

Aus dem
Department für Diagnostische Labormedizin
der Universität Tübingen
Institut für Pathologie und Neuropathologie
Abteilung Allgemeine und Molekulare Pathologie
und Pathologische Anatomie

**Gewebedifferenzierung mittels optischer
Emissionsspektroskopie im Gastrointestinaltrakt**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Karcher, Fabian David**

2024

Dekan:	Professor Dr. B. Pichler
1. Berichterstatter:	Professor Dr. F. Fend
2. Berichterstatter:	Professor Dr. C. P. Berg
Tag der Disputation:	27.06.2024

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	VI
Abbildungsverzeichnis.....	VII
Tabellenverzeichnis.....	X
1. Einleitung	1
1.1. Einführung.....	1
1.2. Gastrointestinale Tumore	2
1.3. Früherkennung im GI-Trakt und endoskopische Methoden	2
1.4. Therapieformen.....	4
1.5. Elektrochirurgie	4
1.6. Atomare Zusammensetzung von biologischem Gewebe	6
1.7. Verfahren zur Gewebedifferenzierung.....	7
1.8. Gewebedifferenzierung mittels optischer Emissionsspektroskopie	9
1.9. Ziel der Studie	11
2. Material & Methoden	12
2.1. Genehmigung.....	12
2.2. Gewebeproben.....	12
2.3. Tumordatenbank	12
2.4. Generieren von OES-Daten	13
2.4.1. Messstand	13
2.4.2. Beschreibung des Messverfahrens.....	14

2.4.3. Dokumentation.....	15
2.5. Histologische Auswertung	17
2.6. Spektroskopische Auswertung – Algorithmus zur Gewebeerkenennung	19
2.6.1. Support Vector Machine	21
2.6.2. Leave-One-Out Kreuzvalidierung	23
3. Ergebnisse	24
3.1. Darstellung der Ergebnisse	24
3.2. Kohorte.....	25
3.3. Ergebnisse nach der ersten Auswertung im Überblick	27
3.4. Kolorektale Karzinome	29
3.5. Magenkarzinome.....	39
3.6. Gastrointestinale Stromatumore (GIST)	47
4. Diskussion	57
4.1. Gewebedifferenzierung mit spektralen Daten.....	58
4.2. Datengewinnung	60
4.3. Histologische Auswertung	61
4.4. Verwendete Features	62
4.5. Gewebe- und Organspezifische Eigenschaften.....	65
4.5.1. Kolonkarzinome	66
4.5.2. Magenkarzinome	67
4.5.3. GIST	67

4.6. Kritische Auseinandersetzung zur Vorarbeit.....	68
4.7. Anwendungsgebiete.....	69
5. Zusammenfassung und Ausblick.....	72
6. Literaturverzeichnis	74
7. Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift	80
8. Danksagung	81

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
Ca	Calcium
CADe	Computer Aided Detection
CCC	Comprehensive Cancer Center
CN	Cyanidgruppe
DNA	Desoxyribonukleinsäure
GIST	Gastrointestinaler Stromatumor
Grading	Differenzierungsgrad
iKnife	intelligent Knife
Mg	Magnesium
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NPV	Negative Predictive Value
OES	Optische Emissionsspektroskopie
OH	Hydroxylgruppe
PPV	Positive Predictive Value
REIMS	Rapid Evaporative Ionization Mass Spectrometry
SVM	Support Vector Machine
TAMIS	Transanal Minimally Invasive Surgery
TNM	Tumor, Nodes, Metastases
TRPM7	Transient Receptor Potential Cation Channel M7
Zn	Zink

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Monopolare Anwendung einer elektrochirurgischen Einheit.....	5
Abbildung 2: Aufbau und Funktion des OES-Systems (Spether et al. 2015, S.4)	10
Abbildung 3: Messstand und zugehörige Komponenten	14
Abbildung 4: Gewebeproben vor und nach der Messung.....	15
Abbildung 5: Beispiel der Datenerfassung.....	16
Abbildung 6: Nano Zoomer 2.0-HT der Firma Hamamatsu Photonics	17
Abbildung 7: Paraffinwachsblöcke und Sicht auf die hauchdünnen Schnitte (digitalisiert).....	19
Abbildung 8: Überblick der Datenanalyse.....	20
Abbildung 9: Lineare Trennbarkeit von Objekten	22
Abbildung 10: Histologische Auswertung eines Messpunktes in Tumorgewebe von Kolon	30
Abbildung 11: Aufteilung der Kolorektalen Karzinome.	31
Abbildung 12: Anzahl gemessener Spektren pro Patienten mit Kolonkarzinomen	32
Abbildung 13: Mittelwertspektrum über alle Patienten mit Kolorektalem Karzinom (Tumorgewebe)	32
Abbildung 14: Gemittelte Spektren Ausschnitte von Tumor- und Normalgewebe im Vergleich.....	33
Abbildung 15: Ergebnisse der Patienten mit Kolonkarzinom (exklusive Rektumkarzinome)	35

Abbildung 16: Ausschnitte der Spektren jedes einzelnen Patienten mit kolorektalem Karzinom. Lila: Tumorgewebe; Grün: Normalgewebe.....	37
Abbildung 17: Korrelation von Tumorgehalt und Sensitivität bei den kolorektalen Karzinomen	39
Abbildung 18: Histologische Auswertung eines Messpunktes in Tumorgewebe von Magen.....	41
Abbildung 19: Histologische Auswertung eines Messpunktes in nekrotischem Tumorgewebe	41
Abbildung 20: Anzahl gemessener Spektren pro Patienten mit Magenkarzinom	42
Abbildung 21: Ergebnisse aller Patienten mit Magenkarzinom.....	43
Abbildung 22: Auffälligkeiten der ersten Auswertung der Magenkarzinome	44
Abbildung 23: Ergebnisse der Magenkarzinome bei Betrachtung der Patienten mit hohem Magnesiumpeak und Patienten mit ausschließlich Normalgewebe	45
Abbildung 24: Histologische Auswertung eines Messpunktes in Tumorgewebe eines GIST	48
Abbildung 25: Verteilung der gemessenen GIST-Tumore im Gastrointestinaltrakt	48
Abbildung 26: Anzahl gemessener Spektren pro Patienten mit GIST	49
Abbildung 27: Ergebnisse aller Patientin mit GIST	51
Abbildung 28: Ergebnisse der GIST mit Lokalisation im Magen	53
Abbildung 29: Ausschnitte von Spektren der einzelnen Patienten mit GIST im Magen mit hohem Magnesium Peak	54

Abbildung 30: Ergebnisse der GIST-Proben im Magen mit hohen Magnesium Peaks	55
Abbildung 31: Korrelation von Tumorgehalt und Sensitivität bei GIST-Gewebeproben.....	56

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Dokumentation der histologischen Auswertung einzelner Läsionen	18
Tabelle 2: Wahrheitsmatrix für den Klassifikator der OES-Messungen	25
Tabelle 3: Übersicht der Kohorte	26
Tabelle 4: Erste Ergebnisse der Spektrenanalyse der Gruppe der Kolonkarzinome	28
Tabelle 5: Erste Ergebnisse der Spektrenanalyse der Gruppe der Magenkarzinome	28
Tabelle 6: Erste Ergebnisse der Spektrenanalyse der Gruppe der GIST	28
Tabelle 7: Verwendete Features für die Auswertung aller Patienten mit kolorektalem Karzinom	34
Tabelle 8: Auflistung der Überlegungen zu abweichenden Patientenspektren .	36
Tabelle 9: Einzelne Auffälligkeiten bei der Überprüfung der Patienten mit kolorektalem Karzinom nach Kenntnis der Ergebnisse	38
Tabelle 10: Verwendete Features bei Patienten mit Magenkarzinom	44
Tabelle 11: Einzelne Auffälligkeiten bei der Überprüfung der Patienten mit Magenkarzinomen nach Kenntnis der Ergebnisse	46
Tabelle 12: Untersuchte Parameter auf Gemeinsamkeiten und Unterschiede der beiden verschiedenen Gruppen bei der Auswertung der Magenkarzinom Spektren	47
Tabelle 13: Verwendete Features der GIST im Magen	50
Tabelle 14: Einzelne Auffälligkeiten bei der Überprüfung der Patienten mit GIST nach Kenntnis der Ergebnisse	52

1. Einleitung

1.1. Einführung

Gastrointestinale Tumore gehören zu den häufigsten Krebserkrankungen in Deutschland. Von allen Krebserkrankungen steht die Neuerkrankungsrate des im Volksmund als Darmkrebs bezeichneten Kolorektalen Karzinoms an zweiter Stelle bei Frauen und an dritter Stelle bei Männern [1].

Die Früherkennung als auch die vollständige Entfernung der Tumore sind entscheidende Parameter für den Verlauf der Erkrankung. Im Magen, Dickdarm und teilweise im Dünndarm werden hierfür oft endoskopische oder minimal-invasive Verfahren angewendet. Je nach Tumorbefall kann auch ein offenes chirurgisches Verfahren zum Einsatz kommen. Bei kurativer Intention wird hierbei die komplette Tumorentfernung im Gesunden (R0-Resektion) mit Erhalt von möglichst viel gesundem Gewebe angestrebt. Die mikroskopische Ausdehnung des Tumors kann optisch aber nur abgeschätzt werden. Diese wird daher nach dem Eingriff in der Pathologie untersucht, was bei unvollständiger Resektion eine erneute Operation erforderlich machen kann. Um dies zu umgehen werden häufig intraoperative Schnellschnitte gemacht, deren Nutzen und Verlässlichkeit bereits in großen Studien untersucht wurden [2]. Hierbei wartet das OP-Team, während der Patient in Narkose verbleibt, auf das Ergebnis der Pathologie. Dies kostet Zeit und Ressourcen [3].

Eine Methode zur sofortigen Gewebedifferenzierung wäre von großer Bedeutung für die Tumorbehandlung. Bei oben genannten Eingriffen kommen zunehmend elektrochirurgische Verfahren wie die Argonplasma- oder die Hochfrequenz-Chirurgie zum Einsatz. Bei der Anwendung von Hochfrequenz-Chirurgie ist es möglich, mittels optischer Emissionsspektroskopie (OES) das Gewebe auf seine elementare Zusammensetzung zu untersuchen [4]. Ziel dieser Arbeit ist es, herauszufinden, ob sich gastrointestinale Tumore (Karzinome des Kolons und Rektums, Magenkarzinome sowie Gastrointestinale Stromatumore (GIST)) anhand ihres Spektrums von ihrem jeweiligen Normalgewebe als Ursprung des differenzierten Tumorgewebes unterscheiden lassen.

1.2. Gastrointestinale Tumore

Unter dem Begriff Gastrointestinale Tumore werden Tumore unterschiedlicher Herkunft zusammengefasst. Je nach Ursprung der Tumorzellen werden hierbei verschiedene Gruppen unterschieden. Diese sind die als Karzinom bezeichneten epithelialen Tumore, die neuroendokrinen Tumore, die mesenchymalen Tumore (Sarkome) und die gastrointestinalen Lymphome. Diese Arbeit befasst sich im Bereich der epithelialen Tumoren mit den kolorektalen Adenokarzinomen und den Adenokarzinomen des Magens sowie mit den mesenchymalen GIST.

Zu den epithelialen Tumoren gehört das eben genannte, auch als Darmkrebs bezeichnete Kolorektale Karzinom, welches überwiegend ein Adenokarzinom ist. Etwa jede achte Krebserkrankung geht in Deutschland auf dieses Karzinom zurück, sodass etwa einer von 17 Männern und eine von 20 Frauen im Laufe des Lebens die Diagnose Darmkrebs erhalten [1]. Das Kolorektale Karzinom nimmt somit eine bedeutende Stellung unter den Krebserkrankungen in Deutschland, aber auch in der Europäischen Union, ein. Krebserkrankungen des Magens lassen sich ebenfalls hauptsächlich auf Adenokarzinome zurückführen. Mit einer Neuerkrankungsrate von 14.760 (Stand 2018) [5] ist das Magenkarzinom deutlich seltener als das Kolorektale Karzinom, hat aber mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von ca. 32% eine deutlich schlechtere Prognose [1]. GIST sind hingegen deutlich seltener und repräsentieren nur 0,1-3% aller Gastrointestinalen Tumore. Sie zählen zu den mesenchymalen Tumoren und können überall im Gastrointestinaltrakt auftreten, wo es mesenchymales Gewebe gibt. [6]

1.3. Früherkennung im GI-Trakt und endoskopische Methoden

Die Früherkennung einer Krebserkrankung ist ein entscheidender Parameter, um den Patienten zu heilen. Eine Darmkrebsfrüherkennung soll nach den S-3 Leitlinien für das Kolorektale Karzinom ab dem 50. Lebensjahr begonnen werden, wobei die Koloskopie die höchste Sensitivität und Spezifität im Auffinden von Kolorektalen Karzinomen und Adenomen besitzt [7]. Der Untersucher betrachtet den Gastrointestinaltrakt dabei mit einem Endoskop von innen. Es

kann schwierig sein, Krebsvorstufen und in die Tiefe wachsende Tumore zu erkennen. Da die endoskopische Untersuchung sowohl untersucher- als auch technikabhängig ist, können hierbei Läsionen übersehen werden. Einige Hersteller und Forschungsgruppen versuchen daher erweiterte endoskopische Verfahren zu etablieren, um dem Untersucher die Erkennung von Krebsvorstufen und Tumoren zu erleichtern und somit die Detektionsrate zu erhöhen.

