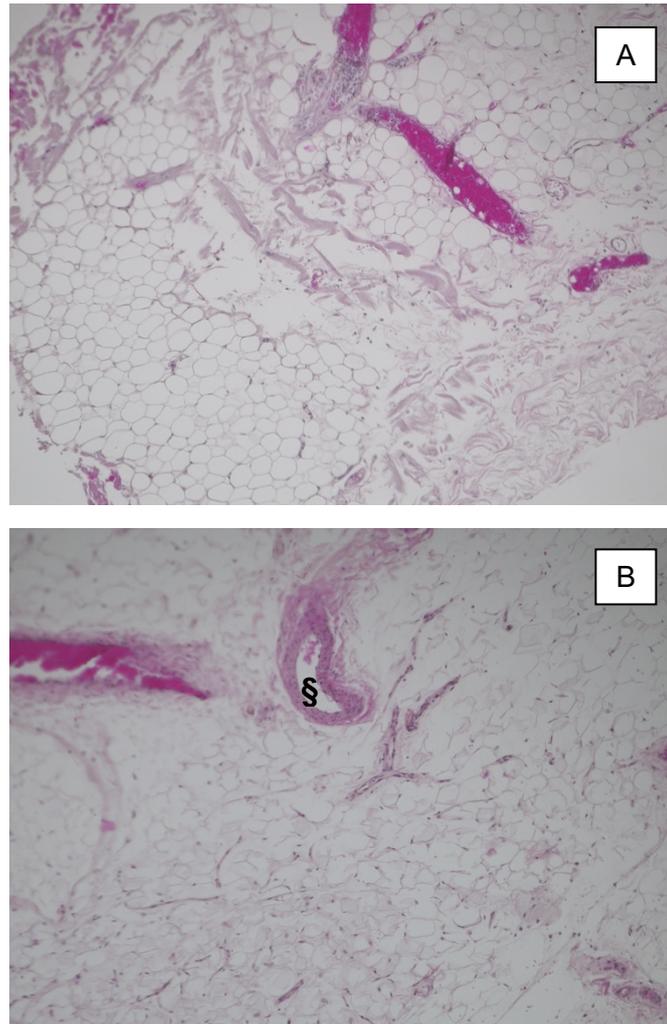


Abbildung 4 (A) Weißes, univakuoläres Fettgewebe der Wange mit typischen Fettvakuolen und **(B)** des Kinns, angeschnittenes Blutgefäß (§)

2.5.3 Skelettmuskulatur

Muskelzellen sind besonders auf die charakteristische Funktion der Kontraktilität spezialisiert und können je nach Trainingsgrad und Alter bis zu 40 % des Körpergewichtes eines Menschen ausmachen. Abhängig von ihren physiologischen und histologischen Eigenschaften lassen sich drei Arten von Muskelgewebe unterscheiden: die quergestreifte Skelettmuskulatur, die quergestreifte Herzmuskulatur und die glatte Muskulatur. Der kontraktile Apparat ist in allen Muskelgeweben aus filamentärem Aktin und Myosin II aufgebaut und lediglich in der quergestreiften Skelettmuskulatur willkürlich innerviert [104]. Bei den in dieser Arbeit der Hyperspektralanalyse unterzogenen Gewebeproben handelt es sich um Biopsate von Skelettmuskeln aus den Bereichen Kopf und Hals. Nachfolgend soll näher auf die Gruppe der quergestreiften Skelettmuskulatur eingegangen werden.

Namensgebend ist das histologische Erscheinungsbild, das in Skelett- und Herzmuskeln aufgrund der streng parallel angeordneten Aktin und Myosinfilamente die Darstellung der typischen Querstreifung erzeugt. Im histologischen Schnitt sind große, vielkernige und lange Synzytien mit randständigen, länglich abgeflachten Zellkernen kennzeichnend für quergestreifte Muskelzellen. Mehrere solcher länglichen Muskelzellen bilden gemeinsam funktionelle Einheiten, so genannte Muskelfasern, von mehreren Zentimetern Länge und ca. 40 – 100 µm Durchmesser [104, 105]. In Abbildung 5 sind exemplarisch zwei histologische Schnittbilder quergestreifter Muskeln aus der Mundhöhle dargestellt.

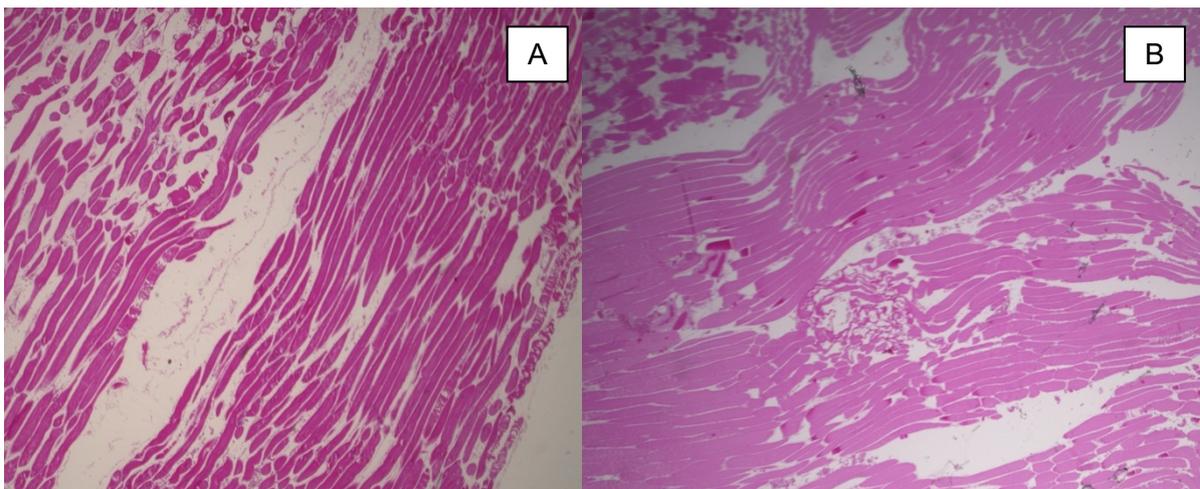


Abbildung 5 (A) Proben quergestreifter Muskels des M. digastricus und **(B)** des M. masseter

3 Material und Methoden

In dieser prospektiven, nicht – randomisierten, experimentellen Studie wurden menschliche, überschüssige Gewebeproben intraoperativ entnommen und mittels Hyperspektralbildgebung (HSI) gescannt. Die Studie wurde von der lokalen Ethikkommission des Landes Rheinland-Pfalz genehmigt (Registrierungsnummer 2020-14952) und gemäß dem Protokoll und in Übereinstimmung mit den moralischen, ethischen und wissenschaftlichen Grundsätzen für die klinische Forschung, wie in der Deklaration von Helsinki von 1975 in der überarbeiteten Fassung von 1983 festgelegt ist, durchgeführt.

3.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Hyperspektralkamera TIVITA® – Tissue – System	Diaspective Vision GmbH, Pepelow, Deutschland
Fluoreszenz – Phasenkontrast – Mikroskop BZ-9000E	Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland
HistoCore AUTOCUT Rotationsmikrotom	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland

3.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Deckgläser 21 x 26mm Stärke 1	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Objektträger geschnitten mit Mattrand 76 x 26 mm	Diagonal GmbH & Co. KG, Münster, Germany
Gewebe – Einbettkassetten	KABE LABORTECHNIK GmbH, Nürnbrecht, Deutschland
ES Kompresse	PAUL HARTMANN AG, Heidenheim, Deutschland

3.3 Chemikalien

Material	Hersteller	Verwendungszweck
Aqua dest. Ampuwa für Spülzwecke Plastipur	Fresenius Kabi Deutschland GmbH	Dehydrierung
Ethanol 70% verg.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	Dehydrierung / Rehydrierung

Ethanol 96% verg.	Martin Mundo oHG, Mainz-Kostheim, Deutschland	siehe Ethanol 70 %
Ethanol 99,5% reinst	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	siehe Ethanol 70 %
Eukitt® Schnelleinschlussmittel	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	siehe Ethanol 70 %
Mayers Hämalaulösung	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	Kernfärbung HE
Eosin 1%, wässrig	MORPHISTO GmbH, Offenbach, Deutschland	Gewebeanfärbung
Roti®Histol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	Entparaffinierung / Eindeckmedium
Roti®Histofix 4,5%	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	Fixierung Gewebe

3.4 Gewebeproben

Bei den untersuchten Gewebearten handelt es sich um quergestreifte Muskulatur, Fett und Mundschleimhaut. Dies sind jene Gewebestrukturen, welche bei chirurgischen Eingriffen im Kopf-Halsbereich am häufigsten freigelegt werden. Insgesamt wurden 316 Gewebeproben von 117 verschiedenen Patienten, darunter n = 97 Fettgewebeproben, n = 101 Proben quergestreifter Muskulatur und n = 118 Proben oraler Schleimhaut zur Untersuchung eingeschlossen. Zu den operativen Eingriffen, bei denen die oben genannten Gewebeproben gewonnen wurden, gehörten unter anderem die Resektionen maligner Kopf-Hals-Tumore (zumeist oraler Plattenepithelkarzinome) mit sich in häufigen Fällen anschließender Lymphadenektomie (Neck – Dissection) und optionaler Rekonstruktion mittels mikrovaskulärer Lappentransplantate (darunter fasziokutane Transplantate wie Radialis- und Ulnaris – Lappen, myokutane Latissimus dorsi Transplantate oder osteomyokutane Rekonstruktionen durch Fibula- oder Skapula Transplantaten); die osteosynthetische Versorgung von Frakturen im Bereich des Gesichtsschädels, dentoalveoläre Eingriffe (darunter Extraktionen und Osteotomien von Zähnen sowie Zystektomien), Abszessinisionen von intra- und extraoral, mono- und bimaxilläre Umstellungsosteotomien, chirurgische Gaumennahtweiterungen (GNE), sowie autologe osteoplastische Augmentationstechniken mit mehrheitlich primärer Knochenentnahme aus dem vorderen Beckenkamm.

Entsprechend der eingeschlossenen Operationsgebiete stammen n = 65 (67,1 %) der n = 97 zur Untersuchung eingeschlossenen Fettgewebeproben aus dem Kopfbereich und n = 32 (32,9 %) aus der Halsregion (Abbildung 6).

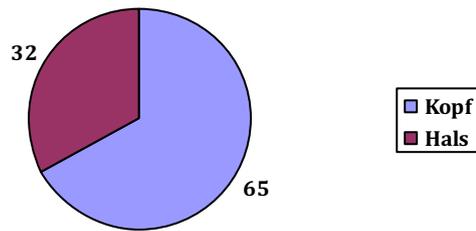


Abbildung 6 Entnahmestellen Fettgewebe

Bei den untersuchten Muskelproben (n = 101) handelt es sich ebenfalls um Gewebe aus dem Kopf-Hals-Bereich (Kopf: n = 73 (72,3 %), Hals: n = 28 (27,7 %); Abbildung 7).

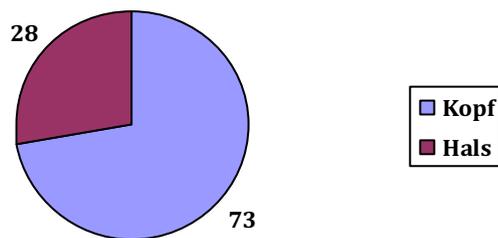


Abbildung 7 Entnahmestellen Muskelgewebe

Die in die Analyse einbezogenen Mundschleimhautproben (n = 118) wurden jeweils aus Arealen der auskleidenden Mundschleimhaut, ferner aus Wangeninnenseite, Mundvorhof und Mundboden, Zungenunterseite sowie Weichgaumen entnommen.

Gewebeproben, die makroskopisch durch die Verwendung von bipolaren und / oder monopolaren Kautern beschädigt waren, wurden von der Studie ausgeschlossen. Um Messfehler durch Blutrückstände und andere Verunreinigungen zu vermeiden, wurden die Gewebeproben vor genauerer Untersuchung in einer 0,9 %igen Kochsalzlösung gereinigt und auf sterilen Kompressen entfachtet.

3.5 Verarbeitung der hyperspektralen Bilddaten

Im Anschluss an die Entnahme erfolgte die Hyperspektral – Aufnahme (Hyperspectral Imaging, HSI) der jeweiligen Gewebeproben. Die hyperspektralen Bilder wurden mit dem TIVITA® – Tissue – System (Diaspective Vision GmbH, Pepelow, Deutschland) aufgenommen. Das spektroskopische Messverfahren beruht auf dem Prinzip der bildgebenden Remissionsspektroskopie. Dabei werden physikalische Gesetzmäßigkeiten genutzt, denen zufolge *Absorption und Reflexion* des eintreffenden Lichtes, abhängig von der Gesamtheit der farbgebenden, funktionellen Atom- und Ionengruppierungen der bestrahlten chemischen Verbindung, dem sogenannten Chromophor, sind. Hiervon zu unterscheiden sind auxochrome, elektronenabgebende Gruppen (Z.b. $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$ und $-\text{O}^-$), die das Absorptionsmaximum in den längerwelligen Bereich des Spektrums verschieben, von antiauxochromen Gruppen ($-\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{NH}_3^+$ und NO_2), welche als Elektronenakzeptoren fungieren und gemeinsam mit den Auxochromen den bathmochromen Effekt verstärken [106]. Zudem besteht ein unmittelbarer Zusammenhang zwischen den strukturellen Eigenschaften des bestrahlten Gewebes und dem Maß der daraus resultierenden *Lichtstreuung*. Vereinfacht dargestellt basiert das HSI also auf der Auswertung von zusammenhängenden Spektren, i.e. Licht unterschiedlicher Wellenlängen, das von Molekülen individuell remittiert wird, wobei das jeweilige molekulspezifisch remittierte Wellenspektrum auf Basis des initial bei der Untersuchung und Messung emittierten Lichtspektrums der verwendeten Lichtquelle generiert wird.

Die Gewebeproben wurden sofort nach der Entnahme *ex vivo* mit 0,9%iger Kochsalzlösung (Fresenius Kabi Deutschland GmbH, NACL 0,9%, 1000ML, PLASTIPUR®) gewaschen und noch intraoperativ gescannt, um Beeinträchtigungen der Gewebequalität durch Dehydratationsprozesse zu vermeiden. Die Belichtung der entnommenen Gewebeproben erfolgte mit sechs gleichmäßig um das Kameraobjektiv angeordneten breitbandigen 20 Watt Halogen – Lichtquellen. Um exakte und reproduzierbare Messungen zu gewährleisten, wurden die entnommenen Gewebeproben zum Zeitpunkt der HSI – Aufnahme jeweils in identischer Position mittig auf einer weißen Kompresse (PAUL HARTMANN AG, Heidenheim, Deutschland) platziert und alle zusätzlich im Raum befindlichen Lichtquellen ausgeschaltet. Durch zwei separate Indikatorlaser (rotes Laserfadenkreuz und grüner Laserpunkt in überlappender Position, bei der sich der grüne Laserpunkt in der Mitte des roten Fadenkreuzes befindet) wurden stets ein Standardmessabstand von 47,5 cm sowie ein Standardmesswinkel von 90° eingehalten (Abbildung 8).

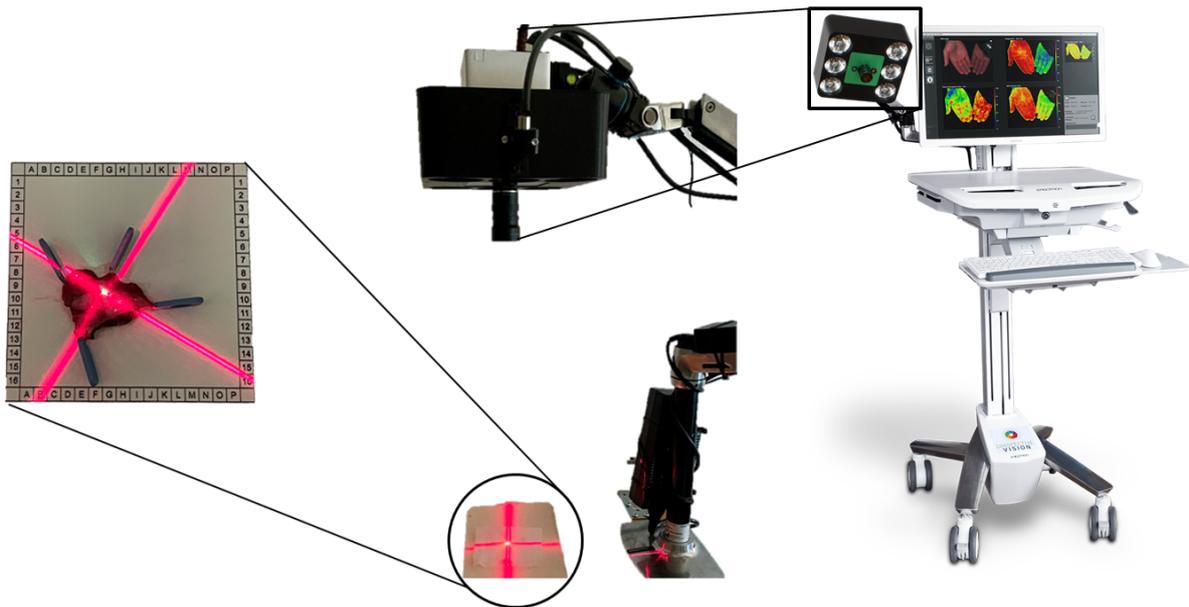


Abbildung 8 Indikatorlaser bei Messvorgang einer Gewebeprobe

Die Belichtungszeit betrug sechs Sekunden, gefolgt von zehn Sekunden Mess- und Verarbeitungszeit. Das auf das Messobjekt eintreffende Licht wird zu Teilen absorbiert, gestreut oder reflektiert. Letzterer, remittierter Anteil, wurde nach Transflexion durch das Probenmaterial von dem parallel dazu ausgerichteten TIVITA® – System in seine spektralen Anteile zerlegt und mittels einem radiometrisch kalibrierten 32 – Bit Komplementärmetalloxid – Halbleiterspektrometer, welches Bilder mit einer Auflösung von 640 x 480 Pixeln erfasst, aufgenommen. Die räumliche Auflösung des eingesetzten CMOS – Sensors betrug 22 μm (Abbildung 9).

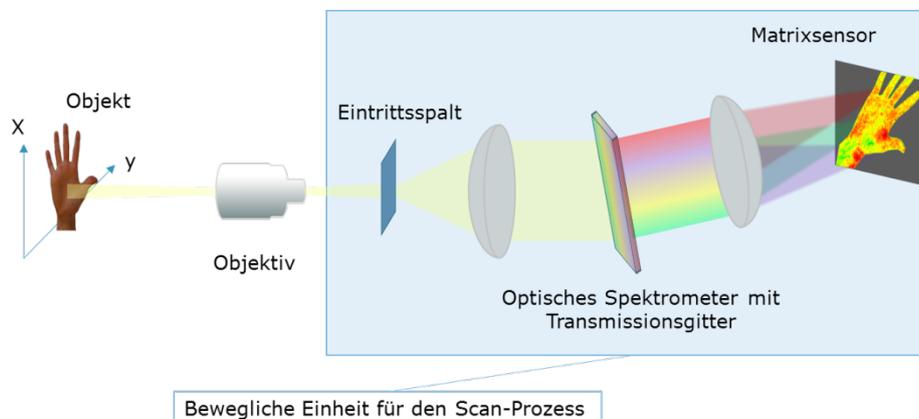


Abbildung 9 Schematischer Aufbau der TIVITA®-Tissue Hyperspektralkamera

Das remittierte Licht zwischen 500 und 1000 nm Wellenlänge wurde vom Sensor aufgenommen und ein hyperspektraler Datenwürfel (3D – Cube, Hypercube) aus jeweils zwei Dimensionen $H(x,y)$ visuell sichtbaren Lichts (VIS) und einer spektralen Dimension $H(\lambda)$ generiert [84]. Jede spezifische Koordinate, respektive jeder definierte Ortspunkt (Pixel, Voxel) im erzeugten Hyperspektraldatenwürfel enthielt 100 Wellenlängen eines Lichtspektrums zwischen 500 und 1000 nm (Abbildung 10). Dies entspricht einem Messintervall von 5 nm [107]. Pro Pixel erfasste das TIVITA® – System folglich je ein komplettes Spektrum im visuell sichtbaren Bereich (VIS) zwischen 500 und 780 nm und eines im nahinfraroten (NIR) Spektralbereich bis 1000 nm Wellenlänge. Die erfassten remittierten Spektren waren so in ihrer charakteristischen Konfiguration repräsentativ für das individuelle Reflexionsspektrum des gemessenen Gewebe-Chromophors.

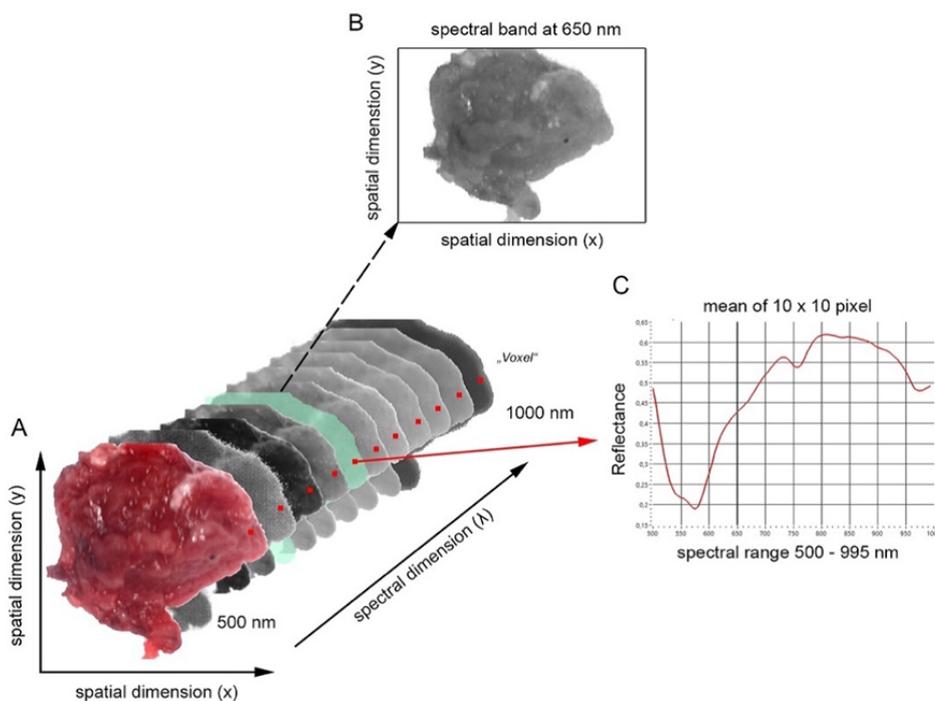


Abbildung 10 (A) Probe eines quergestreiften Muskels in räumlicher und spektraler Dimension, (B) zweidimensionales Graustufenbild bei 650 nm und (C) Reflexionsgrad einer ausgewählten Region von Interesse (ROI; roter Punkt) von 500nm bis 995 nm **D.G.E. Thiem**

Bei der durchgeführten Gewebeanalyse waren diverse, die Messung beeinflussende Faktoren zu berücksichtigen. So werden die vom hyperspektralen Bildgebungssystem erfassten Reflexionsspektren unter anderem durch den Gehalt des Pigmentstoffes Melanin der Haut (Abbildung 11), der Dicke des gemessenen Gewebes, des Blutvolumens und der Sauerstoff (O_2) – Sättigung der Dermis sowie der gewebespezifischen Streuung des einfallenden Lichts, beeinflusst [108]. Ferner ist eine absolute Quantifizierung der Messtiefen dieses Systems nicht uneingeschränkt möglich, da diese von zahlreichen Faktoren, darunter der Beschaffenheit des gemessenen Gewebes und der Wellenlänge des zur Messung verwendeten Lichts abhängig sind. So ist die Gewebeabsorption bei dem im VIS-Bereich eingesetzten Wellenlängenspektrum um ein Vielfaches höher als jene im NIR-Bereich und infolgedessen nicht über das eingesetzte Gesamtspektrum konstant. Die Eindringtiefe von einstrahlendem Licht auf die Haut nimmt von blau (450 nm) bis NIR (> 750 nm) zu und kann näherungsweise mit Werten von 0,1 bis 6 mm angegeben werden [87].

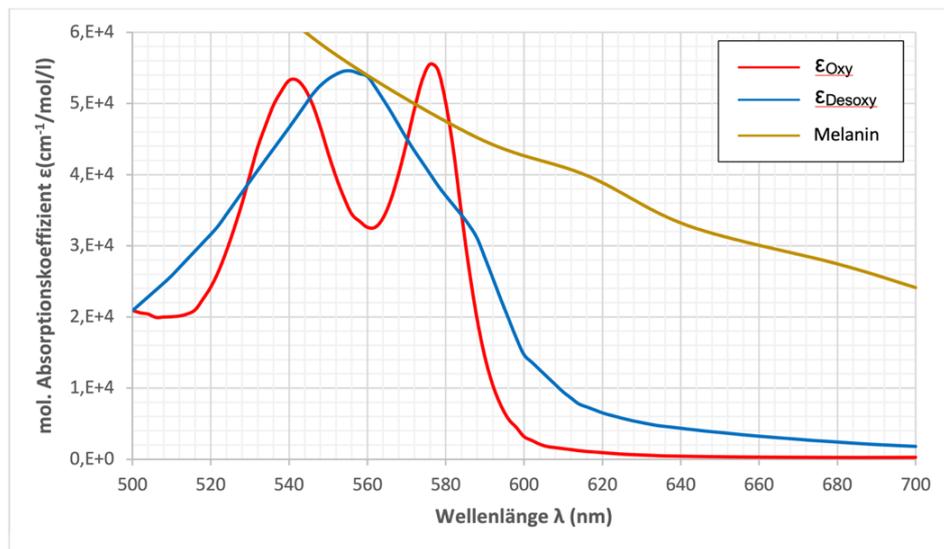


Abbildung 11 Absorptionsspektren von Melanin [1], oxygeniertem- und desoxygeniertem Hämoglobin zwischen 500 nm und 700 nm Wellenlänge [2]

3.6 Histologie

Nach Durchrührung der HSI-Aufnahmen wurden die Präparate für die histologische Prozessierung vorbereitet. Dazu wurden die Proben zunächst in Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet und anschließend mithilfe eines Mikrotoms in 5 µm Stufenschnitten weiterverarbeitet, auf Objektträger aufgebracht und mit Hämatoxylin - Eosin (H & E) gefärbt. Nach Digitalisierung der Objektträger mit einem vollautomatischen invertierten Fluoreszenz – Phasenkontrast – Mikroskop (BZ-9000E, Keyence, Deutschland GmbH, Neu-Isenburg) erfolgte die Untersuchung der Proben hinsichtlich ihrer Gewebezusammensetzung und die Einteilung in die drei definierten Untersuchungsklassen Fett-, Muskel- und Mundschleimhautgewebe (Abbildung 12). Ferner wurden, um repräsentative und vergleichbare Messergebnisse zu generieren, die prozentualen Anteile von Fett- und Muskelzellen an der gesamten Gewebeprobe berechnet- und Gewebeproben der Mundschleimhaut auf Entzündungsfreiheit untersucht. Proben mit inhomogener Gewebezusammensetzung, beispielsweise ausgeprägte Fettanteile auf Muskelproben, die über 5 % der untersuchten Präparateoberfläche ausmachten, wurden, um Ergebnisverzerrungen zu vermeiden, von der weiteren Auswertung ausgeschlossen. Gleiches galt für durch bi- oder monopolarer Kauter beschädigte Gewebeproben.