Das klassische Endoskop besitzt einen Bildleiter, einen Lichtleiter und einen Arbeitskanal. Es wird mit Weißlicht betrieben. Diese klassischen Endoskope werden zunehmend durch moderne Verfahren ergänzt. Die Chromendoskopie oder auch das Narrow Band Imaging waren erste Varianten der klassischen Weißlichtendoskopie und sind weitestgehend im klinischen Gebrauch. Modernere Varianten kommen z.B. von der Firma PENTAX Medical. Deren i-Scan Technologie arbeitet mit verschiedenen Algorithmen. Dabei können mit Oberflächenverstärkung, Kontrastverstärkung und Farbtonverstärkung Läsionen unter verschiedenen Aspekten betrachtet werden[8]. Die i-Scan Algorithmen in Verbindung mit bildverstärkenden HD-Endoskopen zeigen eine höhere Detektionsrate von Kolorektalen Polypen als die klassische Weißlicht-Endoskopie [9]. Das Ziel einer Koloskopie ist das Erreichen eines Polypen freien Darms [7]. Es gibt aber auch Polypen, die benigne sind und nicht unmittelbar entfernt werden müssen. *In vivo* sind diese jedoch schwer von den malignen Polypen zu unterscheiden. Daher wird jeder Polyp entfernt und histopathologisch untersucht. Eine Gewebedifferenzierung der Polypen während der Endoskopie würde das Risiko für den Patienten als auch den Kostenfaktor der histopathologischen Auswertung reduzieren. Mit der i-Scan Technologie von PENTAX Medical konnte nicht nur eine bessere Detektionsrate, sondern auch eine bessere Unterscheidung zwischen neoplastischen und nicht neoplastischen Polypen erreicht werden [10].

Neben der optischen Diagnostik rückt auch immer mehr die Diagnostik mit Hilfe von künstlicher Intelligenz in den Vordergrund. Dem Untersucher werden hierbei im Live-Bild Läsionen oder Unregelmäßigkeiten angezeigt, was die Detektionsrate verbessern soll. Seit einigen Jahren gibt es sogenannte Computer

Aided Detection (CAdE)-Systeme, welche z.B. schon in der Mammografie und anderen Bereichen eingesetzt werden. Auch für den Gastrointestinaltrakt konnte mit einem CAdE-System in einer Studie eine signifikant erhöhte Adenom Detektionsrate ohne Zeitverlust bei der Untersuchung gezeigt werden [11]. In Japan wurde 2019 das auf künstlicher Intelligenz basierte System EndoBRAIN für die klinische Benutzung zugelassen. Das System hat gezeigt, dass es neoplastische von nicht neoplastischen Läsionen korrekt unterscheiden kann [12].

1.4. Therapieformen

Jede Tumorerkrankung hat eine Behandlungsempfehlung, die meist in Leitlinien verschiedener Gesellschaften zu finden sind. Therapien sind häufig im Wandel, da stets neue Erkenntnisse und Behandlungsmöglichkeiten hinzukommen. Es gibt im Allgemeinen drei Behandlungssäulen der Tumorerkrankungen. Diese sind chirurgische Verfahren, die medikamentöse Therapie und die Strahlentherapie. Die Thematik dieser Arbeit befasst sich mit der Säule der chirurgischen Therapie. Hierbei kommt häufig die Elektrochirurgie zum Einsatz.

1.5. Elektrochirurgie

Die erste elektrochirurgische Einheit wurde in den 1920er Jahren von William Bovie erfolgreich eingesetzt, indem er humanes Gewebe bei neurochirurgischen Eingriffen koaguliert und geschnitten hat [13]. Heutzutage befindet sich in fast jedem Operationssaal eine elektrochirurgische Einheit. Bei der Anwendung von Elektrochirurgie macht man sich den Effekt zunutze, dass elektrische Energie in thermische Energie umgewandelt und dabei ein thermaler Gewebeschaden verursacht wird. Strom entsteht durch die Bewegung von Elektronen. Durch die schnelle Bewegung dieser Elektronen durch das Zytoplasma der Zellen wird deren Temperatur erhöht [14]. Der Stromfluss kann dabei je nach eingestellten Parametern unterschiedliche Effekte im Gewebe erzielen. Zum einen ist dies auf die erreichte Temperatur, zum anderen auf die Geschwindigkeit der Gewebeerwärmung zurückzuführen. Bei Temperaturen knapp unter dem Siedepunkt werden die Proteine im Gewebe denaturiert und es kommt zur

Koagulation, wodurch z.B. Blutungen gestillt werden können. Wird die Temperatur langsam weiter erhöht, verdampft das Wasser im Gewebe und es trocknet aus. Ist die Temperatur von Anfang an über dem Siedepunkt, so kommt es zu einer sehr schnellen Verdampfung des Wassers im Gewebe, wodurch es fragmentiert wird und somit geschnitten werden kann [14-16]. Man unterscheidet hierbei die monopolare von der bipolaren Anwendung. Bei der monopolaren Anwendung fließt der Strom von einer aktiven Elektrode durch den Patienten zu einer großflächigen Neutralelektrode (Abbildung 1). Die Stromdichte ist im Bereich der kleinen aktiven Elektrode am höchsten, wodurch der Effekt hier am stärksten ausgeprägt ist und mit zunehmendem Abstand abnimmt. Die große Fläche der Neutralelektrode führt zu einer niedrigen Stromdichte und verhindert dort einen thermischen Gewebeschaden. Bei der bipolaren Anwendung fließt der Strom zwischen einem aktiven Elektrodenpaar, wobei das Gewebe zwischen den beiden aktiven Elektroden den Stromkreis schließt und somit auch nur hier der Effekt der thermischen Schädigung auftritt [15, 16].

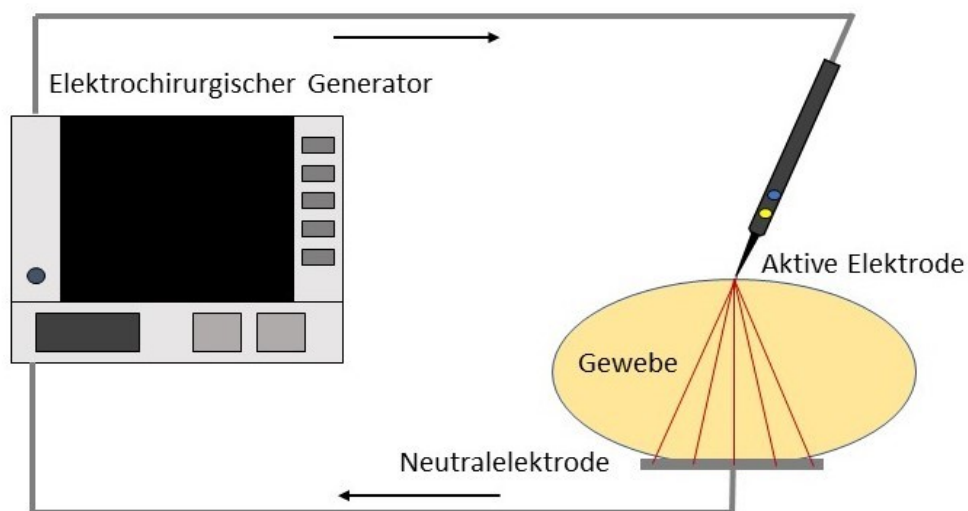


Abbildung 1: Monopolare Anwendung einer elektrochirurgischen Einheit

Der im Generator produzierte Strom fließt von der aktiven Elektrode durch das Gewebe bzw. den Patienten zur Neutralelektrode. Beim Durchtritt kommt es zur thermischen Schädigung

1.6. Atomare Zusammensetzung von biologischem Gewebe

Jedes Organ besteht aus mehreren Gewebearten, die zusammen als Funktionseinheit dienen. Die Gewebearten bestehen aus Zellverbänden, welche unterschiedliche Aufgaben innerhalb des Gewebes erfüllen. Jede Zelle hat dabei Zellorganellen, die wiederum verschiedene Funktionen besitzen. All diese Zellorganellen bestehen aus biochemischen Molekülen, Wasser und Elektrolyten. Letztendlich sind diese Verbindungen aus kleinsten Teilchen aufgebaut, den Atomen, welche im Periodensystem der Elemente aufgelistet sind. Wie jegliche Materie hat auch biologisches Gewebe eine bestimmte elementare Zusammensetzung, die es gewissermaßen definiert. Bei Abweichungen des ursprünglichen Gewebes ändert sich also auch die elementare Zusammensetzung. So konnte z.B. Nawi *et al.* in einer Studie von 2019 zeigen, dass die Anzahl an Spurenelementen wie Cobalt (Co) und Magnesium (Mg) im Tumorgewebe bei Patienten mit Kolorektalen Karzinomen zum Normalgewebe signifikant unterschiedlich waren [17]. Auch eine andere Studie von Juloski *et al.* fand einen Unterschied an Spurenelementkonzentrationen in der Schleimhaut von Normal- und Tumorgewebe von Patienten mit Kolorektalem Karzinom. Es konnte sogar gezeigt werden, dass bei höherem Malignitätsgrad (*Grading*) eine höhere Relation von Kupfer zu Zink vorlag als bei niedrigerem *Grading* [18]. Auch andere Gewebe zeigen Unterschiede in ihrer Gewebezusammensetzung, wenn es entartet ist. Eine Studie von Al-Ebraheem *et al.* hat gezeigt, dass sich die Spurenelemente des Tumorgewebes von Lungen-, Nieren-, und Brustgewebe im Vergleich zu dessen Normalgewebe unterscheiden [19]. Die elementare Zusammensetzung jedes Gewebes scheint ihm also eine spezifische Charakteristik zu geben. Dies stellt die zentrale Thematik dieser Arbeit dar. Mit Kenntnis dieser möglichen Charakteristiken soll es möglich sein, unbekanntes Gewebe zu erkennen.

1.7. Verfahren zur Gewebedifferenzierung

Es gibt unterschiedliche Methoden, um Gewebe zu differenzieren. So gibt es z.B. ein Verfahren mit Hilfe von optischer Kohärenztomographie, das mit reflektiertem Licht Bilder von Gewebe erstellen kann. In einer Studie von *Mesa et al.* konnte so gezeigt werden, dass mit dieser Methode Muskelgewebe, Fettgewebe und Sarkome voneinander unterschieden werden können, um Resektionsgrenzen bei Sarkomen auf mikroskopischer Ebene besser beurteilen zu können [20]. Daneben zählen Verfahren zur Untersuchung magnetischer Resonanzen und Fluoreszenz markiertem Gewebe zu Möglichkeiten der Gewebedifferenzierung [21-24].

Des Weiteren gibt es auch spektroskopische Verfahren. Hierbei werden auf verschiedene Weise Spektren des Gewebes gesammelt und ausgewertet.

Eines dieser Verfahren ist die Raman Spektroskopie. Sie beruht auf einer unelastischen Streuung von monochromatischem Licht an Molekülen, mit der die molekulare Zusammensetzung eines Gewebes bestimmt werden kann. Hiermit lässt sich für jedes Gewebe ein „Fingerabdruck“ erstellen [25, 26]. So gibt es mehrere Studien, die herausgefunden haben, dass mit Hilfe der Raman Spektroskopie zwischen normalem, dysplastischem und kanzerogenem Gewebe im Magen unterschieden werden kann [25]. *Teh et al.* stellten in ihrer Studie sogar fest, dass es mit der Raman Spektroskopie möglich ist, die beiden Subtypen des Magenkarzinoms (intestinaler und diffuser Typ) anhand ihres Spektrums voneinander zu unterscheiden [27]. Mit Hilfe von Raman Spektroskopie fand sich auch ein Unterschied zwischen normaler Schleimhaut des Magens, dem benignem und dem malignem Magenulcus [28]. Die Studienlage zur Raman Spektroskopie ist umfassend und zeigt eine klare Tendenz zur Möglichkeit der Gewebedifferenzierung auf elementarer Ebene. Jedoch bringt die Identifikation der molekularen Charakteristika bei dieser Methode auch Probleme mit sich. So sind ähnliche molekulare Strukturen kaum zu unterscheiden, Verunreinigungen oder der Laser überschatten schnell die eigentlichen Informationen und durch Erhitzung der Probe kann dieser Schaden nehmen [25].

Ein weiteres spektroskopisches Verfahren ist die Massenspektrometrie. Moleküle werden hierbei ionisiert und die Ionen nach ihrem Masse-zu-Ladung-Verhältnis eingeteilt. Fatou *et al.* haben ein Instrument entwickelt (*SpiderMass*), welches Gewebe mit Hilfe von Massenspektrometrie vor Ort und in Echtzeit analysieren kann. Mit Hilfe eines Lasers werden Ionen durch Anregung von OH-Banden generiert und analysiert [29]. Sie konnten zeigen, dass Gewebeproben von Ovarialkarzinomen im Vergleich zu dessen Normalgewebe ein jeweils spezifisches molekulares Profil haben. Ziel dieses Instruments ist der Einsatz in der Tumorchirurgie. Der Chirurg soll durch das Scannen des Gewebes mit dem Laser direkt ein molekulares Profil des Gewebes erhalten, um damit Rückschlüsse auf entartetes oder normales Gewebe ziehen zu können [29]. Dasselbe Prinzip verfolgt das *iKnife* System. Es nutzt zur Analyse die sogenannte *Rapid Evaporative Ionization Mass Spectrometry* (REIMS) [30-32]. Die Kopplung von Elektrochirurgie und der REIMS Analyse wird als *intelligent Knife* (iKnife) bezeichnet [30]. Bei Anwendung von Elektrochirurgie entsteht durch die Verdampfung des Gewebes eine Art Rauch. Balog *et al.* nahmen an, dass sich in diesem Rauch biologisches Material befindet und untersuchten dieses mit Hilfe von REIMS. Die massenspektroskopischen Auswertungen zeigten *ex vivo* eine hochspezifische Wiedererkennung des analysierten Gewebes, sodass das iKnife auch in der intraoperativen Anwendung getestet wurde. Von 81 Patienten wurden 864 Spektren untersucht. Die Ergebnisse bei der Untersuchung aller dieser Spektren ergab eine Sensitivität von 97,7% und einer Spezifität von 96,5% für die Erkennung von Tumor- zu Normalgewebe [30]. Auch weitere Anwendungen erzielten gute Ergebnisse beim Einsatz des iKnife. So wurde dieses in einer 2019 veröffentlichten Studie von Mason *et al.* auch bei der Anwendung von *Transanal minimally invasive surgery* (TAMIS) getestet. REIMS konnte Normalgewebe von Adenomen und Tumorgewebe zu 86,8% unterscheiden [33]. Die Anwendung von massenspektrometrischen Verfahren bietet hier also auch die Möglichkeit, Gewebe zu differenzieren. Jedoch bringt auch diese Methode Nachteile mit sich. Massenspektrometer sind große und wartungsintensive Maschinen und mit Analysezeiten von 0,7-2,5 Sekunden ist die Gewebedifferenzierung nicht in Echtzeit [4, 32].

Ein weiteres spektroskopisches Verfahren ist die optische Emissionsspektroskopie. Sie ist heutzutage vor allem in der Metallindustrie eine weit verbreitete Analysetechnik. Die Bestimmung der Elementzusammensetzung wird zur qualitativen und quantitativen Analyse der Metalle eingesetzt. In der Medizin findet die optische Emissionsspektroskopie bisher wenig Anwendung. Da sie ein essenzieller Bestandteil dieser Arbeit ist, sollen die Grundlagen hier kurz erläutert werden.

Durch Energiezufuhr (z.B. in Form eines Funkens bei Anwendung von Strom) kann ein Atom in einen höheren Energiezustand versetzt werden. Durchläuft ein Atom dann einen Zustand höherer Energie in einen Zustand niedrigerer Energie, so gibt es die überschüssige Energie in Form eines Photons ab. Diese emittierten Photonen haben spezifische Wellenlängen und ergeben ein Spektrum, das bezüglich seiner Lage auf einem von einem Spektralapparat angelegten Strahlungsband charakteristisch für das betreffende Element ist [34]. Jedes Atom hat also definierte Emissionslinien, anhand derer es in der spektrometrischen Darstellung detektiert werden kann. Die Charakteristika der einzelnen Atome und Moleküle sind in öffentlich zugänglichen Referenzdatenbanken dokumentiert.

1.8. Gewebedifferenzierung mittels optischer Emissionsspektroskopie

Wie Eingangs schon erwähnt ist die Gewebedifferenzierung ein entscheidender Parameter vor allem in der chirurgischen Behandlung von Tumorerkrankungen. Der Anspruch an eine optimale Methode zur intraoperativen Gewebedifferenzierung ist eine Aussage über die Beschaffenheit des Gewebes vor Ort (*in situ*), in „Echtzeit“ (*in realtime*), d.h. für den Untersuchenden ohne Zeitverzug, und auf einer mikroskopischen Ebene. Mit diesem Grundgedanken haben sich die oben genannten spektroskopischen Verfahren auseinandergesetzt. Ein weiteres Verfahren, das entwickelt wurde und auch diesen Grundgedanken aufgreift, arbeitet mit Hilfe von Hochfrequenz-Chirurgie und wurde in einer 2015 veröffentlichten Studie von Spether *et al.* vorgestellt. Sie entwickelten ein „Optical Emission Spectroscopy“-System (OES-System),

welches in Abbildung 2 dargestellt ist. Die Gewebeerkennung beruht hierbei auf optischen Emissionsspektren, mit denen Gewebe auf seine elementare Zusammensetzung hin untersucht und so Rückschlüsse auf die Identität dessen geschlossen werden kann [4].

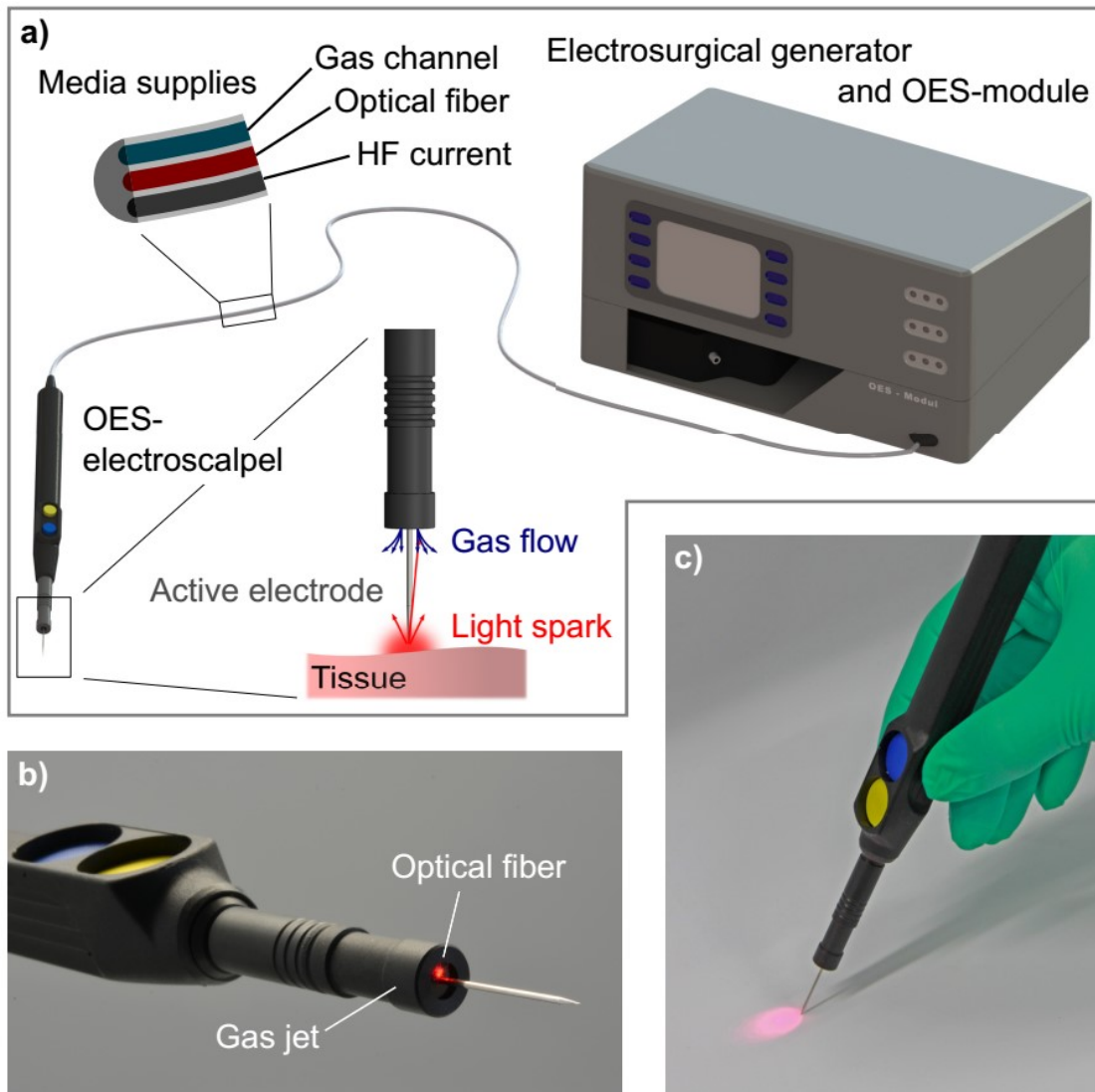


Abbildung 2: Aufbau und Funktion des OES-Systems (Spether et al. 2015, S.4)

In ein gewöhnliches Elektroskalpell wurde eine Glasfaser integriert, die den bei der Anwendung von Hochfrequenz-Strom entstehenden Funken in Form von Photonen einfängt. Ein angelegter Gasfluss schützt die Glasfaser vor Verunreinigung. Das eingefangene Licht lässt sich mittels Spektrometer darstellen

Bei der Anwendung von Hochfrequenz-Chirurgie entsteht an der Spitze des Elektroskalpells ein Funke. Dieser kommt durch die Anregung der Moleküle und Atome des Gewebes zustande, die durch den Stromfluss in ein höheres Energielevel gehoben werden. Bei der Relaxation der Atome und Moleküle werden dann Photonen mit spezifischer Wellenlänge emittiert, welche als Licht, also dem Funken, zu sehen sind. Dieses Licht lässt sich mit Hilfe von optischen Fasern einfangen, um es einer emissions-spektrometrischen Analyse zu unterziehen. Hierbei lassen sich die einzelnen Photonen mit ihren unterschiedlichen Wellenlängen differenzieren und ihrem jeweiligen Element zuordnen, auf dessen Anregung sie zurückzuführen sind. Spether *et al.* haben dieses Verfahren an Nierengewebe angewendet. Die Auswertung der Ergebnisse zeigte eine Sensitivität von 96% und eine Spezifität von 93% für die Klassifikation von normalem Nierengewebe und Gewebe von Nierentumoren. Auch konnten die einzelnen Tumortypen zu ca. 95% richtig klassifiziert werden [4]. Die Studie von Spether *et al.* gilt als Motivation für die hier vorgestellte Arbeit.

1.9. Ziel der Studie

Dass die Möglichkeit der Gewebedifferenzierung mittels optischer Emissionsspektren in Echtzeit funktioniert, wurde bisher nur an Nierengewebe untersucht [4, 35]. Die guten Ergebnisse motivieren uns, das Verfahren auch auf andere Tumore und Organe auszuweiten. Auf Grund der hohen Bedeutung Gastrointestinaler Tumore für die Gesellschaft [1] haben wir das Verfahren bei Tumoren des Gastrointestinaltraktes mit folgenden Fragestellungen angewendet:

1. *Wie gut korrelieren OES-Gewebespektren mit den histologischen Befunden „Normalgewebe“ und „Nicht-Normalgewebe“ für die Neoplasien Kolorektales Karzinom, Magenkarzinom und GIST im Gastrointestinaltrakt?*
2. *Lassen sich Neoplasien in verschiedenen Abschnitten des Gastrointestinaltraktes anhand bestimmter spektraler Charakteristika durch einen universellen Klassifikator beschreiben?*
3. *Welche Schwierigkeiten und Herausforderungen bringt die OES-Analyse im Gastrointestinaltrakt mit sich?*

2. Material & Methoden

2.1. Genehmigung

Die Studie wurde von der Ethikkommission an der Medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls-Universität und am Universitätsklinikum Tübingen unter der Nummer 068/2014B02 genehmigt. Auch die Verwendung von Biobank Proben wurde unter der Nummer TuBa 13-2018 genehmigt.

2.2. Gewebeproben

Für die Studie wurden humane Gewebeproben gesammelt (s.u.), die die zu untersuchende Tumore als auch Normalgewebe enthielten. Alle Gewebeproben stammen von Patienten, die ihr Einverständnis für die Verwendung ihres entnommenen Gewebes für wissenschaftliche Zwecke gegeben haben. Es wurde hierbei auf zwei verschiedene Wege der Gewebesammlung zurückgegriffen.

Zum einen geschah dies im klinischen Alltag. Sobald im Universitätsklinikum Tübingen während eines operativen Eingriffs eine Resektion eines für die Studie berücksichtigten Tumors erfolgte, wurde von dem Resektat, welches routinemäßig für die Pathologie bestimmt ist, nach den üblichen klinischen Untersuchungen eine Gewebeprobe für die Studie beiseitegelegt. In den meisten Fällen war es möglich, Tumor - als auch Normalgewebe zu erhalten. Diese Gewebeproben wurden im Kühlschrank maximal 48 Stunden gelagert und dann gemessen. Bei selteneren Tumoren wie z.B. dem GIST ist diese Art der Probensammlung sehr zeitaufwändig, weswegen auf einem zweiten Weg auf Gewebeproben aus der Tumordatenbank des Universitätsklinikums Tübingen zurückgegriffen wurde. Diese wurden aufgetaut und innerhalb von einer Stunde gemessen.

2.3. Tumordatenbank

Das Universitätsklinikum Tübingen hat Zugriff auf die zentrale Biobank des *Comprehensive Cancer Center (CCC)* Tübingen-Stuttgart. In dieser wird vor

allem Tumorgewebe gelagert und nach strengen Richtlinien für die Forschung bereitgestellt. Ein interdisziplinär zusammengesetzter wissenschaftlicher Beirat entscheidet über die Erlaubnis der Gewebenutzung für wissenschaftliche Zwecke. Auch die hier verwendeten Proben wurden für die hier vorgestellte Arbeit freigegeben. Die zentrale Biobank des CCC Tübingen-Stuttgart ist Mitglied der *German Biobank Alliance*. Diese besteht aus mehreren Mitgliedern, die im Besitz von Biobanken sind. Des Weiteren sind IT-Expertenzentren involviert, die für die Bereitstellung eines Netzwerks verantwortlich sind, um einen einfachen Datenaustausch zu ermöglichen [36].

2.4. Generieren von OES-Daten

2.4.1. Messstand

Der Messstand wurde im Schnellschnittlabor des Universitätsklinikums Tübingen aufgebaut. Dieser ist in Abbildung 3 dargestellt. Auf einem Tisch wurde die Neutralelektrode platziert, auf der das Gewebe gemessen wurde. Zum Schutz des Messenden diente eine seitlich geöffnete Plexiglasbox. Eine Absaugung mit verstellbarem Schlauch wurde in die Box integriert. Eine Fotodokumentationsplatte, ein Fotoapparat, histologische Farbe und Desinfektionstücher wurden auf dem Tisch bereitgestellt. Zur Messung diente eine elektrochirurgische Einheit der Firma Erbe Elektromedizin GmbH (VIO3 Generator) inklusive Messinstrument. Zur Aufnahme der Spektren wurde eine Optische Emissionsspektroskopie Einheit der Firma ACMIT GmbH verwendet. Die Absaugung erfolgte mit einem IES 3 Rauchabsaugsystem der Firma Erbe Elektromedizin GmbH. Eine CO₂ Gasflasche wurde in das Gehäuse integriert.