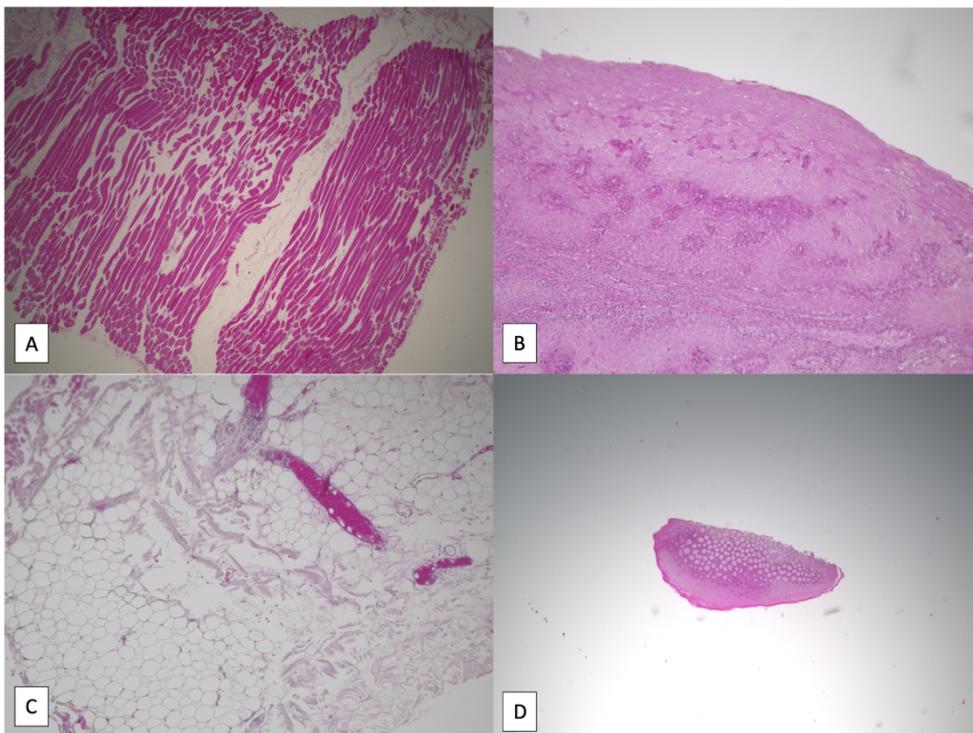


Abbildung 12 (A) Histologischer Schnitt eines Muskels, (B) oraler Mundschleimhaut, (C) Wangenfett und (D) Schleimhaut mit angeschnittenen Drüsenanteilen

3.7 Auswertung der Gewebeproben

Um ausreichend Trainingsdaten für ein neuronales Netzwerk zu erhalten, wurden 316 Gewebeproben von 174 verschiedenen Patienten entnommen, mittels HSI gescannt und histologisch aufgearbeitet. Nach mikroskopischer Begutachtung konnten die gewonnenen Proben eindeutig jeweils den Untersuchungsklassen Fett, Muskel oder Mundschleimhaut zugeordnet werden. Insgesamt konnten 97 Fettgewebe-, 101 Muskel- und 118 Mundschleimhautproben in die Untersuchung einbezogen werden. Zur Bildanalyse und Auswertung der Rohdaten wurde das kameraspezifische Softwarepaket (TIVITA® M Suite, Diaspective Vision GmbH, Pepelow, Deutschland) verwendet. Nach Korrektur überbelichteter Bereiche wurden sieben bis acht manuell positionierte, kreisförmige Messbereiche von Interesse (Regions of Interest; ROIs) in einer Größe von ca. 10 x 10 Pixeln gleichmäßig über die Oberfläche der Gewebeproben verteilt, wobei ihre Anzahl immer in Abhängigkeit zur vorliegenden Oberflächengeometrie stand. Um eine möglichst homogene Verteilung der gemessenen Fläche zu erreichen, sollten die ROIs entlang des Randes und mindestens eine ROI in der Mitte der Probe liegen. In Abbildung 13 ist beispielhaft die Platzierung von sieben ROIs auf einer gemessenen Muskelgewebeprobe veranschaulicht. Aus diesen Messpunkten wurde anschließend das arithmetische Mittel berechnet, um ein für die jeweilige Probe repräsentatives Messergebnis zu erhalten.

Das berechnete arithmetische Mittel entsprach folglich den mit der HSI – Kamera im Hypercube erfassten, wellenlängenspezifischen Reflexionswerten der gesetzten Messpunkte auf der untersuchten Gewebeprobe. Um die Ausgangsdatenmenge des vorliegenden Datensatzes zur späteren Analyse durch ein künstliches neuronales Netzwerk weiter zu steigern, wurde in der finalen Auswertung im Sinne einer „Image Subdivision“ Datenaugmentation jede einzelne positionierte ROI als individuelle Probe gewertet. So konnte die Anzahl an Trainingsdatensätze für ein künstliches neuronales Netzwerk, das auf die automatisierte Erkennung der Gewebe anhand ihrer charakteristischen hyperspektralen Reflexionssignatur trainiert wurde, künstlich, ausgehend von 316- auf insgesamt 2.214 Proben, erhöht werden. Anhand der erzeugten Hyperspektraldatensätze und der anschließenden Auswertung war es daraufhin möglich, Normwerte für den Reflexionsgrad der unterschiedenen Gewebeklassen für den Wellenlängenbereich von 500 bis 1000 nm zu definieren (Abbildung 13).

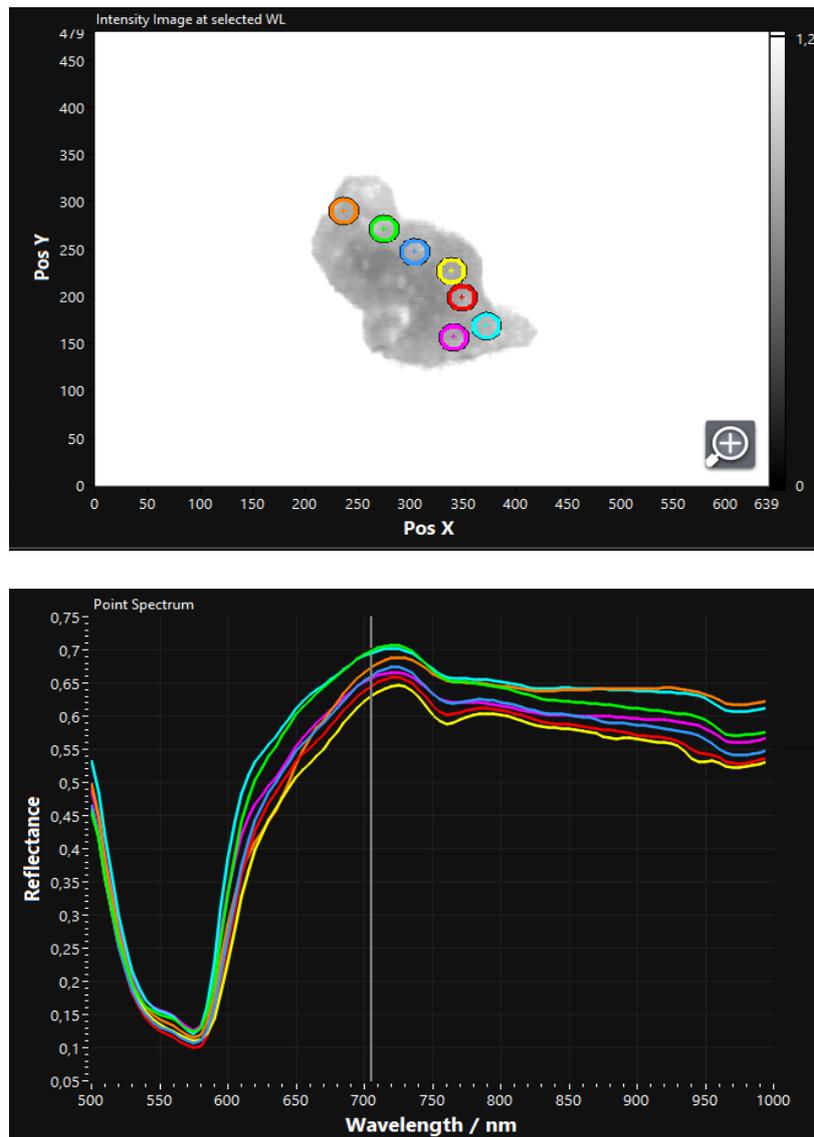


Abbildung 13 (Oben) Beispielhafte Darstellung der Auswertung einer Muskelprobe mit einem zweidimensionalen Graustufenbild bei 705 nm und manuell platzierten Regions of Interest, **(unten)** der mittlere Reflexionsgrad als Liniendiagramm bei verschiedenen Wellenlängen.

3.8 Statistik

Die Rohdatensätze wurden tabellarisch unter Nutzung von Excel® (Microsoft Corporation, Redmond, USA) gespeichert und anschließend in SPSS Statistics® (Version 23.0.0.2, MacOS X; SPSS Inc., IBM Corporation, Armonk, NY, USA) übertragen. Die Daten wurden als Mittelwert (M), Standardabweichung (SD±), Minimum (min), Maximum (max) und Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Die Normalverteilung wurde mit dem nichtparametrischen Kolmogorow-Smirnow-Test (KS-Test) überprüft und die Ergebnisse wurden mittels Varianzanalyse (ANOVA^(#)), ungepaarten nicht-parametrischen Mann-Whitney-U-Tests = ^(§) und Students t-Test^(*) auf statistische Signifikanz überprüft. P-Werte von $\leq 0,05$ wurden als signifikant gewertet. Da eine Fallzahlberechnung im Rahmen dieser Proof-of-Principle-Studie nicht praktikabel ist, orientiert sich diese Arbeit an ähnlichen Proof-of-Concept Publikationen, die mit vergleichbaren Gruppengrößen arbeiteten [26, 27]. Zur Veranschaulichung der Datensätze wurden Liniendiagramme verwendet.

3.9 Künstliche Neuronale Netzwerke und Deep Learning

Als maschinelles Lernen wird der Prozess bezeichnet, bei dem ein Computer eigenständig algorithmisch, mithilfe von Beispielen, Muster und Zusammenhänge in großen Datensätzen erkennt. Ziel dieses Verfahren ist es, mithilfe von Algorithmen und vorgegebenen Trainingsdaten ein statistisches Modell zu implementieren, welches in der Lage ist, Regeln und Gesetzmäßigkeiten für den eingegebenen Datensatz zu definieren und auf Grundlage dieser Paradigmen Prognosen über bislang unbekannte Zusammenhänge ermöglicht [109]. Es handelt sich hierbei um ein Modell des autonomen Lernens aus Erfahrung. Während dieses Prozesses wird das verwendete Programm durch selbstständiges Lernen an vorgegebenen, auf den Eingabedaten basierenden Trainingsbeispielen, versuchen, die Fehlerwahrscheinlichkeit der individuell festgelegten Aufgabenstellung kontinuierlich durch Fehlerberechnungen und Optimierung der zur Analyse verwendeten Parameter zu reduzieren. Diese eigenständige Lernfähigkeit stellt die wichtigste Eigenschaft eines künstlichen neuronalen Netzwerkes (KNN) dar.

Bei maschinellem Lernen lassen sich verschiedene Trainingsmodi wie *überwachtes*- und *unüberwachtes* Lernen unterscheiden. Ersteres, in der vorliegenden Studie angewendetes Modell, wird dabei anhand von ihm zuvor bekannten Ergebnissen trainiert, die Lücke zwischen Ein- und Ausgabeschicht (s.u.) möglichst effizient schließen, während bei unüberwachten Lernmodellen die Lösungen der Fragestellungen völlig unbekannt sind und zunächst eine Erkundung des Datensatzes durch den implementierten Algorithmus erfordern

[110]. Künstliche neuronale Netzwerke sind ein Modell des maschinellen Lernens und ähneln in ihrem Aufbau grob dem biologischen Vorbild des menschlichen Gehirns. Als kleinste Struktureinheit des informationsverarbeitenden Netzwerkes fungiert das so genannte künstliche Neuron (Abbildung 14).

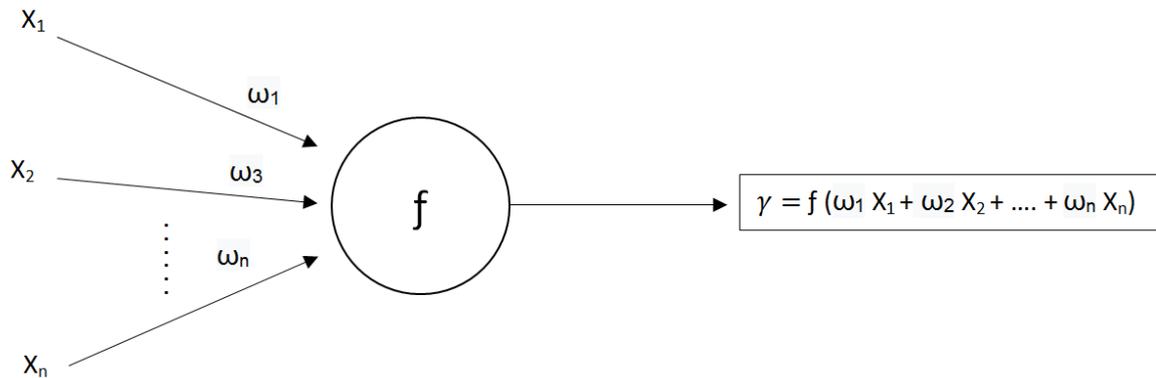


Abbildung 14 Aufbau eines künstlichen Neurons

Analog zur biologischen Struktur einer Nervenzelle finden sich mehrere gerichtete Eingabesignale (x_i , Dendriten), die mit Gewichtungsfaktoren (ω_i , Synapsen) multipliziert werden, welche, abhängig von ihrem mathematischen Vorzeichen ($+ / -$), entweder aktivierend (exzitatorisch) oder hemmend (inhibitorisch) wirken können. Durch eine Eingabefunktion $p(x_1, \dots, x_n)$ werden alle eintreffenden Signale zu einem Gesamteingabesignal, ähnlich der Summation an einer Nervenzelle, zusammengefasst und anschließend mit einer Aktivierungs- bzw. Transferfunktion ($f(p(x_1, \dots, x_n))$, Berechnungs- / Zellkörper) bestimmt, ob ein Ausgabesignal y generiert wird oder nicht. In der Gesamteinheit des künstlichen neuronalen Netzwerkes können zahlreiche dieser Untereinheiten in Schichten (s.g. *Layers*) zusammengefasst werden. Es ergeben sich auf der einen Seite des KNN eine Eingabeschicht (*Input Layer*) zur Eingabe der vom Netzwerk zu lösenden Problemstellung und auf der anderen Seite eine Ausgabeschicht (*Output Layer*) [111]. Zwischen Ein- und Ausgabeschicht eines KNN liegen häufig eine beliebige Anzahl versteckter Schichten (*Hidden Layers*). Existieren mehrere dieser versteckten Schichten, spricht man von einem tiefen neuronalen Netzwerk. Ein Signal erreicht das Neuron der Eingabeschicht als externe Information, die nach oben genannter Verarbeitung im nächsten Schritt wiederum erneut als Eingabesignal an das Neuron der nächsttiefergelegenen Schicht weitergeleitet wird. Diesem Modell folgend stehen die Neuronen der Hidden Layers, im Gegensatz zu denen der Ein- bzw. Ausgabeschicht, nicht mit externem In- oder Output in Verbindung (Abbildung 15) [112]. Mehrere dieser Schichten lassen sich zu so genannten Blöcken zusammenfassen, die zu mehreren repetitive Strukturen in größeren Modellen bilden.