Bei Anwendung von Hochfrequenzstrom mit dem Messinstrument auf organischem Gewebe entsteht ein Funke, der Informationen zur Gewebezusammensetzung enthält. Diese Information in Form von Photonen wurde mit Hilfe der optischen Glasfaser eingefangen, zum OES-Gerät geleitet und dort als Emissionsspektrum gespeichert. Zum Schutz der Glasfaser vor Verschmutzung wurde am Eingang dieser ein kontinuierlicher Gasstrom aus CO₂ erzeugt. Bei Verschmutzung durch z.B. Gewebefetzen oder sonstige Substanzen

kann es nämlich zu einem sogenannten Transmissionsfehler kommen, der die Ergebnisse verfälschen kann. Um diesen zu verhindern bzw. zu erkennen, wurde das Messinstrument nach einer definierten Anzahl an Messungen regelmäßig ausgetauscht. Hierzu nimmt das Messinstrument vor den eigentlichen Messungen das Spektrum einer Deuteriumlampe auf. Nach der definierten Anzahl an den eigentlichen Messungen wird das Spektrum der Deuteriumlampe erneut aufgenommen. Diese beiden Spektren (vorher/nachher) werden voneinander subtrahiert. Erscheinen hierbei große Differenzen, wurde die Messsonde verschmutzt und es kam zum Transmissionsfehler. Dies bedeutet dann, dass die gemessenen Spektren der Messsonde Fehler aufweisen könnten.



Abbildung 3: Messstand und zugehörige Komponenten

Der Messstand wurde im Schnellschnittlabor der CRONA Kliniken Tübingen installiert. Es sind die einzelnen Komponenten, die für die Generierung der OES-Daten benötigt wurden, abgebildet

2.4.2. Beschreibung des Messverfahrens

Für die Messung wird die Gewebeprobe auf die Neutralelektrode gelegt und anschließend mit einer gewöhnlichen Natriumchlorid-Lösung (NaCl) abgespült, um eventuelle Verschmutzungen zu beseitigen. Das überschüssige NaCl wird dann vor der Messung mit Zellstoffpapier seitlich aufgesaugt, ohne die Gewebeprobe zu berühren. Anschließend werden die Messpunkte nacheinander gesetzt (Abbildung 4). Der Abstand zwischen den Messpunkten ist so zu wählen,

dass das koagulierte Gewebe makroskopisch nicht ineinander übergeht. Jeder Messpunkt wird dokumentiert und nummeriert, um ihn in der später folgenden histologischen Auswertung wiederzuerkennen. Um die Orientierung des Gewebes für die histologische Auswertung nachzuvollziehen, werden nach der Messung die Gewebeproben an zwei Seiten farblich markiert. Um Autolyse und Fäulnis zu verhindern, werden die Proben anschließend in Formalin eingelegt und so fixiert.

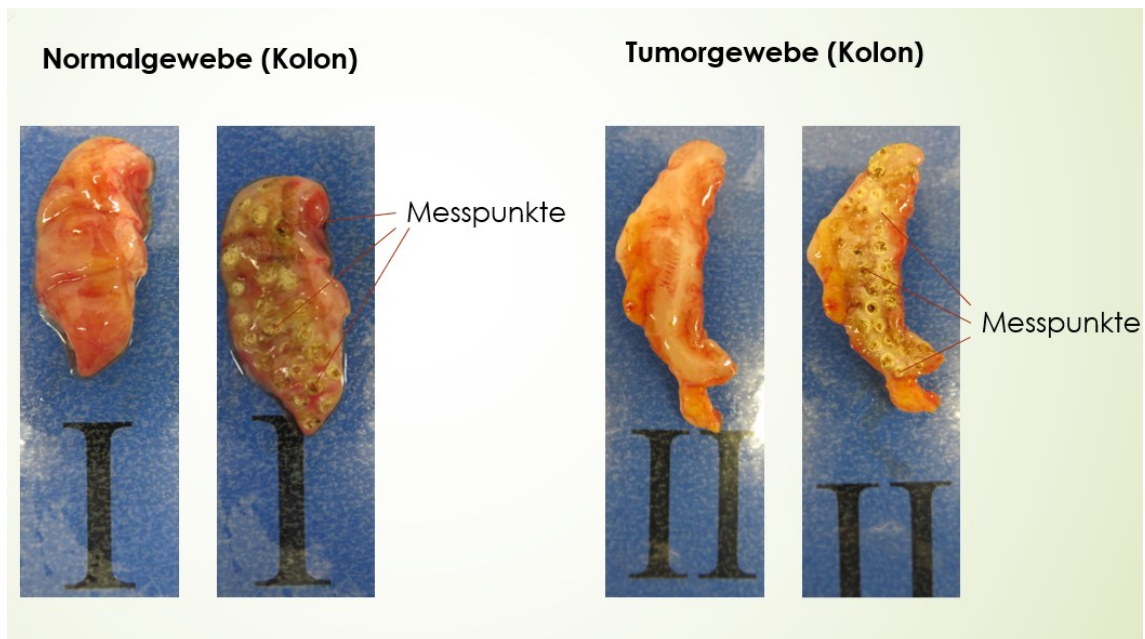


Abbildung 4: Gewebeproben vor und nach der Messung

Gewebeproben von Normal- und Tumorgewebe aus dem Kolon vor und nach der Messung. Die Messpunkte wurden so gesetzt, dass sie makroskopisch nicht ineinander übergehen. Anschließend wurden sie in einer Skizze dokumentiert

2.4.3. Dokumentation

Jeder Patient erhält unabhängig von der Studie bei Aufnahme am Klinikum eine Nummer (K-Nummer). Für alle Patienten der Studie wurde eine zusätzliche Nummer (P-Nummer) angelegt. Diese ergibt sich aus der fortlaufenden Nummerierung der gemessenen Proben. Auf einem separaten Dokument, welches am pathologischen Institut verbleibt, wurde die angelegte P-Nummer mit der zugewiesenen K-Nummer des pathologischen Instituts vermerkt. Hierdurch ist es möglich, die Gewebeproben dem ursprünglichen Patienten zuzuordnen.

Für die Dokumentation der Messung wurde zusätzlich für jeden Patienten ein Laufzettel erstellt (Abbildung 5), auf welchem das Datum, die Gewebeart und die zugehörigen Fotonummern dokumentiert wurden. Diese Laufzettel wurden eingescannt. Die Originale wurden bei der Firma Erbe Elektromedizin archiviert.

erbe	
Datum der Messung:	18.10.19
Gewebeart:	Sigma
Fotonummern:	154 - 2201 154 - 2202
Anzahl Paraffinblöcke:	
P-Nummer:	p. [redacted]
Jahrgang Patient/-in:	[redacted]

Tumorentität: AdenoCA des Sigma, G2

Tumorklassifikation: pT2 (Infiltration der Muscularis), pNO (E1/14LW), L0, v0, p0, R0

Verwendete Instrumente und dazugehörige Messpunktnummern:

Seriennummer Instrument:	Messpunktnummern:
SA 36751	1-54

Histologie durchgeführt?

ja ☐ nein ☒

Durchgeführt von: [Signature]
(Unterschrift)

OES Patho-Crona

Seite 1 von 4

Skizze und Bemerkungen

I. Normalgewebe

II. Tumor

HA OES Frischgewebe

Seite 2 von 4

Abbildung 5: Beispiel der Datenerfassung

Zur exakten Zuordnung von Messpunkten und histopathologischen Befunden wurden die Daten auf diesem Bogen dokumentiert. Für jeden Patienten wurde eine P-Nummer angelegt und alle Daten der Messung auf dem Bogen eingetragen. Auf der Rückseite befindet sich die Skizze der gemessenen Gewebestücke mit eingetragenen Messpunkten

Vor jeder Messung wurden die Gewebeproben auf eine Fotodokumentationsplatte gelegt und fotografiert. Anschließend wurden die Gewebeproben auf dem Laufzettel skizziert. In dieser Skizze wurde während der Messung jeder Messpunkt eingetragen. Nach der Messung wurde die Gewebeprobe erneut auf die Fotodokumentationsplatte gelegt und farblich markiert. Dabei wurde die Gewebeprobe vor und nach der farblichen Markierung fotografiert.

2.5. Histologische Auswertung

Die in Formalin eingelegten Gewebeproben wurden am Institut für Pathologie einer Standardprozedur für histologische Schnitte unterzogen. Die Gewebeproben werden dabei zunächst mit Paraffinwachs eingebettet (Abbildung 7). Mit Hilfe eines Mikrotoms werden von dem Paraffinwachsblock hauchdünne Schnitte angefertigt, welche auf einem Objektträger angetrocknet werden [37].



Abbildung 6: Nano Zoomer 2.0-HT der Firma Hamamatsu Photonics

Mit dem Nano Zoomer wurden die Objektträger gescannt, um die histologischen Schnitte in eine digitale Form zu bringen

Um die histologische Auswertung digital durchführen zu können, wurden die Objektträger mittels dem Nano Zoomer 2.0 HAT (Abbildung 6) eingescannt. Für die Auswertung wurde das Programm NDP.view2 der Firma Hamamatsu Photonics K.K. verwendet. Zur Orientierung diente die histologische Farbe. Das makroskopische und das mikroskopische Bild wurden nebeneinandergelegt und anschließend verglichen. Die gefundenen Läsionen wurden markiert und dem ursprünglichen Messpunkt zugeordnet (Abbildung 7). Anschließend erfolgte die histologische Auswertung. Da das Gewebe in der Läsion meist durch die hochfrequenz-Strom-Anwendung zerstört wurde, wurde das Gewebe in unmittelbarer Nähe bewertet und davon ausgegangen, dass die Läsion dieselbe Gewebezusammensetzung beinhaltet. Zunächst wurden sämtliche Gewebearten

der zugehörigen Läsionen histologisch beschrieben: bei Normalgewebe also z.B. Bindegewebe, Schleimhaut, Fettgewebe, glatte Muskulatur etc., im Bereich des Tumors wurde von Tumorzellen, Tumorstroma und Tumornekrose unterschieden. Die Gewebezusammensetzung wurde in Prozent angegeben (Tabelle 1).

Tabelle 1: Dokumentation der histologischen Auswertung einzelner Läsionen

Hinter jeder Spektrumnummer steht ein Messpunkt, der in der histopathologischen Untersuchung genau definiert wurde. Jeder Messpunkt erhält somit eine prozentuale Zuordnung zu seinen Gewebetypen

A	B	C
PatientenNr.	Ergebnis Histologie	Spektrumnummer
P-0328	Normalgewebe	Nr. 1-31
	0% Tumor, 100% Tumorstroma	32
	100% Tumor, 0% Tumorstroma	33
	20% Tumor, 80% Tumorstroma	34
	20% Tumor, 80% Tumorstroma	35
	N/A	36
	80% Tumor, 20% Tumorstroma	37
	100% Tumor, 0% Tumorstroma	38
	80% Tumor, 20% Tumorstroma	39
	80% Tumor, 20% Tumorstroma	40
	20% Tumor, 80% Tumorstroma	41
	20% Tumor, 80% Tumorstroma	42
	10% Tumor, 90% Tumorstroma	43
	0% Tumor, 80% Tumorstroma, 20% Fett	44
	0% Tumor, 100% Tumorstroma	45
	0% Tumor, 100% Tumorstroma	46
	0% Tumor, 100% Tumorstroma	47
	0% Tumor, 100% Tumorstroma	48
	20% Tumor, 80% Tumorstroma	49
	10% Tumor, 90% Tumorstroma	50
	10% Tumor, 90% Tumorstroma (Entzündung)	51
	50% Fett, 50% Lymphknoten	52
	100% Bindegewebe	53
	0% Tumor, 50% Tumorstroma, 50% glatte Muskulatur	54
	0% Tumor, 50% Tumorstroma, 50% Fett	55
	80% Tumor, 20% Tumorstroma	56
	30% Tumor, 70% Tumorstroma	57

Nicht alle Proben wurden nach genau diesem Prinzip ausgewertet. Vor allem zu Beginn der Datensammlung wurde nach der Messung anhand des makroskopischen Eindrucks entschieden, ob eine histologische Untersuchung nötig ist oder nicht. Bei eindeutiger Makroskopie wurde das jeweilige

Gewebestück als Tumorgewebe oder als Normalgewebe definiert. Mit zunehmender Datensammlung wurde klar, dass eine sehr genaue histologische Auswertung von großer Bedeutung ist, sodass die Proben zunehmend genau ausgewertet wurden. Einige Patientenproben sind somit makroskopisch beurteilt und nicht detailliert histologisch ausgewertet.