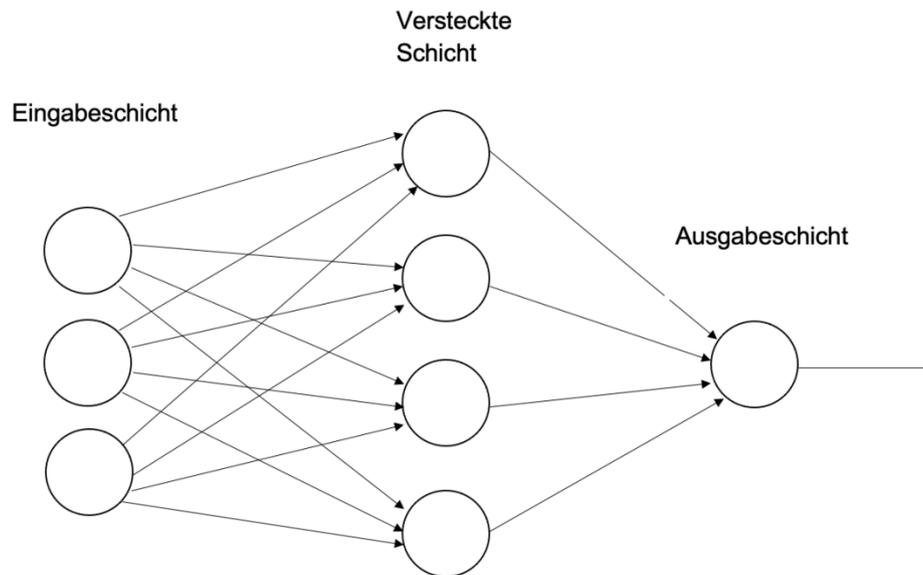


Abbildung 15 Aufbau eines dreischichtigen künstlichen neuronalen Netzes

3.10 Auswertung der Daten

Die automatisierte Analyse und anschließende Klassifikation der Fett-, Muskel- und Schleimhautproben in dieser Studie wurde mit einem sechs Schichten tiefen, neuronalen Netzwerk, basierend auf H2O Flow, durchgeführt. Für die Durchführung der Experimente wurde ein Hochleistungs – Notebook unter Windows 10 Professional mit 16 GB RAM und einer NVIDIA Quadro T1000 GPU verwendet.

Die verarbeiteten Trainingsdaten wurden im Verhältnis 85 : 8 : 7 (Training, Validierung, Test) aufgeteilt. Zur Anpassung der Gewichtung im neuronalen Netz wurden die Trainingspatches verwendet. Darüber hinaus wurden Validierungspatches zur Optimierung der Hyperparameter und Testpatches zur Bewertung und Kontrolle des angepassten Modells genutzt. Das Verfahren zur Aufteilung der Daten wurde nach dem Ansatz der Leave – One – Patient – Out Kreuzvalidierung durchgeführt. Dieses neuronale Feed – Forward – Netz wurde schrittweise in Mini – Batches von 64 numerischen Patches mit einem Patienten – ID basierten, stratifizierten Kreuzvalidierungsparadigma für 16.000 Epochen unter Verwendung von Early stopping Mechanismen trainiert. Zur Festlegung der initialen Gewichtungen wurde eine gleichmäßige adaptive Verteilung verwendet. Um die Standardisierung des Verfahrens zu verbessern, wurde eine Dropout – Rate von 30 % nach der ersten- und 20 % nach der zweiten und dritten versteckten Schicht festgelegt und jedes Neuron mit einer gleichgerichteten linearen Einheit (ReLU) aktiviert (Abbildung 16).

Layer	No. of neurons	Dropout	Regularization	Activation
Input	100	0		
FC_1	60	0.3	0.005	ReLU
FC_2	40	0.2	0.005	ReLU
FC_3	30	0.2	0.005	ReLU
FC_4	18	0	0.005	ReLU
Output	3		0.005	Softmax

Abbildung 16 Neuronale Netzwerkarchitektur implementiert für medizinische Klassifizierung von numerischen Patches mit H2O-Flow

Der Trainingsprozess wurde mit ausgeglichenen Klassen und einer adaptiven Lernrate für die stochastische Gradientenoptimierung mit einer Dynamik von 0.99 und einem Glättungsfaktor von 1×10^{-8} ausgeführt [113]. Ferner wurden L1- und L2 – Regularisierungsterme von jeweils 5×10^{-3} zur Verringerung des Kreuzentropieverlustes, wie in Abbildung 18 dargestellt, angewandt. Vor dem Training wurden festzulegende Hyperparameter wie die Architektur des neuronalen Netzes, die Dropout – Rate, die Aktivierungsfunktion, die mit der Lernrate korrespondierenden Parameter, Regularisierungsterme und Batchgröße mit Hilfe systematischer Gittersuchtechnik und unter Berücksichtigung des Overfitting Gap zwischen Trainings- und Validierungsverlusten definiert und angepasst. Nach jeweils 200 Trainingsepochen wurde die Validierungsleistung des Netzwerkes geprüft. Auf Shuffling wurde wegen der höheren Verlustrate verzichtet. Die an letzter Stelle stehende Output – Schicht prognostizierte anhand Transformation der finalen Werte in eine kategoriale Wahrscheinlichkeitsverteilung durch eine Softmax – Funktion die Inputdaten im Hinblick auf die höchste anzunehmende Wahrscheinlichkeit jeder definierten Gewebeklasse (Abbildung 16). Das Testverfahren endet, wenn die Trainings- und Validierungsverluste gleichermaßen konvergieren. Wie in Abbildung 18 dargestellt, generalisiert das eingesetzte Modell schnell. Die Leistung des tiefen neuronalen Netzwerkes wurde anhand des optimalen Checkpoints evaluiert, der auf vollständig unabhängige Testdaten angewendet wurde, um die Genauigkeit zu berechnen (Abbildung 17).

$$Accuracy = \frac{TP + TN}{Total\ No.\ of\ patches}$$

$$Specificity = \frac{TN}{TN + FP}$$

$$Sensitivity = \frac{TP}{TP + FN}$$

Abbildung 17 Formeln zur Berechnung der Genauigkeit (Accuracy), Spezifität (Specificity) und Sensitivität (Sensitivity)

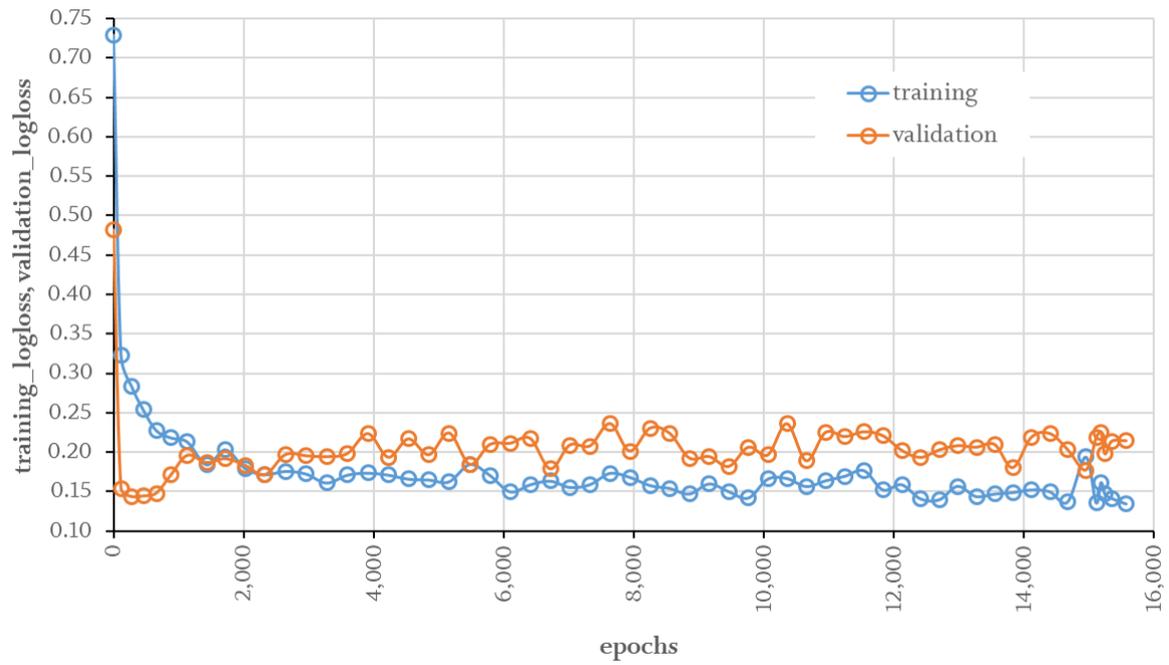


Abbildung 18 Trainingsergebnisse und Validierungsverlust für 16.000 Epochen. Validierungsverluste werden als Durchschnitt über alle 6 Schichten angegeben.

4 Ergebnisse

4.1 Spektrale Gewebesignaturen

Die aus der hyperspektralen Bildverarbeitung der analysierten Proben gewonnenen, für jede Gewebeklasse spezifischen spektralen Signaturen sind in Abbildung 19 dargestellt. Eingeschlossen wurden 316 Gewebeproben von insgesamt 117 verschiedenen Patienten.

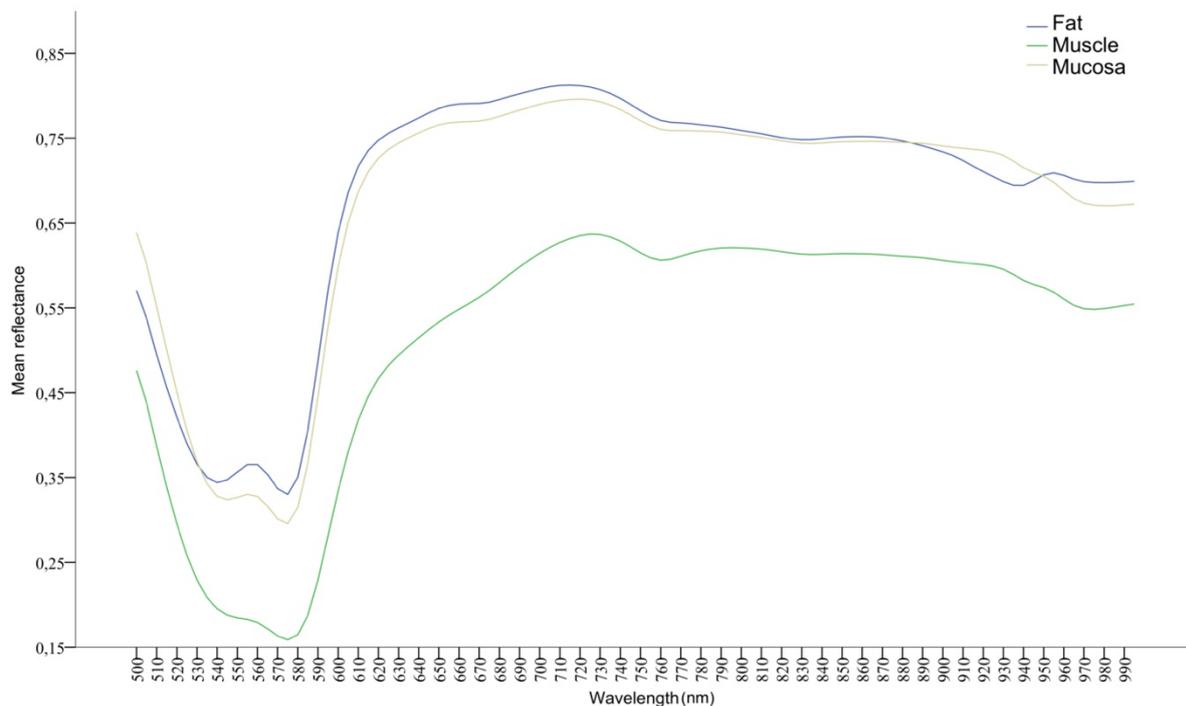


Abbildung 19 Gemittelte Reflexionswerte der unterschiedlichen Gewebeproben, aufgetragen gegen die gemessenen Wellenlängen 500 bis 990 nm. Diese wurden in die Untersuchungsgruppen Fett (**Gruppe 1, dunkelblau**), Muskel (**Gruppe 2, grün**) und orale Mucosa (**Gruppe 3, gelb**) unterteilt.

Insbesondere im Wellenlängenbereich zwischen 500 und 640 nm zeichnet sich eine Differenz der messbaren reflektierten Lichtmenge der verschiedenen Gewebeklassen ab (Abbildung 19). So weisen die gemessenen Proben bei 540 und 580 nm deutliche Absorptionspeaks auf. Die gemittelten Reflexionswerte der Muskelgruppe betragen bei 540 nm $\approx 19\%$ und bei 575 nm $\approx 16\%$ und unterscheiden hinsichtlich der gemessenen Werte von den anderen Untersuchungsklassen Fett und Mundschleimhaut. Das Reflexionsspektrum der untersuchten Fettproben beträgt gegenüber den oben genannten Absorptionspeaks $\approx 35\%$ bei 540 nm und $\approx 33\%$ bei 575 nm. Die spektralen Signaturen der Mundschleimhautproben weichen mit $\approx 32\%$ bei 540 nm und $\approx 29\%$ bei 575 nm geringfügig von denen der Fettanalysen ab. Beim Vergleich von Fett (Gruppe 1) und Muskel (Gruppe 2), sowie Muskel (Gruppe 2) und Schleimhaut (Gruppe 3), unterscheiden sich die mittleren

Reflexionswerte bei allen Wellenlängen signifikant ($p < 0.001$). Im Gegensatz dazu erscheinen die spektralen Signaturen von Fett (Gruppe 1) und Schleimhaut (Gruppe 3) in der grafischen Übersicht deutlich ähnlicher, unterschieden sich aber dennoch bei den meisten Wellenlängen (500 bis 520 nm, 545 bis 590 nm und 900 bis 990 nm) signifikant ($p < 0.001$).

4.2 Künstliches Neuronales Netzwerk

Die Menge an Trainingsdaten für ein neuronales Netzwerk und die Verteilung auf die Gewebeklassen sind in Tabelle 1 dargestellt. In die Analyse eingeschlossen wurden 97 Fettgewebe-, 101 Muskel- und 118 Schleimhautproben. Wie zuvor bereits in Abbildung 16 veranschaulicht, wurde für die durchgeführte Studie eine light-weight architecture implementiert. Die Klassifizierungsergebnisse wurden anhand der in Tabelle 2 angegebenen Werte auf der Grundlage allgemein gebräuchlicher Gleichungen [18] berechnet. Das etablierte neuronale Netzwerk war in der Lage, 80 der getesteten Fettproben korrekt als solche zu klassifizieren (Sens 0.98). In der Testgruppe wurden zwei Gewebeproben fälschlicherweise als Schleimhaut erkannt (Error 0.02). In der Untersuchungsgruppe der Schleimhautproben wurden 94 Samples richtig erkannt (Sens 0.92). Bei einem vorliegenden Klassifizierungsfehler von 8 % wurden sieben Proben als Muskel und eine Probe als Fett fehlinterpretiert (Error 0.08). Die größte Diskrepanz der autonomen Gewebeerkennung konnte in der Muskelgruppe nachgewiesen werden. In dieser Gruppe wurden 72 Proben korrekt als Muskelgewebe zugeordnet (Sens 0.84), wobei 12 der analysierten Spektralmuster der Gruppe Schleimhaut- und zwei der Gruppe Fettgewebe zugeordnet wurden (Error 0.16).