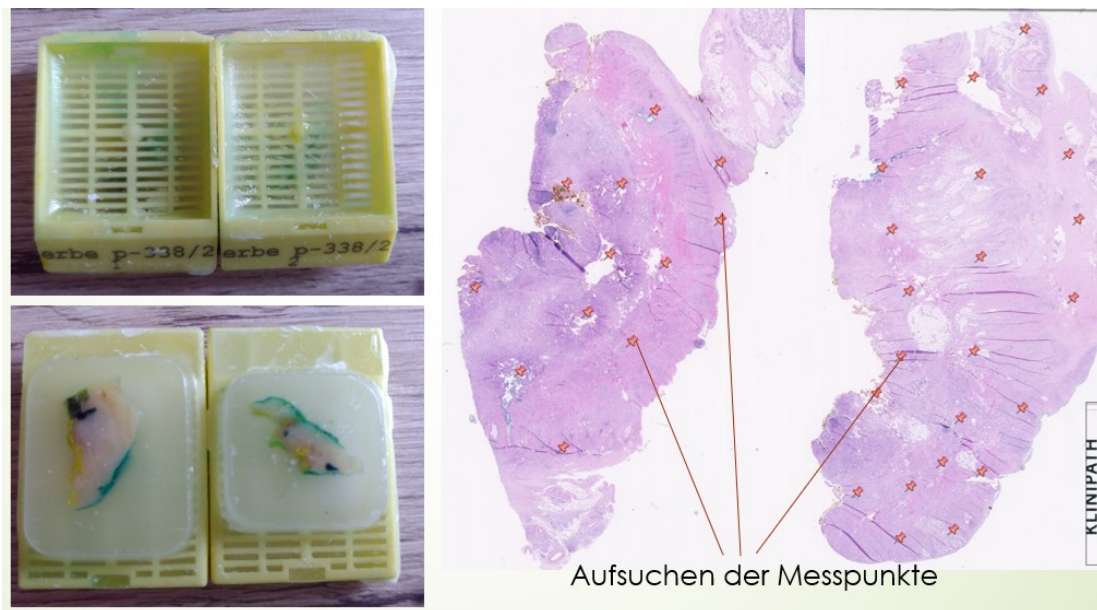


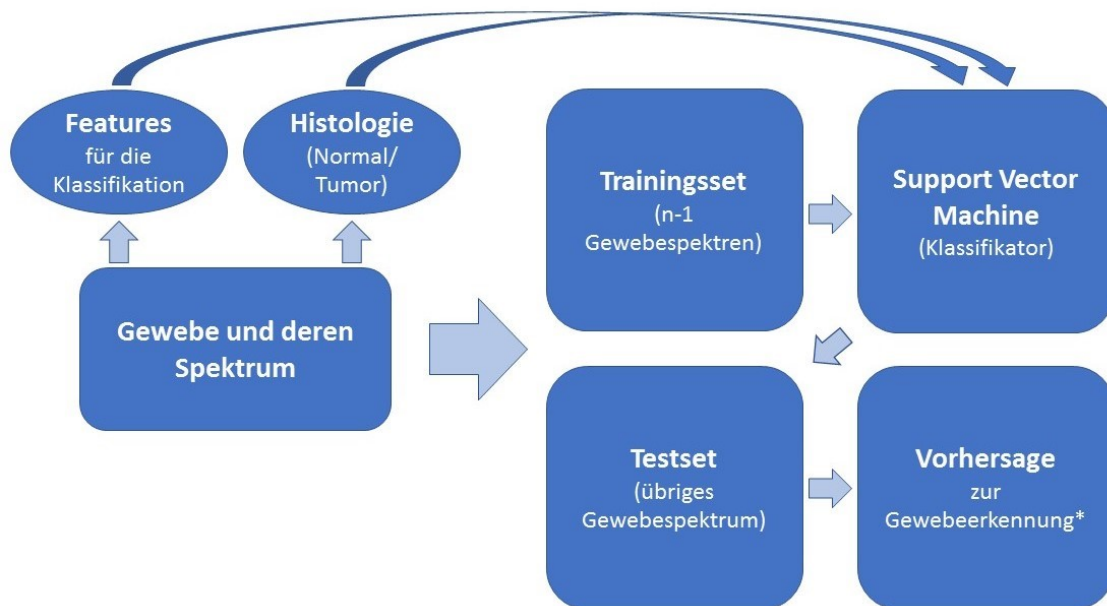
Abbildung 7: Paraffinwachsblöcke und Sicht auf die hauchdünnen Schnitte (digitalisiert)

Nach Einbettung des Gewebes in Paraffin entstehen Blöcke (links), von denen hauchdünne Schnitte abgeschnitten werden. Diese werden auf einem Objektträger platziert und eingescannt. Nach dem Einscannen lassen sie sich digital betrachten (rechts)

2.6. Spektroskopische Auswertung – Algorithmus zur Gewebeerkennung

Die Auswertung der spektroskopischen Daten erfolgte in engem Austausch bei der Firma Erbe Elektromedizin. Bevor die Spektren verwendet wurden, wurden sie zunächst einer Vorverarbeitung unterzogen. Dabei wurde an den Spektren mit Hilfe des *asymmetric least square algorithm* eine *Baseline Correction* angewendet [38]. Sie dient zur Reduzierung von Interferenzen und Hintergrundrauschen, welche die Datenqualität sonst negativ beeinflusst. Das Signal, welches nach der *Baseline Correction* bleibt, umfasst Emissionslinien von atomaren Elementen und Peaks von molekularen Emissionsbändern. Eine

weitere Vorverarbeitung umfasst die Untersuchung der Signalqualität. Nur wenn eine der Emissionslinien von Kohlenstoff (247,9nm) und Magnesium (285,13nm) ein Signal-Rausch-Verhältnis von über 20 hatte, wurde es in die Analyse mit einbezogen, da dann von einem ausreichendem Nutzsignal und relevanten Gewebeformationen ausgegangen werden konnte. Einen Überblick über die dann erfolgte Datenanalyse zeigt Abbildung 8.



*Bewertung der Vorhersage durch:
Sensitivität, Spezifität, Positiv prädiktiver Wert, Negativ prädiktiver Wert, Genauigkeit

Abbildung 8: Überblick der Datenanalyse

Von den Gewebespektren zur Gewebeerkennung sind mehrere Schritte notwendig. Nach Auswahl der Features kann der Klassifikator anhand der histologischen Untersuchung mittels Testset und Trainingsset eine Vorhersage zur Gewebewiedererkennung treffen

Grundlage für die Auswertung sind die Emissionslinien der einzelnen chemischen Elemente und Moleküle des gemessenen Gewebes. Lässt sich zwischen Normal- und Tumorgewebe ein Unterschied in der relativen Intensität der Emissionslinien feststellen, so wird dieser Unterschied als Merkmal aufgenommen. Dieses Merkmal wird auch als Feature bezeichnet. Es ist definiert als das Integral unter dem Peak der Emissionslinie. Befindet sich z.B. im Gewebe eines Tumors mehr Magnesium als im ursprünglichen Normalgewebe, so müssten alle Messpunkte im Tumorgewebe einen signifikant höheren

spezifischen Peak bei der Wellenlänge von Magnesium aufweisen. Dieser Peak sollte dann beim Spektrum des Normalgewebes nicht in einer solchen Intensität zu finden sein. So kann für jede Gewebeart mit Hilfe verschiedener Features ein Fingerabdruck erstellt werden. Mit Hilfe dieses Fingerabdrucks und der histologischen Auswertung, die jeden Messpunkt klar definiert, lässt sich ein Algorithmus zur Gewebeerkenkung trainieren.

2.6.1. Support Vector Machine

Der Algorithmus ist im OES-System integriert und arbeitet auf Grundlage einer Support Vector Machine (SVM). Hierbei handelt es sich um ein mathematisches Verfahren der Mustererkennung und keine materielle Maschine, wie der Name suggeriert. Die SVM ist ein Klassifikator, der eine Menge an unbekannten Objekten einer bestimmten Klasse zuordnet. Im Falle dieser Arbeit zum Beispiel wären die Objekte die einzelnen Spektren der Messpunkte und die Klassen die Zuordnung zu Normalgewebe oder Tumorgewebe. Man spricht von einer binären Klassifikation, da es zwei Klassen gibt. Die Klassifikation kann aber auch multiple sein. Ein Beispiel hierfür wäre z.B. die Zuordnung in mehrere unterschiedlichen Tumorentitäten. Für die mathematische Mustererkennung wird jedes Objekt in einem multidimensionalen Vektorraum repräsentiert. Die Objekte müssen dabei zunächst linear trennbar sein. Die SVM versucht bei der Klassifikation nun in diesen Vektorraum eine Hyperebene einzubauen, die die beiden Klassen voneinander trennt (Abbildung 9a). Der Vektor zwischen den Klassen soll dabei so groß wie möglich sein. Die SVM wird daher auch als *Large Margin Classifier* bezeichnet. Der *Margin* bezeichnet hierbei den Bereich zwischen der Grenze und den Punkten, die zu den Klassen gehören. Die SVM braucht hierfür ein Trainingsset an Objekten, anhand derer sie Klassifikationskriterien festlegen kann, die dann auf die unbekannten Objekte angewendet werden können. In einem zweidimensionalen Vektorraum lässt sich nur ein Feature für die Klassifikation verwenden. Da es aber mehrere Features gibt, die in die Klassifikation mit eingehen sollen, sind die Objekte auf diese Weise nicht mehr linear trennbar (Abbildung 9b). Aber auch nicht linear trennbare Objekte lassen sich mit der SVM klassifizieren. Hierfür wird der Kernel Trick angewendet. Der

Grundgedanke dieses Tricks ist es, den zweidimensionalen Raum in einen höherdimensionalen Raum zu überführen, bis jedes Feature linear trennbar wird. Dort wird dann die Hyperebene bestimmt und diese wie im zweidimensionalen Raum mit möglichst großem Margin definiert und anschließend rücktransformiert. Man erhält dann eine nichtlineare, aber saubere Trennung der Klassen [39, 40]. Somit ist es der SVM in der vorgestellten Arbeit möglich, auch mehrere Features in die Klassifikation Tumorgewebe oder Normalgewebe mit einzubringen.

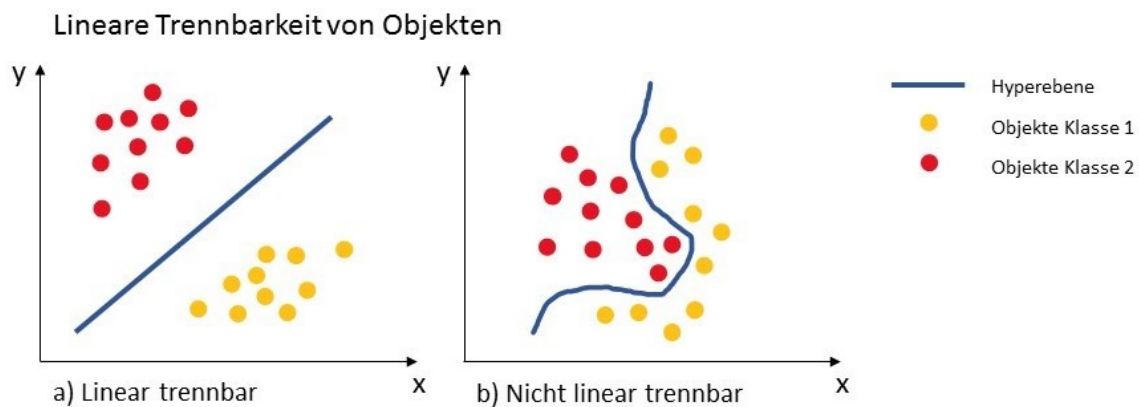


Abbildung 9: Lineare Trennbarkeit von Objekten

Wenn die Objekte voneinander linear trennbar sind, lässt sich eine Hyperebene einbauen. Bei nicht linear trennbaren Objekten wird der Kernel Trick angewendet, wodurch nicht linear trennbare Objekte trennbar werden

Durch den Kernel Trick können bei der Auswertung theoretisch sehr viele Features einbezogen werden, da bei bis zu unendlichen Dimensionen jedes kleinste Detail irgendwann voneinander getrennt werden kann. Rein theoretisch lässt sich der Algorithmus so mit unendlichen dieser Features trainieren. In der Praxis scheitert dies aber an der Menge an Daten, die mit steigender Anzahl an Features exponentiell steigt. Außerdem lässt die Bedeutung der einzelnen Features in immer höher werdenden Dimensionen stark nach und wird klinisch nicht mehr signifikant. Es wurden daher manuell die stärksten Features ausgewählt, welche die SVM dann für die Klassifizierung verwendet hat. Die verwendeten Features sind im Ergebnis Teil dargestellt.

Das Ergebnis der SVM muss nun noch überprüft werden. Hierfür gibt es unterschiedliche statistische Verfahren. Eines dieser Verfahren ist ein Training

mit einer Leave-One-Out Kreuzvalidierung, welches für die spektroskopische Auswertung angewendet wurde.

2.6.2. Leave-One-Out Kreuzvalidierung

Das Leave-One-Out Kreuzvalidierungsverfahren ist ein Testverfahren der Statistik. Mit ihr kann die Qualität eines statistischen Modells überprüft werden. Mit der Kreuzvalidierung lässt sich abschätzen, wie genau das OES-System arbeitet. Der Datensatz wird hierbei in einen Trainings- und einen Testsatz geteilt. Die Analyse wird am Trainingsset durchgeführt und mit Hilfe des Testsets überprüft. Um die Variabilität zu verringern, werden bei der Leave-One-Out Kreuzvalidierung alle Messungen bis auf eine als Trainingssatz verwendet, die übrigen Messungen dienen dann als Testset. Das Trainingsset besteht also aus den Spektren von $n-1$ Patienten, das Testset aus dem Spektrum des übrig gebliebenen Patienten. Da jeder Patient mit seinen Spektren einmal als Testset verwendet wird, ergibt sich eine definierte Anzahl an Kombinationen, deren Mittelwert das Ergebnis der Kreuzvalidierung liefert.

3. Ergebnisse

Um darzustellen, ob sich Gastrointestinale Tumore (Karzinome des Kolons und Rektums, Magenkarzinome sowie Gastrointestinale Stromatumore (GIST)) anhand ihres Spektrums von ihrem jeweiligen Normalgewebe als Ursprung des differenzierten Tumorgewebes unterscheiden lassen, werden die Emissionsspektren in eine anschauliche Art der Ergebnisdarstellung gebracht.

3.1. Darstellung der Ergebnisse

Wie schon im Methodik Teil genauer beschrieben, ordnet der Klassifikator jedem Messpunkt anhand verschiedener Merkmale eine Klasse zu. Es handelt sich um eine binäre Klassifikation. Es gibt also zwei Klassen. Diese sind Tumorgewebe oder Normalgewebe. In Realität ist diese Einteilung ungenau und wurde hier vereinfacht. So lassen sich bei einer histopathologischen Untersuchung neben den genannten Gewebearten z.B. auch nicht-tumoröses Gewebe, Randbereiche, Nekrosen und noch weitere Gewebe beschreiben (siehe Kapitel 2.5.). Bei der binären Klassifikation geht man daher davon aus, dass der Klassifikator auch Fehler macht. Da die Genauigkeit des Klassifikators (SVM) die zentrale Frage dieser Studie widerspiegelt, ist die Bewertung dessen von großer Bedeutung.

Für die Bewertung lässt sich eine Wahrheitsmatrix aufstellen (Tabelle 2). Der Klassifikator ordnet jedem Messpunkt aus dem Testset die Klasse Tumorgewebe oder die Klasse Normalgewebe zu. Diese Zuordnung wird anhand der histologischen Auswertung überprüft. Ordnet der Klassifikator so z.B. eine OES-Messung der Klasse Tumorgewebe zu, so ist das Testergebnis positiv. Stimmt die zugeordnete Klasse mit der histologischen Untersuchung als Goldstandard der Gewebedifferenzierung überein, so ist das Ergebnis als richtig positiv einzuschätzen.

Aus dieser Wahrheitsmatrix lassen sich die Sensitivität (Richtig-positiv-Rate) und die Spezifität (Richtig-negativ-Rate) ableiten. Beträgt z.B. die Sensitivität einer Messung an einer Gewebeprobe (Tumor) 92%, so hat der Klassifikator 92% der Messpunkte richtig als Tumorgewebe klassifiziert und 8% der Messpunkte falsch.

Anhand dieser Raten lässt sich anschaulich erkennen, wie gut der Klassifikator funktioniert. Des Weiteren sind mit diesen Werten die Berechnung des positiv prädiktiven Wertes (Positive Predictive Value, PPV) als auch des negativ prädiktiven Wertes (Negative Predictive Value, NPV) möglich. Diese beschreiben die Gütekriterien des Testes. Der positiv prädiktive Wert zeigt z.B. an, mit welcher Wahrscheinlichkeit das Testergebnis auch tatsächlich positiv ist. Die schlussendliche Genauigkeit der Messung ergibt sich aus dem Mittelwert von Sensitivität und Spezifität.

Tabelle 2: Wahrheitsmatrix für den Klassifikator der OES-Messungen

Durch die Wahrheitsmatrix lassen sich die Ergebnisse der OES-Messungen darstellen

		Histologisches Ergebnis	
		Tumorgewebe	Normalgewebe
OES- Ergebnis	Tumorgewebe	richtig positiv	falsch positiv
	Normalgewebe	falsch negativ	richtig negativ

3.2. Kohorte

Für die Studie wurden Gastrointestinale Tumore von insgesamt 97 Patienten vermessen. Davon waren 43 Proben aus dem Dickdarm, 24 Proben aus dem Magen und 30 Proben von GIST verteilt auf den Gastrointestinaltrakt.

Alle drei Tumorentitäten wurden nach demselben Prinzip gemessen und ausgewertet. Die Auswertung erfolgte separat innerhalb der jeweiligen Tumorentität. Tumore können trotz gleicher Entität sehr inhomogen sein. Sie werden mit Hilfe von TNM Stadien (Tumor, Nodes, Metastases) eingeteilt. Diese beschreiben Größe und Ausdehnung, Lymphknotenbefall und Metastasierungsgrad der Tumorerkrankung. Da sich die TNM-Stadien der Tumore in der Kohorte unterscheiden, unterscheidet sich so z.B. auch die Größe der zu messenden Gewebestücke. Dies führt teilweise zu erheblichen

Unterschieden in der Anzahl an Spektren pro Gewebestück. Bei manchen Gewebeproben war es nicht möglich sowohl Tumor- als auch Normalgewebe zu erhalten. Bei einigen Proben stellte sich in der histologischen Auswertung heraus, dass es sich z.B. nur um Normalgewebe oder nur um Tumorgewebe handelte. Die Daten wurden trotzdem verwendet, da zum Training des Klassifikators kein direkter Vergleich desselben Patienten notwendig ist. Die gemessenen Normalgewebespektren kommen zusammen in eine Gruppe, alle gemessenen Tumorgewebespektren in eine andere. Da die Messungen an einem dreidimensionalen Gewebestück vorgenommen wurden, die histologische Untersuchung dann aber nur in zwei Dimensionen möglich ist, gingen einige Messpunkte verloren. Wenn die Messpunkte in einer anderen Ebene lagen, waren sie im Gewebeschnitt nicht wieder aufzufinden. Eine Übersicht der wichtigsten Daten zur Kohorte sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Übersicht der Kohorte

Wichtige Daten zur gemessenen Kohorte im Überblick. Es wird jeweils die Anzahl an Patientenproben mit den jeweiligen Eigenschaften angegeben

	Kolon- karzinome	Magen- karzinome	GIST
Anzahl an Patientenproben insgesamt	43	24	30
Vorbehandlung des Patienten	3	15	6
aus Nativgewebe stammend	42	6	4
aus der Biobank stammend	1	18	26
Ausschluss vor der Auswertung	2	3	2

	Kolon- karzinome	Magen- karzinome	GIST
Transmissionsfehler bei der Messung	5	2	1
Nur Tumorgewebe vorhanden	3	1	6
Nur Normalgewebe vorhanden	3	5	1
Mittelwert der Messpunkteanzahl (Normal/Tumor)	24/21	23/19	15/34
Median der Messpunkteanzahl (Normal/Tumor)	23/19	15/14	14/31
Summe der Messpunkteanzahl (Normal/Tumor)	1040/908	518/442	478/1069

Die Patientenproben wurden innerhalb ihrer Kohorte zunächst alle miteinander verglichen. Im Verlauf wurden dann auch separate Gruppen innerhalb der jeweiligen Kohorte untersucht.

3.3. Ergebnisse nach der ersten Auswertung im Überblick

Mit Hilfe der Wahrheitsmatrix stellen sich die Ergebnisse der ersten Analysen der Spektren innerhalb der jeweiligen Entität wie folgt dar (Tabelle 4-6). Die Vier Felder Tafeln sollen einen ersten Überblick geben. In den folgenden Kapiteln werden die Ergebnisse der einzelnen Gruppen vertieft dargestellt.

Tabelle 4: Erste Ergebnisse der Spektrenanalyse der Gruppe der Kolonkarzinome

		Histologisches Ergebnis	
		Tumorgewebe	Normalgewebe
OES- Ergebnis	Tumorgewebe	74%	26%
	Normalgewebe	22%	78%

Tabelle 5: Erste Ergebnisse der Spektrenanalyse der Gruppe der Magenkarzinome

		Histologisches Ergebnis	
		Tumorgewebe	Normalgewebe
OES- Ergebnis	Tumorgewebe	52%	48%
	Normalgewebe	23%	77%

Tabelle 6: Erste Ergebnisse der Spektrenanalyse der Gruppe der GIST

		Histologisches Ergebnis	
		Tumorgewebe	Normalgewebe
OES- Ergebnis	Tumorgewebe	56%	44%
	Normalgewebe	27%	73%

3.4. Kolorektale Karzinome

Unter den Krebserkrankungen sind Kolorektale Karzinome häufige Tumore. Die Kohorte umfasst 43 Patientenproben, von denen 42 aus Nativgewebe bestehen. Es wurde hier ursprünglich nicht auf Gewebe der Biodatenbank zurückgegriffen. Eine der Biobankproben einer anderen Entität hat sich jedoch als Adenokarzinom des Kolons herausgestellt und wurde in diese Gruppe aufgenommen. Die Karzinome erstrecken sich über den kompletten Dickdarm, kommen jedoch am häufigsten im aboralen Teil vor. So finden sich bei den Proben Karzinome von Colon ascendens, transversum, descendens, sigmoideum und des Rektums.

Von den 43 Patienten wurden 21 Patientenproben makroskopisch als Tumor- oder Normalgewebe definiert, die restlichen 22 Proben wurden einer genauen histologischen Untersuchung unterzogen. Abbildung 10 veranschaulicht das Vorgehen bei der histologischen Auswertung. Nach dem Aufsuchen der Messpunkte im Gewebe und dem Erkennen der jeweiligen Messpunktnummer wurde das Gewebe in unmittelbarer Umgebung definiert. Bei den genauen Untersuchungen wurde dieses Schema an jedem einzelnen Messpunkt angewandt. Die histologische Auswertung erfolgte stets mit Hilfe eines erfahrenen Facharztes für Pathologie.

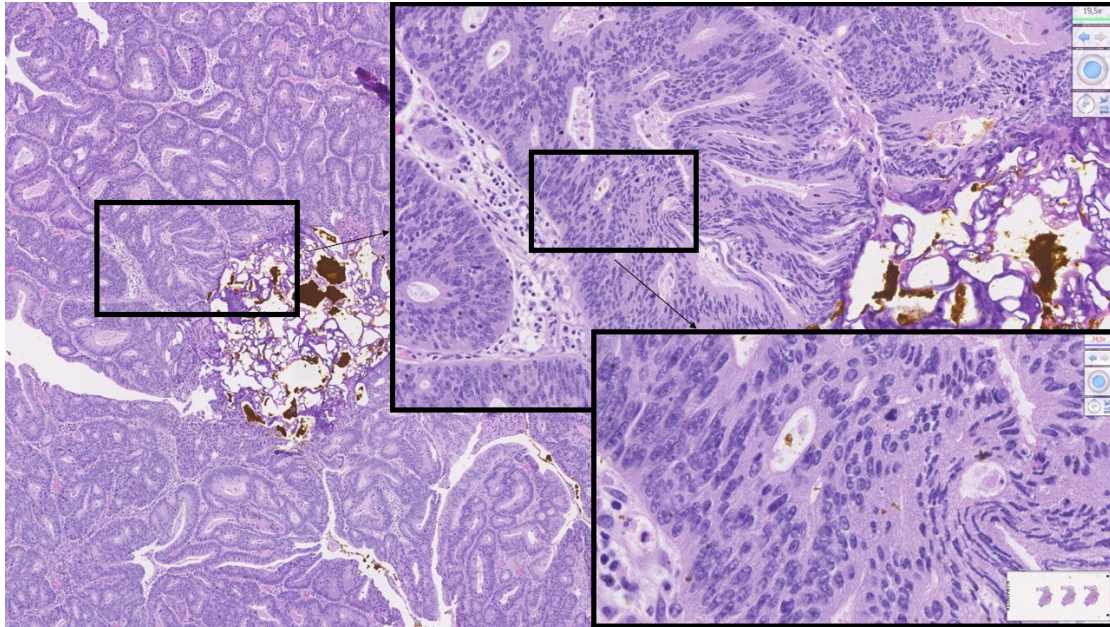


Abbildung 10: Histologische Auswertung eines Messpunktes in Tumorgewebe von Kolon

Nach Aufsuchen der Messpunkte wird das Gewebe histologisch untersucht und definiert. Die meisten Messpunkte im Tumorgewebe wurden nach Tumorgehalt eingeteilt. Zu sehen ist ein Messpunkt im Tumorgewebe eines Kolorektalen Karzinoms mit 80% Tumorgehalt und 20% Tumorstroma. Die gelbe Farbe ist auf die histologische Färbung zur Orientierung zurückzuführen

Unter den 43 Proben waren 9 Rektumkarzinome. Da diese ein anderes Behandlungsregime haben als die Kolonkarzinome, wurden die Patienten separat betrachtet. 3 Proben ergaben ein muzinöses Adenokarzinom. Auf diese wurde auf Grund der geringen Fallzahl nicht weiter eingegangen. Weitere 2 Patienten wurden ausgeschlossen. Grund hierfür war bei einem Patienten der Verlust der histologischen Schnitte, der andere Patient hatte einen Fehler in der Dokumentation und ließ sich nicht mehr zurückverfolgen und zuordnen. Bei 3 Patienten war nur Tumorgewebe vorhanden, bei weiteren 3 Patienten nur Normalgewebe. Abbildung 11 gibt hierzu einen Überblick.

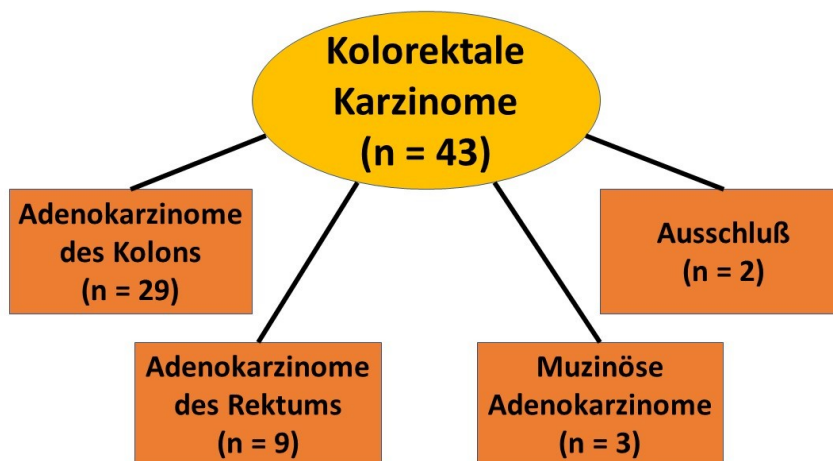


Abbildung 11: Aufteilung der Kolorektalen Karzinome.

Übersicht der Einteilung Kolorektaler Karzinome anhand klinisch-histologischer Merkmale.

In der Summe wurden 1040 Spektren Normalgewebe und 908 Spektren Tumorgewebe aufgenommen. Im Median waren dies pro Patient 23 Spektren Normalgewebe und 19 Spektren Tumorgewebe. Die Anzahl der Spektren sind in Abbildung 12 zu sehen.

Anhand der kolorektalen Karzinome soll zunächst beispielhaft veranschaulicht werden, wie sich die Spektren der OES-Messungen grafisch darstellen. Abbildung 13 zeigt das gemittelte Spektrum aller Proben mit Kolorektalem Karzinom. An diesem Mittelwertspektrum sind die einzelnen Peaks bei bestimmten Wellenlängen zu erkennen. Je höher der Peak, desto höher ist die Anzahl der einfallenden Photonen (*counts*) mit der dort angegebenen Wellenlänge. Jedes Gewebe erhält so einen spezifischen Fingerabdruck. Eine nun neu gemessene Probe wird anhand der vorhandenen Features mit den im Testset gelernten Grenzen zwischen den Klassen beurteilt und dann in Klasse Tumorgewebe oder Normalgewebe eingeteilt. Je nach Übereinstimmung kann dann die Wahrscheinlichkeit angegeben werden, mit welcher die gemessene Probe Tumorgewebe ist oder nicht.