Gewebeklasse	Anzahl an Gewebeproben (n)	Gesamt – Patches (m)
Fett	97	681
Muskel	101	707
Schleimhaut	118	826

Tabelle 1 Trainingsdaten pro Gewebeprobe

	Fett	Muskel	Schleimhaut	Error
Fett	80	0	2	0.02
Muskel	2	72	12	0.16
Schleimhaut	1	7	94	0.08
Gesamt	83	79	108	

Tabelle 2 Konfusionsmatrix für die Klassifizierung von Gewebeproben. Tatsächliche Klassen werden zeilenweise und vorhergesagte Klassen spaltenweise angegeben.

Tabelle 3 zeigt die Ergebnisse und Testdaten der automatisierten Gewebeerkennung des eingesetzten Neuronalen Netzwerks von 21 zufällig gewählten Proben an einem definierten Prüfpunkt nach 15.577 Trainingsepochen (siehe Abbildung 18), untergliedert nach der jeweiligen Gewebeklasse, sowie Genauigkeit, Spezifität und Sensitivität. Es lassen sich für alle Gewebeproben der Untersuchungsklasse Fett hohe Sensitivitäten und Spezifitäten von jeweils 100 % nachweisen. Die automatisierte Gewebeerkennung in der Untersuchungsgruppe Muskel weist eine Spezifität von 67 % und eine Sensitivität von 86 % auf. In der ausgewählten Testgruppe konnten für orale Schleimhaut Spezifitätswerte von 80 % und Sensitivitätswerte von 57 % erzielt werden.

Gewebeklasse	Proben	Acc	Spec	Sens
Fett	7	1.00	1.00	1.00
Muskel	7	0.81	0.67	0.86
Schleimhaut	7	0.81	0.80	0.57

Tabelle 3 Ergebnisse der Auswertung von 21 Gewebeklassen mit unabhängigen Testdaten am Prüfpunkt nach 15.577 Epochen. Die Werte werden als klassenabhängige Klassifizierungsergebnisse angegeben (Acc = Genauigkeit, Spec = Spezifität, Sens = Sensitivität).

5 Diskussion

Die Therapie von Patienten mit malignen Tumoren der Mundhöhle ist vor allem in frühen Stadien hinsichtlich der Überlebens- und Rezidivrate sowie der weiteren Lebensqualität effektiv und erfolgversprechend. So konnte bei Patienten, die konsequent Kontroll- und Vorsorgeuntersuchungen beim behandelnden Spezialisten wahrnehmen und infolgedessen im Falle einer malignen Transformation früh einer adäquaten Therapie zugeführt werden konnten, eine signifikant höhere 5 – Jahres – Überlebensrate nachgewiesen werden als bei Patienten, die sich einem regelmäßigen Recall entzogen [35, 62, 63, 66, 67]. Eine besondere Herausforderung stellt dabei die korrekte Beurteilung und differenzierte Einordnung von physiologischen Gewebeständen und potenziell malignen Läsionen, die ein erhöhtes, malignes Transformationsrisiko zum oralen Plattenepithelkarzinom (PECA) aufweisen, dar. Obwohl bereits weniger- und gänzlich *non-invasive* Untersuchungsmethoden, darunter bürstenzytologische- oder optische Verfahren wie Gewebeautofluoreszenz- und Lumineszenz, entwickelt wurden, bleibt die chirurgisch-invasive Probenentnahme mit anschließender histopathologischer Gewebeuntersuchung nach heutigem Stand weiterhin der Goldstandard in der Primärdiagnostik potentiell maligner Schleimhautläsionen und Tumoren der Mundhöhle [33, 66].

Hyperspectral Imaging ist eine vollständig nichtinvasive, berührungslose und strahlenfreie optische Modalität, anhand derer es möglich ist, Gewebe in unterschiedlicher Gewebetiefe durch Bestrahlung mit Licht aus dem visuell sichtbaren (VIS) und dem Nahinfrarotbereich (NIR) hinsichtlich ihres charakteristischen Absorptions- und Reflexionsverhaltens zu untersuchen. Auf Grundlage der vorliegenden Arbeit ist es möglich, gesunde Gewebeproben der untersuchten Gewebegruppen Fett, Muskel und oraler Schleimhaut anhand ihrer spezifischen Hyperspektralsignatur mit Wahrscheinlichkeiten von > 80 % korrekt zu identifizieren. Dieses Modell ermöglicht darüber hinaus im Hinblick auf zukünftige Projekte einen Vergleich der erhobenen Referenzdaten mit denen dysplastischer und potenziell maligner Gewebeveränderungen. Dadurch wären auf Basis weiterer Forschung zeitsparende und nichtinvasive (Verlaufs-)Kontrollen unklarer Schleimhautveränderungen sowie die intraoperative Beurteilung von Tumorresektionsrändern und Nachresektaten in Echtzeit denkbar, was zur Verbesserung in der Früherkennung und Therapie von Mundhöhlenmalignomen beitragen könnte. Dies wiederum könnte helfen, die im Rahmen der notwendigen Therapie für den Patienten äußerst relevanten Faktoren der tumorbedingten Mortalität und Morbidität maßgeblich zu reduzieren [18, 114].

5.1 Analyse spektraler Gewebesignaturen

Die zur Analyse eingeschlossenen Proben wurden im Anschluss an die intraoperative Entnahme, wie zuvor beschrieben der Hyperspektralaufnahme mit dem TIVITA® – Tissue – System unterzogen.

Der Raum, in dem die Hyperspektralkamera positioniert wurde, befand sich zum Zeitpunkt der Messung immer in einem abgedunkelten Zustand. Die Belichtung der Proben erfolgte einheitlich mit sechs im Kameragehäuse befindlichen 20 Watt Halogenlampen und einer Belichtungszeit von ca. zehn Sekunden. Es ist allerdings nicht gänzlich auszuschließen, dass auch andere im Raum befindliche Lichtquellen das Messergebnis möglicherweise geringfügig beeinflusst haben. Weitere, die Messwerte beeinflussende Variablen sind die manuell erfolgte Platzierung der ROI's auf den Gewebeproben und der einzustellende Messwinkel. Ferner ist auch aufgrund des von der Beschaffenheit und der Farbe abhängigen Absorptionsverhaltens des Messuntergrunds, auf welchem die entnommene Gewebeprobe zum Zeitpunkt der Messung platziert wurde, von Relevanz. Im hier vorliegenden Versuchsaufbau wurde die Hyperspektralmessung zu oben genannten Modalitäten auf einer weißen Mullkompressen durchgeführt. Das auf das Messobjekt eintreffende Licht der Halogenlichtquellen wurde gemäß optisch – physikalischer Grundsätze zu Teilen absorbiert, gestreut oder reflektiert. Dabei war der für die resultierenden Messwerte entscheidende Lichtanteil derjenige, der nach Durchdringen der Probe vom jeweiligen Untergrund reflektiert - und nach erneuter Durchstrahlung des Probenmaterials durch den Hyperspektralsensor detektiert wird. Dieser Vorgang der doppelten Durchstrahlung wird Transflexion genannt [115].

Im Verlauf der Datenakquise ließ sich im Rahmen weiterer, ergänzender Versuche feststellen, dass der zuvor beschriebene physikalische Vorgang der Transflexion insbesondere bei dunklem stärker Licht absorbierenden Untergrund, Einfluss auf die gemessenen Reflexionsspektren nimmt (Abbildung 21).

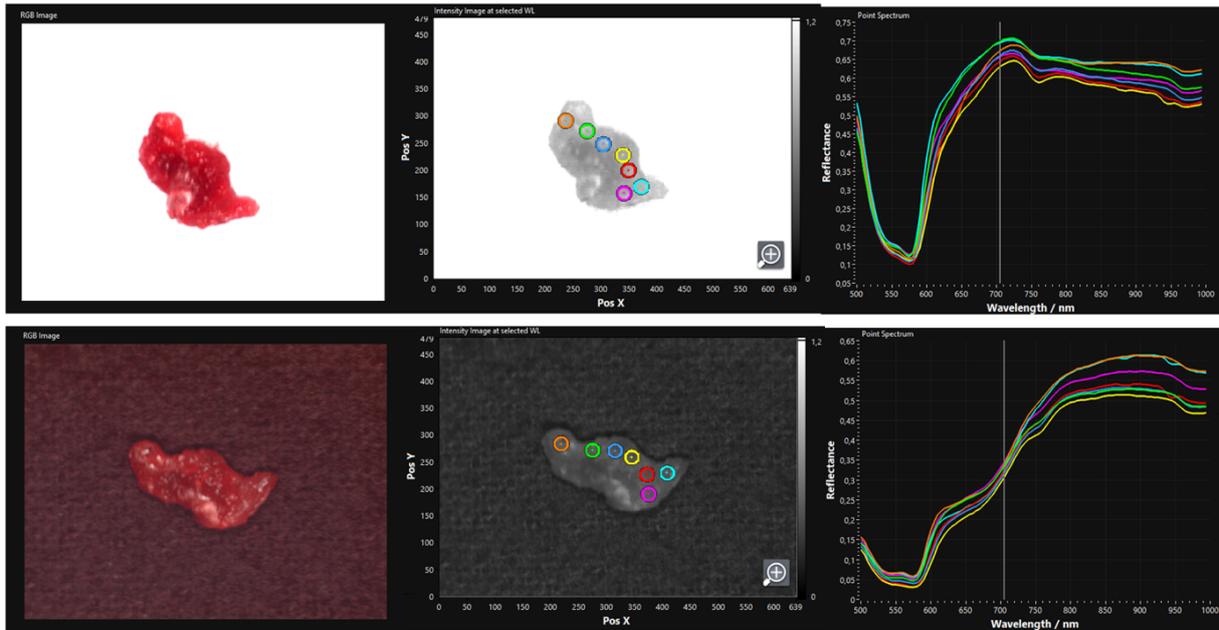


Abbildung 20 (Oben) Reflexionsspektren einer Muskelprobe auf weißem- und **(unten)** schwarzem Untergrund. **Links:** RGB-Bild, **Mitte:** Platzierung ROI's, **Rechts:** Reflexionsmuster

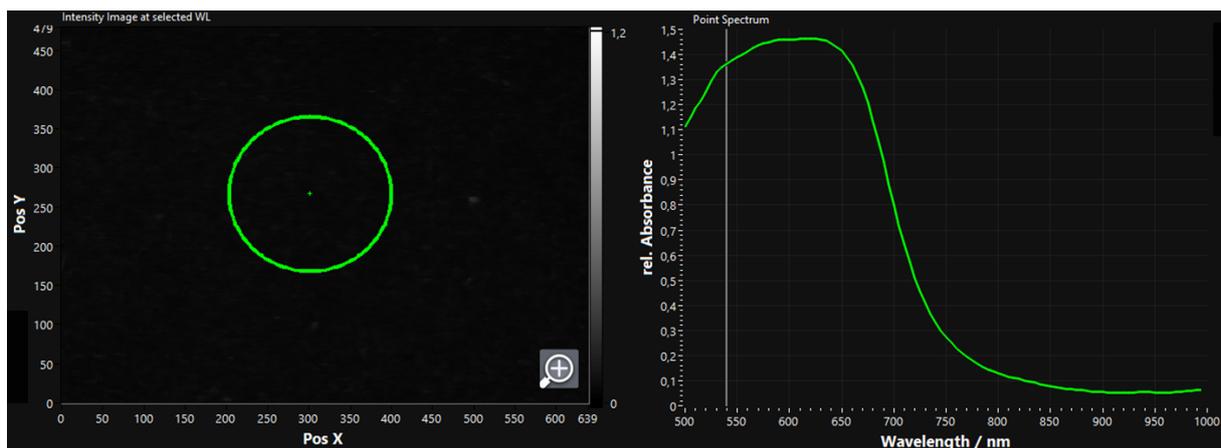


Abbildung 21 Absorptionsspektrum des schwarzen Messhintergrunds aus Abb. 20 als Referenz

Abbildung 20 zeigt eine intraoperativ entnommene Muskelprobe mit regulären, zu den vorliegenden Ergebnissen kongruenten Reflexionsmuster zwischen 500 und 1000 nm auf weißem Untergrund (oben). Im unteren Abschnitt deutlich zu erkennen ist – bei identischer Positionierung der Messpunkte (ROI'S) – eine ausgeprägte Abweichung der resultierenden Reflexion auf Grund des stärker absorbierenden, schwarzen Messhintergrunds. Insbesondere im Bereich des Übergangs zum und im nahen Infrarotbereich ist der auf weißem Hintergrund gemessene, charakteristische steile Anstieg, gefolgt von einer negativen Krümmung und einem nach initialer Plateaubildung abnehmendem Verlauf deutlich abgeflacht und im höherwelligen Bereich stärker divergierend. Kongruent hierzu weisen die Reflexionswerte über das gesamte gemessene Spektrum niedrigere Werte auf. Da alle 316 in diese Studie eingeschlossenen Gewebeproben ausnahmslos auf gleichen,

weißen Kompressen desselben Herstellers gemessen wurden, wird dies in der weiteren Auswertung als fortlaufende Fehler gewertet. In Abbildung 21 ist die spezifische Eigenabsorption des schwarzen Messhintergrunds aus Abbildung 20 als Referenz über das gemessene Gesamtspektrum von 500 bis 1000 nm dargestellt.

5.2 Hyperspektralsignaturen der verschiedenen Gewebeklassen

Die gemittelten Reflexionswerte der analysierten Gewebeproben zeigen über große Teile des untersuchten Wellenlängenspektrums zwischen 500 und 1000 nm signifikante Unterschiede. Am auffälligsten ist die Divergenz der gemessenen Werte der Muskelgruppe verglichen mit derer der anderen Untersuchungsgruppen Fett und Schleimhaut. Die Reflexionsabweichung beträgt im gesamten Wellenlängenspektrum mit hoher Signifikanz ($p < 0.001$) im Durchschnitt etwa 15 bis 20 Prozent. Der steile Abfall der erhobenen Reflexionswerte im vom Hyperspektral – System erfassten VIS – Spektrums zwischen 500 und 540 nm zeigt, wenn auch mit unterschiedlichen Ausgangswerten, bei allen Gewebeklassen einen komparablen Verlauf. Der Grund für die anfänglich einheitlich messbar höhere Reflexion sind vermutlich neben der natürlichen Reflexion der Gewebeoberfläche Flüssigkeitsrückstände, die nach Reinigung der Gewebeproben in NaCl trotz Trocknung auf sterilen Kompressen zum Zeitpunkt der Messung auf deren Oberfläche zurückgeblieben sind. Anschließend deutet sich mit zunehmender Wellenlänge (540 bis 590 nm) und Eindringtiefe des Lichts in tiefere Gewebeschichten eine für jede Gewebeklasse charakteristische Reflexionskurve an. Eisenbeiß et al. zeigten bereits 1999 in einer Studie an Patienten mit Verbrennungen verschiedenen Grades, dass mithilfe von multispektralen Bildgebungsverfahren die Tiefe der Gewebeerstörung quantitativ ermittelt werden kann [87]. In einer ähnlichen Studie konnten Seki et al. 2014 eine Methodik etablieren, mittels derer mit Nahinfrarotspektroskopie und Messung von regionalen Differenzen der Sauerstoffgewebesättigung eine zuverlässige Beurteilung der Tiefe von Verbrennungen möglich ist [116]. Laut Hersteller gelten für das in dieser Studie verwendete TIVITA® – Tissue – System, Eindringtiefen von 0,1 mm für blaues Licht um 450 nm und bis zu 6 mm für Licht aus dem NIR-Spektrum (>750 nm) als anzunehmende Richtwerte.