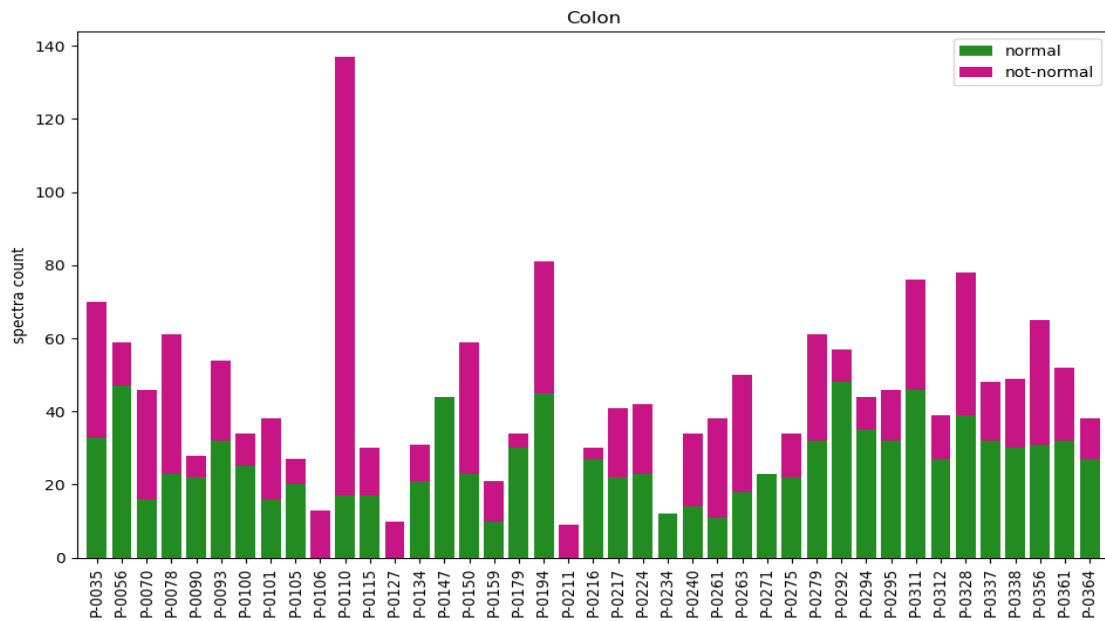


Abbildung 12: Anzahl gemessener Spektren pro Patienten mit Kolonkarzinomen

Jeder Patient hat eine unterschiedliche Anzahl an Messpunkten und somit Spektren in Tumor- und Normalgewebe. Diese ist maßgeblich von der Größe des Gewebestücks abhängig

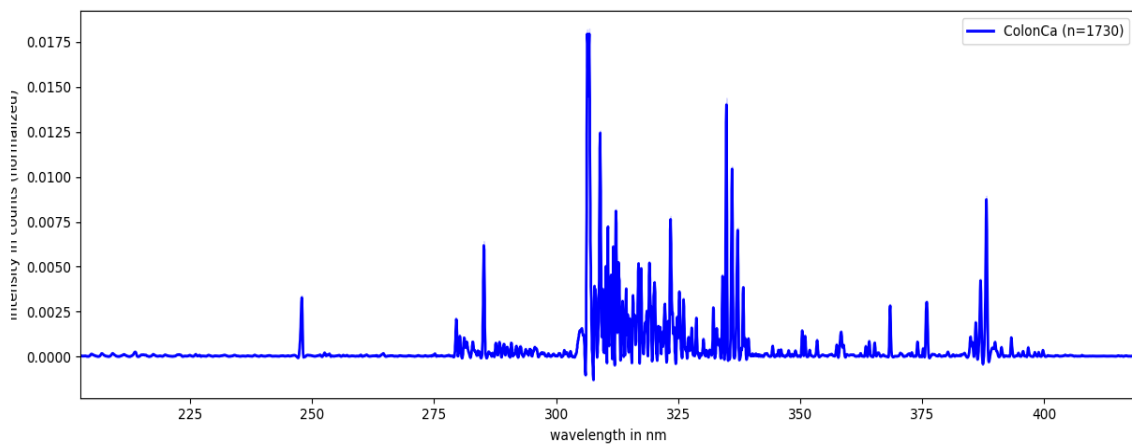


Abbildung 13: Mittelwertspektrum über alle Patienten mit Kolorektalem Karzinom (Tumorgewebe)

Das Mittelwertspektrum ist der Mittelwert aller einzelnen Spektren. Beim Vergleich der Mittelwertspektren von Tumor- und Normalgewebe lassen sich am besten Unterschiede finden

In Abbildung 14 sind einzelne Ausschnitte von Mittelwertspektren zu sehen. Es handelt sich um gemittelte Spektrum Peaks der Patienten mit kolorektalem Karzinom einmal von Normalgewebe und einmal von Tumorgewebe. Anhand dieser Ausschnitte der gemittelten Spektren lässt sich erkennen, dass einige

Spurenelemente wie z.B. Magnesium in Tumorgewebe in einer höheren Konzentration vorhanden sind als in deren Normalgewebe, da dort eine höhere Anzahl an einfallenden Photonen zu erkennen ist. Diese unterschiedlichen Peaks dienen dem Klassifikator als Feature für die Klassifikation des gemessenen Gewebes. Für die Klassifikation wurden für jede gemessene Tumorentität die Features mit der vermeintlich größten Bedeutung ausgewählt. Tabelle 7 zeigt die verwendeten Features für das kolorektale Karzinom.

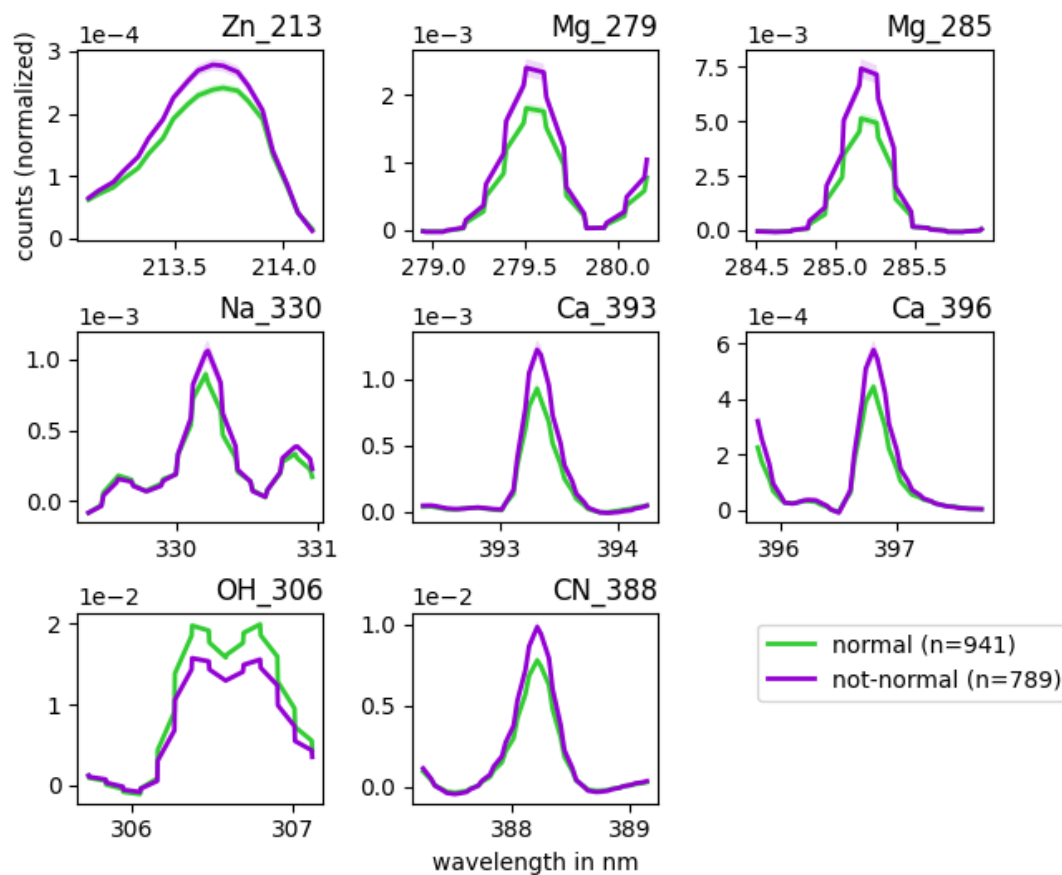


Abbildung 14: Gemittelte Spektren Ausschnitte von Tumor- und Normalgewebe im Vergleich

Zu sehen sind die Emissionspeaks bei Patienten mit kolorektalem Karzinom, die gleichzeitig als Feature verwendet wurden

Tabelle 7: Verwendete Features für die Auswertung aller Patienten mit kolorektalem Karzinom

Die Features sind ausgewählte Wellenlängen, bei denen sich spezifische Emissionspeaks finden
 Zn=Zink, Mg=Magnesium, Na=Natrium, Ca=Calcium, OH=Hydroxylgruppe, CN=Cyanidgruppe

Verwendete Features: Mengenelemente und molekulare Banden mit ihren Wellenlängen als Spektrumpeaks in nm							
Zn	Mg	Mg	Na	Ca	Ca	OH	CN
213,6	279,5	285,2	330,2	393,3	396,8	306,4	388,2

Die Ergebnisse der 29 Patienten mit Kolonkarzinomen von Colon ascendens bis Colon sigmoideum sind in Abbildung 15 dargestellt. Mit einer Sensitivität von 74,4% und einer Spezifität von 77,7% ergibt sich eine Genauigkeit der Gewebewiedererkennung von 75,6%. Die Genauigkeiten der einzelnen Patienten bei der Gewebewiedererkennung ist in einem Bereich von 38-98% relativ heterogen verteilt. Trotz der Tendenz, dass in den gemittelten Spektren aller Patienten das Tumorgewebe bei einigen Spurenelementen Abweichungen zeigen (Abbildung 14), gibt es einige Patienten, bei denen die Gewebewiedererkennung nicht funktioniert. Hier lohnt sich ein Blick auf die einzelnen Spektren jedes Patienten, die in Abbildung 16 zu sehen sind. Auch hier ist eine Tendenz zu erkennen, jedoch erscheint der Unterschied zwischen Tumor- und Normalgewebe nicht mehr so eindeutig. Einige Peaks der Tumorgewebemessungen vermischen sich mit denen von Normalgewebe, jedoch auch andersherum. Es stellt sich die Frage, wie diese Abweichungen zustande kommen und ob es Gründe hierfür gibt. Tabelle 8 zeigt die Überlegungen, welche weitestgehend überprüft wurden.

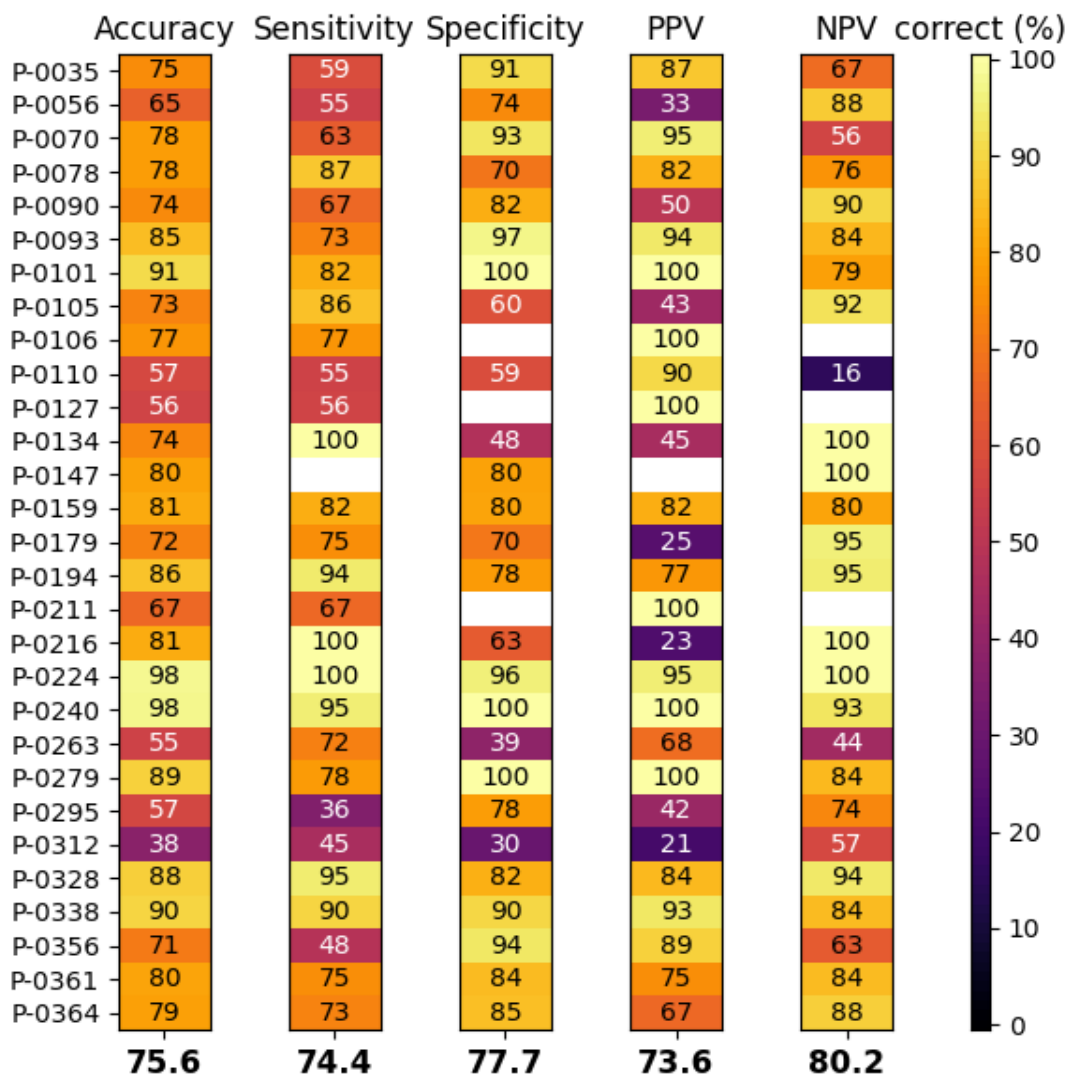


Abbildung 15: Ergebnisse der Patienten mit Kolonkarzinom (exklusive Rektumkarzinome)

Die Ergebnisse werden mit Hilfe der Wahrheitsmatrix mit Sensitivität, Spezifität, Positiv prädiktivem Wert (PPV), Negativ prädiktivem Wert (NPV) und der Genauigkeit (Accuracy) der Gewebewiedererkennung als Mittelwert von Sensitivität und Spezifität dargestellt

Tabelle 8: Auflistung der Überlegungen zu abweichenden Patientenspektren

Die gemessenen Daten wurden noch einmal genau überprüft, um Ursachen für gegebenenfalls bestehende Abweichungen innerhalb der Patientenspektren zu finden

Erneute Überprüfung der Daten nach Kenntnis der Ergebnisse -

Ursachensuche für abweichende Patientenspektren

1. Die Abweichungen kommen durch klinische Parameter der Patienten zustande. Es wurde daher überprüft, ob sich Gemeinsamkeiten oder Unterschiede in den klinischen Daten finden lassen. Überprüft wurden das TNM-Stadium, das Grading und die klinische Diagnose. Die Frage nach einer etwaigen Vorbehandlung erübrigt sich bei den Kolonkarzinomen, da diese primär chirurgisch therapiert werden. Nur das Rektumkarzinom wird teilweise einer Vorbehandlung unterzogen (s.u.). Auch bei den anderen Tumorentitäten wurde die Frage nach Vorbehandlung überprüft.