5.2.1 Fettgewebe und Mundschleimhaut

Zwischen den Messdaten der Fett- und Mundschleimhautgruppe konnten trotz ähnlicher Reflexionsmuster in vielen Abschnitten des eingesetzten Spektrums, darunter insbesondere den Wellenlängen 500 bis 520 nm, 545 bis 590 nm und 900 bis 990 nm, signifikante Unterschiede festgestellt werden ($p < 0.001$). Die Ähnlichkeit der gemessenen spektralen Signaturen von Fett und Schleimhaut lassen sich wahrscheinlich auf das angewendete Verfahren der chirurgischen Biopsie per Skalpell zurückführen. Da es sich bei dem in der Studie verwendeten Material um Überschussmaterial handelte, das im Rahmen von laufenden Operationen intraoperativ gewonnen und analysiert werden konnte, war, um den Operationsablauf nicht zu beeinträchtigen, eine feine mikroskopische Präparation des Biopsats nicht permanent gewährleistet. Dementsprechend ist nicht ausgeschlossen, dass sich an einigen der untersuchten Proben der Mundschleimhaut auch Anteile submukösen Fett- und Muskelgewebes befanden, welche folglich in der Hyperspektralaufnahme miterfasst wurden. Dies könnte den ähnlichen und teils übereinstimmenden Verlauf der Reflexionskurven von Mundschleimhaut und Fett, insbesondere im Bereich des visuell sichtbaren Spektrums bis 700 nm erklären.

5.2.2 Abweichung der Muskelgruppe

Das Reflexionsprofil der Muskelgruppe kennzeichnen, verglichen mit den anderen Gewebegruppen, über das gesamte Spektrum zwischen 500 und 1000 nm etwa 15 bis 20 % niedrigere Reflexionswerte. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass Muskelgewebe eine höhere Absorption als Mundschleimhaut- und Fettgewebe aufweist. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Untersuchungen von *Werner et al. (1990)*, *Duck et al. (1984)* und *Lochner et al. (2010)*, denen zufolge die Dichte von Fettgewebe mit $0,916 \text{ g / cm}^3$ und von quergestreifter Skelettmuskulatur mit $1,085 \text{ g / cm}^3$ angegeben werden, was einer Differenz von 18,5 % entspricht [117-119]. Aus diesem Zusammenhang ergibt sich, dass die messbare hyperspektrale Gewebesignatur und die charakteristische Absorption / Reflexion der analysierten Gewebeklasse auch in Abhängigkeit zur deren jeweiligen Dichte (ρ) steht.

5.2.3 Relevante Spektren für die Gewebeerkenkung

Die Dicke aller in die Studie eingeschlossenen Präparate betrug nicht mehr als 4 mm. Unter Berücksichtigung der zuvor dargelegten maximalen Eindringtiefe des vom Hyperspektralsystem verwendeten Lichtspektrums von 6 mm lässt sich der ähnliche Verlauf der Reflexionskurven im höheren, tiefer ins Gewebe eindringenden nahinfraroten Wellenlängenbereich nachvollziehen. Analog zur gewebespezifischen Dichte und zum

Volumen der jeweiligen Gewebeklasse, ähneln sich die gemessenen Werte im Bereich >700 nm signifikant hinsichtlich ihrer konstanten Änderungsraten. Betrachtet man nun zusätzlich zu der in Abbildung 20 dargestellten charakteristischen Reflexionskurve einer Muskelprobe auf schwarzem Untergrund das spezifische Absorptionsmaximum des schwarzen Messhintergrunds als Referenz (Abbildung 21), so lässt sich feststellen, dass im Bereich dessen maximaler Absorption bei 625 nm ein signifikanter Abfall in der durch die Muskelprobe verursachte Reflexion zu detektieren ist (Abbildung 22). Dies legt nahe, dass insbesondere der niedrigwellige Bereich des VIS – Spektrums große Teile der gewebeindividuellen Hyperspektralsignatur abbildet und höherwellige Spektralbereiche nach Durchstrahlen der Gewebeprobe lediglich den darunter befindlichen Messhintergrund repräsentieren.

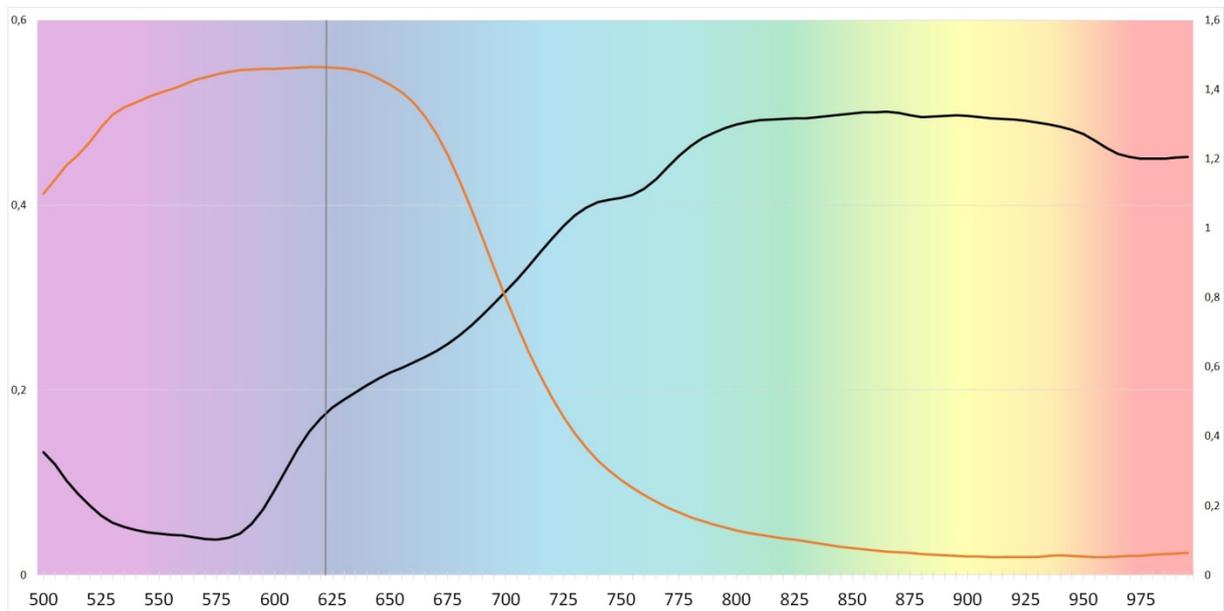


Abbildung 22 (Schwarz) Reflexion einer Muskelprobe auf schwarzem Hintergrund und (**orange**) Eigenabsorption des schwarzen Messhintergrunds bei 500 bis 1000 nm

Abbildung 22 korreliert das Reflexionsverhalten der auf schwarzem Hintergrund gemessenen Muskelprobe aus Abbildung 20 (schwarzer Graph) mit der charakteristischen Eigenabsorption des als Hintergrund verwendeten Materials (orangener Graph), dessen Absorptionsmaximum sich bei etwa 625 nm befindet. Die sich antiproportional zur Absorption des schwarzen Hintergrundes verhaltende Reflexionskurve der Muskelprobe weist eben in diesem Wellenlängenbereich eine signifikant geringere Steigung auf (vgl. Abbildung 20 unten).

5.3 Ergebnisse des Künstlichen Neuronalen Netzwerks

Hyperspektrale Bilddatensätze weisen ein hohes Datenvolumen auf und beinhalten im so genannten Hypercube an jedem erfassten Pixel pro Wellenlänge die komplexen Hyperspektralsignaturen räumlicher- und spektraler Dimensionen. Die im vorliegenden Versuchsaufbau verwendete Hyperspektralkamera ist in der Lage, Wellenlängen zwischen 500 und 1000 nm mit einer Bandbreite von 5 nm (100 Bänder) abzubilden.

Jedes Material weist in Abhängigkeit seiner jeweiligen biochemischen und gewebe-morphologischen Besonderheiten ein charakteristisches Maß an Lichtreflexion, Absorption und Streuung auf [120, 121]. Um die umfangreichen Mengen an spektralen Raumdaten und Hypercube – Informationen effizient und automatisiert verarbeiten zu können, bietet sich der Einsatz von Maschine- und Deep – Learning – Methoden an. Das in dieser Arbeit etablierte, sechs Schichten tiefe Künstliche Neuronale Netzwerk wurde mit Reflexionswerten aus den Hyperspektraldatensätzen von 97 Fett-, 101 Muskel- und 118 Schleimhautproben über 16.000 Epochen trainiert. Die Reflexionswerte jeder Probe wurden aus dem arithmetischen Mittel der Messwerte von sieben bis acht, manuell auf den Proben positionierten Regions of Interest gebildet, die anschließend zur Vergrößerung des Trainingsdatensatzes für das KNN im Sinne einer Datenaugmentation jeweils als eigenständige Proben gewertet wurden. So ließen sich Messwerte aus 681 einzelnen Patches für Fettgewebe, 707 für Muskelgewebe und 826 Patches für Proben der Mundschleimhaut erzeugen. Bei dem Verfahren der Datenaugmentation handelt es sich um eine praktische und häufig angewandte Methode, um mit geringem Aufwand aus einem vorhandenen Datensatz mehr Trainingsdaten zu generieren. Dieses Vorgehen findet besonders in Bereichen des maschinellen Lernens und der Analyse komplexer Bilddaten Anwendung [122, 123].

Mit den Trainingsdaten von 316 analysierten repräsentativen Gewebeproben und dem implementierten 6-Schichten tiefen KNN mit nur 10.445 Parametern konnten nach 16.000 Trainingsepochen Gewebeproben der oben genannten Gruppen unter Verwendung gängiger Optimierungstechniken mit Genauigkeiten von über 80 % präzise unterschieden werden. Aufgrund des zeitaufwändigen Verfahrens der Probenakquise –und konsekutiver Auswertung beschränkt sich das verwendete Studiendesign auf die 316 innerhalb der Studiendauer von einem Jahr analysierten Gewebeproben.

Obwohl die vorgestellte Lösung völlig unabhängige Testdaten [18] lieferte und das Training der Studie nicht durch Überanpassung (engl. Overfitting) [123, 124] beeinträchtigt wurde, kann das Optimierungspotenzial, wie in Abbildung 18 dargestellt, noch weiter gesteigert werden. Eine Einschränkung dieses Ansatzes ist der hochdimensionale Bereich mit etwa

100 Wellenlängen (500 bis 1000 nm). Weitere Versuche mit deutlich reduzierter Anzahl von Features auf Basis von Feature – Selection – Verfahren stellen ein komplexes Problem dar, an dessen Lösung die Forschungsgruppe derzeit arbeitet. Durch die Gewinnung weiterer Referenz- und Trainingsdaten könnten neben dem Generalisierungspotenzial des Deep-Learning-Ansatzes auch die numerische Diskrepanz hinsichtlich Sensitivität und Spezifität der Muskel- und Schleimhautgruppe, wie in Tabelle 3 gezeigt, verbessert werden. Ob eine Einschränkung der zur Auswertung herangezogenen Wellenlängen auf den wie in Abbildung 22 dargestellten, von der Dicke der jeweiligen Probe abhängigen relevanten Bereich die Genauigkeit des KNN steigern kann, ist ebenfalls Gegenstand weiterer Forschungsprojekte. Auch werden weitere Studien darlegen müssen, ob und inwieweit ein Hyperspektralscan von in-vivo befindlichen Proben eine Abweichung von der in dieser Arbeit ex-vivo erhobenen HSI-Signaturen darstellt.

Die falschpositive Klassifizierung von Muskel und Schleimhaut im Testdatensatz (Error 0.16), dargestellt in Tabelle 2, erwies sich im Vergleich zu den falsch positiven Ergebnissen der Gruppen Fett und Schleimhaut (Error 0.02 und 0.08) als relativ hoch. Eine Erklärung hierfür kann die anatomisch bedingt erhöhte Kontamination des Schleimhautgewebes mit Muskulatur sein, wie sie besonders bei Proben aus den Bereichen der Wangen- und Weichgaumensegelschleimhaut zu finden ist. Mit einer Genauigkeit von > 80 % ist das implementierte Modell im Vergleich zu Studien von Halicek et al. [17] zwar weniger genau, verlässt sich aber auf numerische Felder und zeichnet sich durch eine schnelle Trainings- und Feed-forward-Phase aus. Darüber hinaus befasst sich der vorliegende Untersuchungsansatz mit der hyperspektralen Klassifizierung von Fett, Muskeln und Schleimhaut unter der Verwendung von HSI-Reflexionswerten und unterscheidet sich damit von alternativen Ansätzen, die auf Hyperspektralbildern und deren Analyse durch Convolutional Neural Networks (CNN) beruhen [17, 18, 100, 125].

Mit einer größeren Anzahl an Patientendaten und einer hyperspektralen Datenbank umfangreicher Proben verschiedener Patienten mit entzündlichen und prämaligen Mundschleimhautläsionen wäre der klinische Ansatz einer *non-invasiven*, automatisierten Dignitätsbeurteilung von Mundschleimhautveränderungen in Echtzeit ein denkbarer und realisierbarer Ansatz. Hierfür ist die Kenntnis der in dieser Arbeit dargestellten charakteristischen spektralen Eigenschaften gesunder Gewebebestandteile, darunter Mundschleimhaut, Muskel- und Fettgewebe als Kontrollgruppe für die zuverlässige, hyperspektrale Beurteilung komplexer, pathologisch veränderter Gewebestände und potenziell maligner Mundschleimhautveränderungen unerlässlich.

6 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Anwendung von Deep – Learning – Algorithmen zur automatisierten Unterscheidung der Reflexionswerte einer repräsentativen Anzahl an gesunden *ex-vivo* – Gewebeproben oraler Schleimhaut, Muskel- und Fettgewebeproben. Gleichzeitig sollen die Daten als eine Art hyperspektrale Referenzbibliothek für zukünftige Forschungsvorhaben, beispielsweise der *in-vivo*-Untersuchung chronisch entzündlicher oraler Mundschleimhautrekrankungen, die intraoperative Beurteilung chirurgischer Tumorsektionsabstände oder die intraoperative Beurteilung von Lymphknoten hinsichtlich potenzieller Filialisierung und somit Erleichterung der Entscheidung über den Umfang notwendiger Lymphadenektomien dienen.

Die Ergebnisse dieser Machbarkeitsstudie zeigen die Fähigkeit tiefer neuronaler Netzwerke zur automatisierten Klassifizierung von hyperspektralen Signaturen verschiedener Gewebeproben mit steigender Modellgenauigkeit.

Um Lücken der Genauigkeit zu schließen, werden zukünftige Studien den Schwerpunkt auf Convolutional neural networks (CNN), Blockbildung und Bilddatenanalyse durch Computer Vision legen. Dabei handelt es sich um eine Variante neuronaler Netze, deren untergliederte Layer und Blöcke weniger Parameter benötigen und sich dadurch sehr gut für die Bildanalyse eignen. Unter der Voraussetzung, dass ausreichend hyperspektrale Trainingsdaten von dys- und anaplastischen Schleimhautproben zur Verfügung stehen, kann eine Kombination von hyperspektraler Bildgebung mit Computer Vision – Analysen eine vielversprechende Methode zur non-invasiven Beurteilung von oralen Schleimhautveränderungen darstellen. Weiterführende Projekte werden sich darüber hinaus mit der Differenzierung gesunder und maligne entarteter Gewebeproben auf Basis von 3D CNN-Ansätzen mit nicht vorprozessierten, hyperspektralen Cube – Daten beschäftigen.

Gegenstand aktueller Forschungsprojekte sind außerdem die hyperspektrale Analyse von Tumor- und Nachresektaten sowie der endoskopische, hyperspektrale Intraoralscan von potenziell malignen Mundschleimhautveränderungen und verschiedenen Proben- und Exzisionsbiopsien unterschiedlicher Entitäten. Langfristiges Ziel ist neben der nicht invasiven Echtzeiterkennung von Malignomen und potenziell maligne transformierenden Mundschleimhautläsionen das Etablieren einer optisch-analytischen Methode, die, unabhängig von den visuellen Eindrücken des Untersuchers, mit hoher Zuverlässigkeit eine objektive, qualitative Bewertung Dysplasie-verdächtiger Gewebeproben leisten kann, um durch eine suffiziente Früherkennung von Malignomen die tumorbedingte Mortalität und Morbidität substanziell zu reduzieren.

7 Literaturverzeichnis

1. Sarna, T. and R.C. Sealy, *Photoinduced oxygen consumption in melanin systems. Action spectra and quantum yields for eumelanin and synthetic melanin*. Photochem Photobiol, 1984. **39**(1): p. 69-74.
2. Townsend, D., F. D'Aiuto, and J. Deanfield, *Super actinic 420 nm light-emitting diodes for estimating relative microvascular hemoglobin oxygen saturation*. Journal of Medical and Biological Engineering, 2014. **34**: p. 172-177.
3. Remmerbach, T.W., et al., *[Noninvasive brush biopsy as an innovative tool for early detection of oral carcinomas]*. Mund Kiefer Gesichtschir, 2004. **8**(4): p. 229-36.
4. Kämmerer, P.W., et al., *A chemiluminescent light system in combination with toluidine blue to assess suspicious oral lesions-clinical evaluation and review of the literature*. Clin Oral Investig, 2015. **19**(2): p. 459-66.
5. Cicciu, M., et al., *Early Diagnosis on Oral and Potentially Oral Malignant Lesions: A Systematic Review on the VELscope((R)) Fluorescence Method*. Dent J (Basel), 2019. **7**(3).
6. Ishida, T., et al., *A novel approach for vegetation classification using UAV-based hyperspectral imaging*. Computers and Electronics in Agriculture, 2018. **144**: p. 80-85.
7. Miljković, V. and D. Gajski, *ADAPTATION OF INDUSTRIAL HYPERSPECTRAL LINE SCANNER FOR ARCHAEOLOGICAL APPLICATIONS*. Int. Arch. Photogramm. Remote Sens. Spatial Inf. Sci., 2016. **XLI-B5**: p. 343-345.
8. Pavurala, N., X. Xu, and Y.S.R. Krishnaiah, *Hyperspectral imaging using near infrared spectroscopy to monitor coat thickness uniformity in the manufacture of a transdermal drug delivery system*. Int J Pharm, 2017. **523**(1): p. 281-290.
9. Fernandez de la Ossa, M.A., J.M. Amigo, and C. Garcia-Ruiz, *Detection of residues from explosive manipulation by near infrared hyperspectral imaging: a promising forensic tool*. Forensic Sci Int, 2014. **242**: p. 228-235.
10. Sakarya, U., et al. *A short survey of hyperspectral remote sensing and hyperspectral remote sensing research at tübitak Uzay*. in *2015 7th International Conference on Recent Advances in Space Technologies (RAST)*. 2015.
11. Qin, J., et al., *Line-Scan Hyperspectral Imaging Techniques for Food Safety and Quality Applications*. Applied Sciences, 2017. **7**(2): p. 125.
12. Holmer, A., et al., *Hyperspectral imaging in perfusion and wound diagnostics - methods and algorithms for the determination of tissue parameters*. Biomed Tech (Berl), 2018. **63**(5): p. 547-556.
13. Thiem, D.G.E., et al., *Hyperspectral analysis for perioperative perfusion monitoring-a clinical feasibility study on free and pedicled flaps*. Clin Oral Investig, 2021. **25**(3): p. 933-945.
14. Thiem, D.G.E., et al., *New Approach to the Old Challenge of Free Flap Monitoring—Hyperspectral Imaging Outperforms Clinical Assessment by Earlier Detection of Perfusion Failure*. Journal of Personalized Medicine, 2021. **11**(11): p. 1101.
15. Fei, B., et al., *Label-free reflectance hyperspectral imaging for tumor margin assessment: a pilot study on surgical specimens of cancer patients*. J Biomed Opt, 2017. **22**(8): p. 1-7.
16. Maktabi, M., et al., *Tissue classification of oncologic esophageal resectates based on hyperspectral data*. Int J Comput Assist Radiol Surg, 2019. **14**(10): p. 1651-1661.
17. Halicek, M., et al., *In-Vivo and Ex-Vivo Tissue Analysis through Hyperspectral Imaging Techniques: Revealing the Invisible Features of Cancer*. Cancers (Basel), 2019. **11**(6).
18. Halicek, M., et al., *Optical biopsy of head and neck cancer using hyperspectral imaging and convolutional neural networks*. J Biomed Opt, 2019. **24**(3): p. 1-9.
19. Litjens, G., et al., *A survey on deep learning in medical image analysis*. Med Image Anal, 2017. **42**: p. 60-88.

20. Handels, H., *Segmentierung medizinischer Bilddaten*. 2009: Vieweg+Teubner | GWV Fachverlage GmbH.
21. G, S.T., et al., *A Review on a Deep Learning Perspective in Brain Cancer Classification*. *Cancers (Basel)*, 2019. **11**(1).
22. Petersson H, G.D., Bergstrom D, *Hyperspectral image analysis using deep learning — A review*. Sixth International Conference on Image Processing Theory, Tools and Applications (IPTA), 2016.
23. LeCun, Y., Y. Bengio, and G. Hinton, *Deep learning*. *Nature*, 2015. **521**(7553): p. 436-44.
24. Krizhevsky, A., I. Sutskever, and G.E. Hinton, *ImageNet classification with deep convolutional neural networks*. *Communications of the ACM*, 2017. **60**(6): p. 84-90.
25. Shen D, W.G., Suk HI, *Deep Learning in Medical Image Analysis*. *Annu Rev Biomed Eng*, 2017.
26. Lu, G. and B. Fei, *Medical hyperspectral imaging: a review*. *J Biomed Opt*, 2014. **19**(1): p. 10901.
27. Gao, L. and R.T. Smith, *Optical hyperspectral imaging in microscopy and spectroscopy - a review of data acquisition*. *J Biophotonics*, 2015. **8**(6): p. 441-56.
28. Bray, F., et al., *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. *CA Cancer J Clin*, 2018. **68**(6): p. 394-424.
29. Panarese, I., et al., *Oral and Oropharyngeal squamous cell carcinoma: prognostic and predictive parameters in the etiopathogenetic route*. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2019. **19**(2): p. 105-119.
30. Kaemmerer, P., et al., *Diagnostik potenziell maligner Mundschleimhautveränderungen in der Zahnarztpraxis*. *wissen kompakt*, 2017. **11**.
31. Blatt, S., et al., *Diagnosing oral squamous cell carcinoma: How much imaging do we really need? A review of the current literature*. *J Craniomaxillofac Surg*, 2016. **44**(5): p. 538-49.
32. Yakin, M., et al., *Human papillomavirus and oral and oropharyngeal carcinoma: the essentials*. *Aust Dent J*, 2019. **64**(1): p. 11-18.
33. AWMF, *S3-Leitlinie Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms, Version 3.0 - März 2021*. 2021.
34. Marsh, D., et al., *Stromal features are predictive of disease mortality in oral cancer patients*. *J Pathol*, 2011. **223**(4): p. 470-81.
35. Brocklehurst, P., et al., *Screening programmes for the early detection and prevention of oral cancer*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2013(11): p. CD004150.
36. Seoane-Romero, J.M., et al., *Factors related to late stage diagnosis of oral squamous cell carcinoma*. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 2012. **17**(1): p. e35-40.
37. Mello, F.W., et al., *Prevalence of oral potentially malignant disorders: A systematic review and meta-analysis*. *J Oral Pathol Med*, 2018. **47**(7): p. 633-640.
38. McCormick, N.J., P.J. Thomson, and M. Carrozzo, *The Clinical Presentation of Oral Potentially Malignant Disorders*. *Prim Dent J*, 2016. **5**(1): p. 52-63.
39. Reichart, P.A., *Oral mucosal lesions in a representative cross-sectional study of aging Germans*. *Community Dent Oral Epidemiol*, 2000. **28**(5): p. 390-8.
40. Felix, D., J. Luker, and C. Sully, *Oral Medicine: 6. White Lesions*. *DentalUpdate*, 2013.
41. Reichart, P., *Orale Leukoplakie / Erythroplakie. Stellungnahme der Deutschen Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde*. *Deutsche Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde*, 2007.
42. Micheelis, W. and E. Reich, *Dritte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS III)*. 1997.
43. Villa, A. and S.B. Woo, *Leukoplakia-A Diagnostic and Management Algorithm*. *J Oral Maxillofac Surg*, 2017. **75**(4): p. 723-734.
44. Llewellyn, C.D., N.W. Johnson, and K.A. Warnakulasuriya, *Risk factors for oral cancer in newly diagnosed patients aged 45 years and younger: a case-control study in Southern England*. *J Oral Pathol Med*, 2004. **33**(9): p. 525-32.

45. Reibel, J., *Tobacco or oral health*. Bull World Health Organ, 2005. **83**(9): p. 643.
46. Reibel, J., *Prognosis of oral pre-malignant lesions: significance of clinical, histopathological, and molecular biological characteristics*. Crit Rev Oral Biol Med, 2003. **14**(1): p. 47-62.
47. Silverman, S., Jr., M. Gorsky, and F. Lozada, *Oral leukoplakia and malignant transformation. A follow-up study of 257 patients*. Cancer, 1984. **53**(3): p. 563-8.
48. Reichart, P.A. and H.P. Philipsen, *Oral erythroplakia--a review*. Oral Oncol, 2005. **41**(6): p. 551-61.
49. Thiem, D.G.E., et al., *Semiquantifiable angiogenesis parameters in association with the malignant transformation of oral leukoplakia*. Journal of Oral Pathology & Medicine, 2017. **46**(9): p. 710-716.
50. Schilling, L. and T. Vogt, *[Lichen ruber planus : Better understanding, better treatment!]*. Hautarzt, 2018. **69**(2): p. 100-108.
51. Lodi, G., et al., *Current controversies in oral lichen planus: report of an international consensus meeting. Part 1. Viral infections and etiopathogenesis*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2005. **100**(1): p. 40-51.
52. Farhi, D. and N. Dupin, *Pathophysiology, etiologic factors, and clinical management of oral lichen planus, part I: facts and controversies*. Clin Dermatol, 2010. **28**(1): p. 100-8.
53. Scully, C. and M. Carrozzo, *Oral mucosal disease: Lichen planus*. Br J Oral Maxillofac Surg, 2008. **46**(1): p. 15-21.
54. Remmerbach, T.W., *Potentially malignant disorders of the oral mucosa*. Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift (DZZ), 2012. **Ausgabe 10/2012**.
55. Eisen, D., et al., *Number V Oral lichen planus: clinical features and management*. Oral Dis, 2005. **11**(6): p. 338-49.
56. Ismail, S.B., S.K. Kumar, and R.B. Zain, *Oral lichen planus and lichenoid reactions: etiopathogenesis, diagnosis, management and malignant transformation*. J Oral Sci, 2007. **49**(2): p. 89-106.
57. Cheng, Y.S., et al., *Diagnosis of oral lichen planus: a position paper of the American Academy of Oral and Maxillofacial Pathology*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol, 2016. **122**(3): p. 332-54.
58. Lodi, G., et al., *Current controversies in oral lichen planus: report of an international consensus meeting. Part 2. Clinical management and malignant transformation*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2005. **100**(2): p. 164-78.
59. Rodstrom, P.O., et al., *Cancer and oral lichen planus in a Swedish population*. Oral Oncol, 2004. **40**(2): p. 131-8.
60. Holmstrup, P., et al., *Malignant development of lichen planus-affected oral mucosa*. J Oral Pathol, 1988. **17**(5): p. 219-25.
61. Gandolfo, S., et al., *Risk of oral squamous cell carcinoma in 402 patients with oral lichen planus: a follow-up study in an Italian population*. Oral Oncol, 2004. **40**(1): p. 77-83.
62. Sankaranarayanan, R., et al., *Effect of screening on oral cancer mortality in Kerala, India: a cluster-randomised controlled trial*. Lancet, 2005. **365**(9475): p. 1927-33.
63. Sankaranarayanan, R., et al., *Long term effect of visual screening on oral cancer incidence and mortality in a randomized trial in Kerala, India*. Oral Oncol, 2013. **49**(4): p. 314-21.
64. Warnakulasuriya, S. and A.R. Kerr, *Oral Cancer Screening: Past, Present, and Future*. J Dent Res, 2021. **100**(12): p. 1313-1320.
65. Walsh, T., et al., *Clinical assessment for the detection of oral cavity cancer and potentially malignant disorders in apparently healthy adults*. Cochrane Database Syst Rev, 2021. **12**: p. CD010173.
66. AWMF, *Sk2-Leitlinie Diagnostik und Management von Vorläuferläsionen des oralen Plattenepithelkarzinoms in der Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde*. 2019.
67. Metzger, K., et al., *Treatment delay in early-stage oral squamous cell carcinoma and its relation to survival*. J Craniomaxillofac Surg, 2021. **49**(6): p. 462-467.

68. Chen, S., et al., *The Diagnostic Accuracy of Incisional Biopsy in the Oral Cavity*. J Oral Maxillofac Surg, 2016. **74**(5): p. 959-64.
69. Pentenero, M., et al., *Oral mucosal dysplastic lesions and early squamous cell carcinomas: underdiagnosis from incisional biopsy*. Oral Dis, 2003. **9**(2): p. 68-72.
70. Frydrych, A.M., et al., *Oral cavity squamous cell carcinoma survival by biopsy type: a cancer registry study*. Aust Dent J, 2010. **55**(4): p. 378-84.
71. Kämmerer, P.W., et al., *Prospective, blinded comparison of cytology and DNA-image cytometry of brush biopsies for early detection of oral malignancy*. Oral Oncol, 2013. **49**(5): p. 420-6.
72. Macey, R., et al., *Diagnostic tests for oral cancer and potentially malignant disorders in patients presenting with clinically evident lesions*. Cochrane Database Syst Rev, 2015(5): p. CD010276.
73. Heim, I., *Darstellung und Charakterisierung von Cadmiumsulfid-Aluminiumoxid-Nanokompositen*, U. Essen, Editor. 2002.
74. Rashid, A. and S. Warnakulasuriya, *The use of light-based (optical) detection systems as adjuncts in the detection of oral cancer and oral potentially malignant disorders: a systematic review*. J Oral Pathol Med, 2015. **44**(5): p. 307-28.
75. Guneri, P., et al., *Toluidine blue color perception in identification of oral mucosal lesions*. Clin Oral Investig, 2011. **15**(3): p. 337-45.
76. Barrellier, P., et al., *[The use of toluidine blue in the diagnosis of neoplastic lesions of the oral cavity]*. Rev Stomatol Chir Maxillofac, 1993. **94**(1): p. 51-4.
77. Maxwell, K. and G.N. Johnson, *Chlorophyll fluorescence--a practical guide*. J Exp Bot, 2000. **51**(345): p. 659-68.
78. Koch, F.P., et al., *Effectiveness of autofluorescence to identify suspicious oral lesions--a prospective, blinded clinical trial*. Clin Oral Investig, 2011. **15**(6): p. 975-82.
79. Fricain, J.C., *[Autofluorescence for the detection of potentially malignant and malignant lesions of the oral cavity lining]*. Rev Stomatol Chir Maxillofac, 2011. **112**(1): p. 16-21.
80. Goetz, A.F., et al., *Imaging spectrometry for Earth remote sensing*. Science, 1985. **228**(4704): p. 1147-53.
81. Loncan, L.e.a., *Hyperspectral Pansharpening: A Review*. IEEE Geoscience and Remote Sensing Magazine, 2015. **3**: p. 27-46.
82. Kamruzzaman, M. and D. Sun, *Chapter 5 - Introduction to Hyperspectral Imaging Technology*. Computer Vision Technology for Food Quality Evaluation, 2016: p. 111-139.
83. Shaw, G. and D. Manolakis, *Signal processing for hyperspectral image exploitation*. IEEE Signal Processing Magazine, 2002. **19**: p. 12-16.
84. Yudovsky, D., A. Nouvong, and L. Pilon, *Hyperspectral imaging in diabetic foot wound care*. J Diabetes Sci Technol, 2010. **4**(5): p. 1099-113.
85. Holmer, A., et al., *Hyperspectral imaging of the degradation of meat and comparison with necrotic tissue in human wounds*. Journal of Spectral Imaging, 2019. **8**(1): p. a9.
86. Sowa, M., et al., *Review of near-infrared methods for wound assessment*. Journal of Biomedical Optics, 2016. **21**(9): p. 091304.
87. Eisenbeiss, W., J. Marotz, and J.P. Schrade, *Reflection-optical multispectral imaging method for objective determination of burn depth*. Burns, 1999. **25**(8): p. 697-704.
88. Akbari, H., et al., *Blood vessel detection and artery-vein differentiation using hyperspectral imaging*. Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc, 2009. **2009**: p. 1461-4.
89. Akbari, H., et al., *Hyperspectral imaging and diagnosis of intestinal ischemia*. Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc, 2008. **2008**: p. 1238-41.
90. Heimes, D., et al., *Is Hyperspectral Imaging Suitable for Assessing Collateral Circulation Prior Radial Forearm Free Flap Harvesting? Comparison of Hyperspectral Imaging and Conventional Allen's Test*. J Pers Med, 2021. **11**(6).
91. Ortega, S., et al., *Detecting brain tumor in pathological slides using hyperspectral imaging*. Biomed Opt Express, 2018. **9**(2): p. 818-831.

92. Ravi, D., et al., *Manifold Embedding and Semantic Segmentation for Intraoperative Guidance With Hyperspectral Brain Imaging*. IEEE Trans Med Imaging, 2017. **36**(9): p. 1845-1857.
93. Hohmann, M., et al., *In-vivo multispectral video endoscopy towards in-vivo hyperspectral video endoscopy*. J Biophotonics, 2017. **10**(4): p. 553-564.
94. Ogihara, H., et al., *Development of a Gastric Cancer Diagnostic Support System with a Pattern Recognition Method Using a Hyperspectral Camera*. Journal of Sensors, 2016. **2016**: p. 1803501.
95. Kiyotoki, S., et al., *New method for detection of gastric cancer by hyperspectral imaging: a pilot study*. J Biomed Opt, 2013. **18**(2): p. 26010.
96. Masood, K. and N. Rajpoot. *Texture based classification of hyperspectral colon biopsy samples using CLBP*. in *2009 IEEE International Symposium on Biomedical Imaging: From Nano to Macro*. 2009.
97. Maggioni, M., et al., *Hyperspectral microscopic analysis of normal, benign and carcinoma microarray tissue sections*. SPIE BiOS. Vol. 6091. 2006: SPIE.
98. Akbari, H., et al., *Hyperspectral imaging and quantitative analysis for prostate cancer detection*. J Biomed Opt, 2012. **17**(7): p. 076005.
99. Hohmann, M., et al. *Preliminary results for hyperspectral videoendoscopy diagnostics on the phantoms of normal and abnormal tissues: towards gastrointestinal diagnostics*. in *Clinical and Biomedical Spectroscopy and Imaging II*. 2011. Munich: Optical Society of America.
100. Halicek, M., et al., *Deep convolutional neural networks for classifying head and neck cancer using hyperspectral imaging*. J Biomed Opt, 2017. **22**(6): p. 60503.
101. Nathan, M., A.S. Kabatznik, and A. Mahmood. *Hyperspectral imaging for cancer detection and classification*. in *2018 3rd Biennial South African Biomedical Engineering Conference (SAIBMEC)*. 2018.
102. Allam, J.-P. and N. Novak, *Aufbau der Mundschleimhaut*. Allergo Journal, 2014. **23**(3): p. 14-14.
103. Avery, J.K., P.F. Steele, and N. Avery, *Oral Development and Histology*. 2002: Thieme.
104. Welsch, U., *Lehrbuch Histologie*. 2010: München.
105. Ulfing, N., *Kurzlehrbuch Histologie : + Online-Version*. 2015: Stuttgart.
106. Langhals, H., *Color Chemistry. Synthesis, Properties and Applications of Organic Dyes and Pigments. 3rd revised edition. By Heinrich Zollinger*. Angewandte Chemie International Edition, 2004. **43**(40): p. 5291-5292.
107. Sicher, C., et al., *Hyperspectral imaging as a possible tool for visualization of changes in hemoglobin oxygenation in patients with deficient hemodynamics - proof of concept*. Biomed Tech (Berl), 2018. **63**(5): p. 609-616.
108. Tuchin, V., *Tissue Optics: Light Scattering Methods and Instruments for Medical Diagnosis, Second Edition*. 2007: p. 882.
109. Mohammad Rastegari, V.O., Joseph Redmon, Ali Farhadi, *XNOR-Net: ImageNet Classification Using Binary Convolutional Neural Networks*. 2016.
110. Krause, M. and E. Natterer, *Maschinelles Lernen*, in *Wie Maschinen lernen: Künstliche Intelligenz verständlich erklärt*, K. Kersting, C. Lampert, and C. Rothkopf, Editors. 2019, Springer Fachmedien Wiesbaden: Wiesbaden. p. 21-27.
111. Selle, S., *Künstliche Neuronale Netzwerke und Deep Learning*. 2018.
112. Kemming, J., *Evolution Strategies als Trainingsmethode für neuronale Netze*. 2018.
113. Zeiler, M.D., *ADADELTA: AN ADAPTIVE LEARNING RATE METHOD*. 2012.
114. Lu, G., et al., *Hyperspectral Imaging of Neoplastic Progression in a Mouse Model of Oral Carcinogenesis*. Proc SPIE Int Soc Opt Eng, 2016. **9788**.
115. Kamiński, D., *Nahinfrarotspektroskopische Untersuchungen an festen Arzneiformen - Ansätze zur Reduktion des Kalibrieraufwands*, in *Fakultät für Lebenswissenschaften*. 2015, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig. p. 122.
116. Seki, T., et al., *Regional tissue oxygen saturation measured by near-infrared spectroscopy to assess the depth of burn injuries*. Int J Burns Trauma, 2014. **4**(1): p. 40-4.

117. Duck, F.A., *Physical properties of tissue*. 1990, London: Academic Press.
118. Fidanza, F., A. Keys, and J.T. Anderson, *Density of body fat in man and other mammals*. J Appl Physiol, 1953. **6**(4): p. 252-6.
119. Werner, J., *Regelung der menschlichen Körpertemperatur*. 2019: de Gruyter.
120. Teke, M., et al., *A short survey of hyperspectral remote sensing applications in agriculture*. 2013: p. 171-176.
121. Martin, M.E., et al., *Development of an advanced hyperspectral imaging (HSI) system with applications for cancer detection*. Ann Biomed Eng, 2006. **34**(6): p. 1061-8.
122. Bloice, M.D., P.M. Roth, and A. Holzinger, *Biomedical image augmentation using Augmentor*. Bioinformatics, 2019. **35**(21): p. 4522-4524.
123. Shorten, C. and T.M. Khoshgoftaar, *A survey on Image Data Augmentation for Deep Learning*. Journal of Big Data, 2019. **6**(1): p. 60.
124. Burnham, K.P. and D.R. Anderson, *Model Selection and Multimodel Inference: A Practical Information-Theoretic Approach*. 2003: Springer New York.
125. Halicek, M., et al., *Head and Neck Cancer Detection in Digitized Whole-Slide Histology Using Convolutional Neural Networks*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 14043.

8 Anhang

8.1 TNM – Klassifikation und Tumorstadien des Mundhöhlenkarzinoms (gem. UICC)

8.1.1 T- Klassifikation (Primärtumor)

T – Klassifikation	Definition
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Größte Tumorausdehnung ≤ 2 cm, Invasionstiefe (depth of invasion, DOI) ≤ 5 mm
T2	Größte Tumorausdehnung ≤ 2 cm, DOI > 5 mm und ≤ 10 mm ODER Tumor > 2 cm aber ≤ 4 cm, und DOI ≤ 10 mm
T3	Größte Tumorausdehnung > 4 cm ODER jeder Tumor > 10 mm DOI
T4	Infiltration in Nachbarstrukturen

8.1.2 N – Klassifikation (regionäre Lymphknotenmetastasen)

N – Klassifikation	Definition
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase in solitärem ipsilateralen Lymphknoten bis 3cm und ENE(-)
N2a	Metastase in solitärem ipsilateralen Lymphknoten bis 3 cm und ENE(+); oder Metastase in solitärem ipsilateralen Lymphknoten 3 bis 6 cm und ENE(-)
N2b	Metastasen in multiplen ipsilateralen Lymphknoten, keiner größer als 6 cm und ENE(-)
N2c	Metastasen in bilateralen oder kontralateralen Lymphknoten, keiner größer als 6 cm und ENE(-)
N3a	Metastase in solitärem Lymphknoten größer 6 cm und ENE(-)
N3b	Metastase in solitärem ipsilateralen Lymphknoten größer 3 cm und ENE(+); ODER Metastase in multiplen ipsilateralen, kontralateralen ODER bilateralen Lymphknoten, davon mindestens eine ENE(+); ODER Metastase in einem solitären kontralateralen Lymphknoten, 3 cm oder kleiner und ENE(+)

8.1.3 M – Klassifikation

M – Klassifikation	Definition
MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastase(n)

8.1.4 R – Status

R – Status	Definition
RX	Vorhandensein von Residualtumor kann nicht beurteilt werden
R0	Kein Residualtumor
R1	Mikroskopischer Residualtumor
R2	Makroskopischer Residualtumor

8.1.5 Grading

Grading	Definition
GX	Differenzierungsgrad kann nicht bestimmt werden
G1	Gut differenziert
G2	Mäßig differenziert
G3	Schlecht differenziert
G4	Undifferenziert

8.1.6 L (Lymphgefäßinvasion)

L (Lymphgefäßinvasion)	Definition
L0	Keine Lymphgefäßinvasion
L1	Lymphgefäßinvasion

8.1.7 V (Veneninvasion)

V (Veneninvasion)	Definition
V0	Veneninvasion nicht nachweisbar
V1	Veneninvasion mikroskopisch erkennbar
V2	Veneninvasion makroskopisch erkennbar

8.1.8 Tumorstadien nach UICC – Kriterien

Stadium	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T1, T2	N1	M0
	T3	N0, N1	M0
IVA	T1, T2, T3	N2	M0
	T4a	N0, N1, N2	M0
IVB	T4b	jedes N	M0
	jedes T	N3	M0
IVC	jedes T	jedes N	M1

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich bei der Anfertigung meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

Insbesondere gilt mein Dank meinem Doktorvater, Herrn _____, für die permanente projektbezogene sowie berufliche Unterstützung und die Möglichkeit, diese Arbeit unter seiner Leitung durchzuführen.

Besonderer Dank gilt außerdem Herrn _____ für die hervorragende Betreuung, die wertvollen Anregungen und die stete Hilfsbereitschaft, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Auch danke ich Herrn _____ für das Zweitgutachten und die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens.

Darüber hinaus möchte ich zudem _____, _____ und allen anderen Labormitarbeitern meinen Dank für die Unterstützung und die außerordentlichen Bemühungen bei der aufwändigen histologischen Aufbereitung der vielen Gewebeprobe im Labor aussprechen. Ebenso danke ich _____, _____ und dem gesamten OP – Personal für die freundliche Unterstützung bei der Akquise der Gewebeprobe.

Meinen Eltern und meiner Familie möchte ich ganz besonders herzlich danken für die aufmerksame, liebevolle und vielseitige Unterstützung sowohl während dem Verfassen dieser Arbeit als auch während meinem gesamten Studium.

Nicht zuletzt gilt mein Dank allen Verwandten, Freunden und Studienkollegen, die mit ihrer Unterstützung wesentlich zum Erfolg meines Studiums und der Arbeit an meiner Dissertation beigetragen haben.

Tabellarischer Lebenslauf