2. Fehler bei der Datensammlung. Es wurden alle vorhandenen Daten vor allem der Patienten, die nicht gut klassifiziert werden konnten, noch einmal genau angeschaut. Überprüft wurden Daten zum Messvorgang, die makroskopischen Bilder, mögliche Interferenz durch Biobankproben, Transmissionsfehler, Dokumentationsfehler und Übertragungsfehler.

3. Histologische Auswertung – die ausgeprägte Gewebheterogenität bei teils unvollständiger histologischer Auswertung könnte eine besondere Herausforderung für die Gewebewiedererkennung sein.

Diese Überprüfungen wurde auch bei den Tumorentitäten Magenkarzinom und GIST durchgeführt (s.u.).

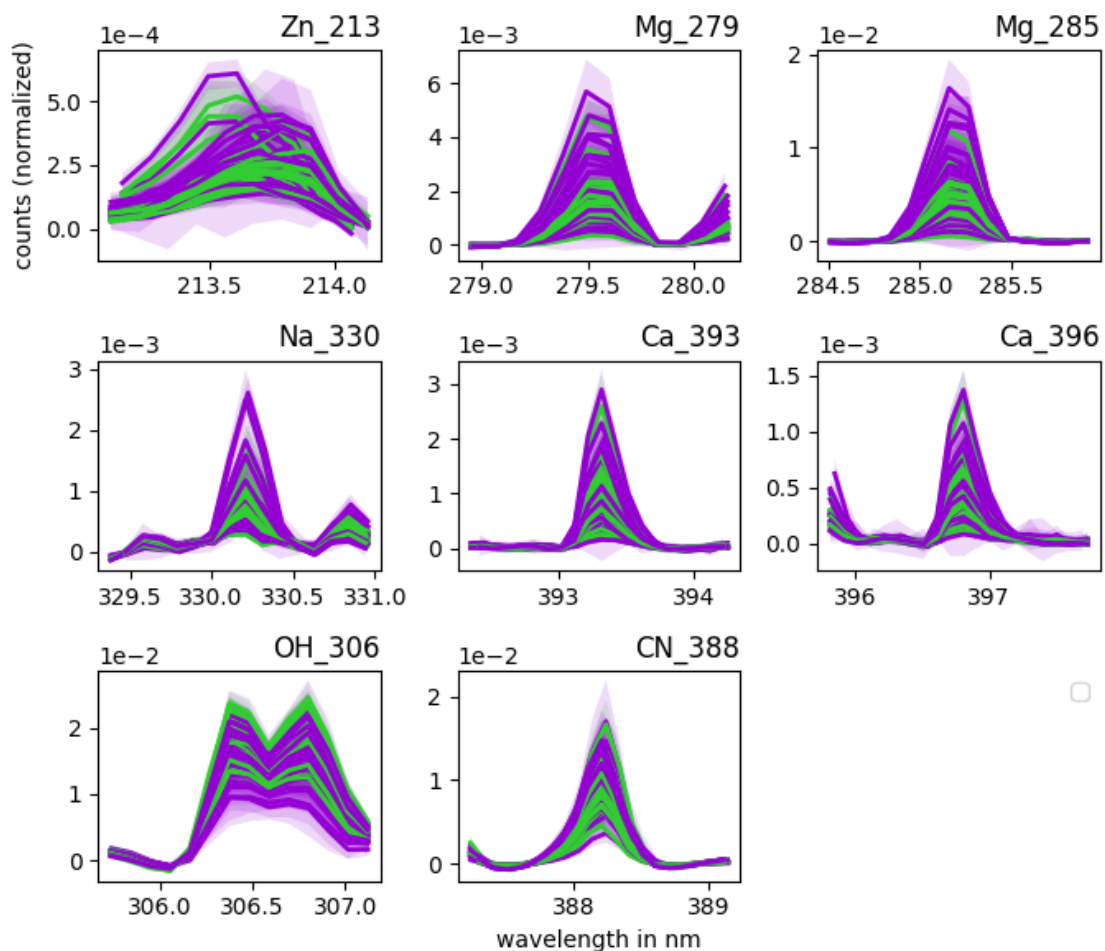


Abbildung 16: Ausschnitte der Spektren jedes einzelnen Patienten mit kolorektalem Karzinom. Lila: Tumorgewebe; Grün: Normalgewebe

Trotz der Tendenz einer Trennung zwischen den Peak-Intensität von Tumor- und Normalgewebe vermischen sich einige Peaks der Tumorgewebemessungen mit denen von Normalgewebe

Bei der Überprüfung war kein eindeutiges Merkmal zu entdecken, das alle Patienten mit schlechter Gewebeerkennung zu einer Gruppe ordnen lässt. Vielmehr wurden einzelne Besonderheiten der Patienten entdeckt, die womöglich ursächlich für den einen oder anderen niedrigen Sensitivitäts- oder Spezifitätswert sein könnten. Diese Patienten sind in Tabelle 9 zu sehen. So bildet sich z.B. ab, dass Messungen in nekrotischen Arealen zu verminderten Sensitivitäten führen. Normalgewebe hat des Weiteren unterschiedliche Gewebsschichten. Eine genaue Definition der Messpunkte (ob z.B. Mucosa oder Bindegewebe) wäre hier sicherlich von Bedeutung gewesen. Es gibt aber auch Patienten mit niedrigem Gewebewiedererkennungswert, die absolut keine

Auffälligkeiten in den Daten gezeigt haben. Bei einigen Patientenproben, die nur makroskopisch beurteilt wurden, wäre eine genaue histologische Auswertung vorteilhaft gewesen. Jedoch gibt es auch einige Proben mit genauer histologischer Auswertung, die mit niedrigen Zahlen abgeschnitten haben.

Tabelle 9: Einzelne Auffälligkeiten bei der Überprüfung der Patienten mit kolorektalem Karzinom nach Kenntnis der Ergebnisse

Die aufgelisteten Merkmale könnten ursächlich für spektrale Abweichungen sein

Patientennummer	Auffälligkeiten
P-0035, P-0056, P-0110, P-0356, P-0361	Keine genaue Histologie - makroskopisch große Nekroseareale
P-0263, P-0364	Normalgewebe aus Caecum
P-0312	Messungen des Normalgewebes nur im Bindegewebe, nicht in der Mucosa
P-0295	Sehr kleine Gewebestücke, die ursprünglich als GIST in der Biobank eingefroren waren

Zu dieser Thematik stellt sich die Frage, ob der Tumorgehalt etwas mit der Genauigkeit der Gewebewiedererkennung zu tun hat. Es wurde daher bei allen Patienten, bei denen eine genaue histologische Untersuchung erfolgt ist, der Tumorgehalt jedes Messpunktes auf Tumorgewebe mit der Sensitivität der Messung korreliert. Die Ergebnisse hierzu sind in Abbildung 17 zu sehen. Es konnte keine Korrelation festgestellt werden. Folglich korreliert bei unseren Ergebnissen ein hoher Tumorgehalt nicht mit einer besseren Sensitivität.

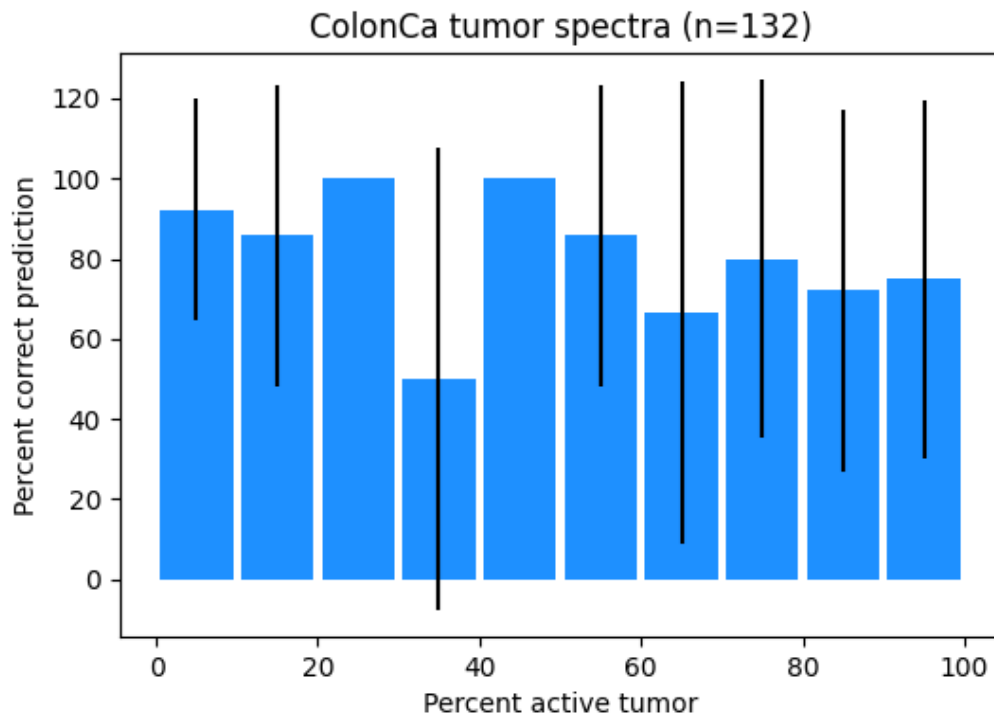


Abbildung 17: Korrelation von Tumorgehalt und Sensitivität bei den kolorektalen Karzinomen

Der Tumorgehalt jedes Messpunktes wurde mit der zugehörigen Sensitivität korreliert. Es konnte keine Korrelation festgestellt werden. Die Annahme, dass ein höherer Tumorgehalt mit einer besseren Sensitivität einhergeht, erwies sich als nicht zutreffend

Die Auswertung der Rektumkarzinome ergab ein ähnliches Ergebnis. Mit einer Sensitivität von 65% und einer Spezifität von 77% ergibt sich eine Genauigkeit der Gewebewiedererkennung von 72%. 3 von 9 Patienten waren vorbehandelt. Hierbei waren keine Unterschiede zwischen Vorbehandlung und primär chirurgischer Therapie festzustellen.

3.5. Magenkarzinome

Die Kohorte der Magenkarzinome umfasst 24 Patienten. Hiervon stammen 18 Proben aus der Biobank und 6 Proben sind Frischgewebe. Von den 24 Patienten sind 15 vorbehandelt. Dies liegt am gängigen Therapieregime des Magenkarzinoms, welches für viele Patienten vor der chirurgischen Magenresektion eine neoadjuvante Chemotherapie empfiehlt [41].

Viele Proben aus dem Magen und den GIST stammen aus der Biobank. Beim Vorgang des Einfrierens und Einbettens wurde dabei am UKT eine Zeit lang das Einbettmedium TissueTek verwendet. Es ist daher davon auszugehen, dass die Substanz auch bei der Messung der Biobankproben vorhanden ist. Um eine mögliche Interferenz zu untersuchen, wurde die Substanz TissueTek ebenfalls spektroskopisch untersucht. Dabei konnten keine relevanten Emissionslinien für Zn, Mg, Na und Ca festgestellt werden.

Die histologische Auswertung war bei den Magenkarzinomen (Abbildung 18) deutlich anspruchsvoller als bei den Kolonkarzinomen und den GIST. Durch die vielen Patienten mit Vorbehandlung ist das Restgewebe häufig vernarbt oder nekrotisch (Abbildung 19) und es war schwierig, aktive Tumorzellen zu finden. So konnten bei einigen Patienten Messpunkte nur mit weniger als 1% Tumorgewebe definiert werden. Bei 5 Patienten gab es nur Normalgewebe zu messen. Bei einem Patienten fand sich nur Tumorgewebe. Drei Patienten wurden bei den Magenproben ausgeschlossen. Grund hierfür war bei einem Patienten ein lymphoepitheliales Karzinom. Die beiden anderen hatten ein abweichendes Ursprungsgewebe (Pankreas & Ösophagus). Von den 24 Patienten wurden 5 Patientenproben makroskopisch als Tumor- oder Normalgewebe definiert, die restlichen 19 Proben wurden einer genauen histologischen Untersuchung unterzogen. Abbildung 19 zeigt beispielhaft die histologische Auswertung eines Messpunktes im Tumorgewebe des Magens.

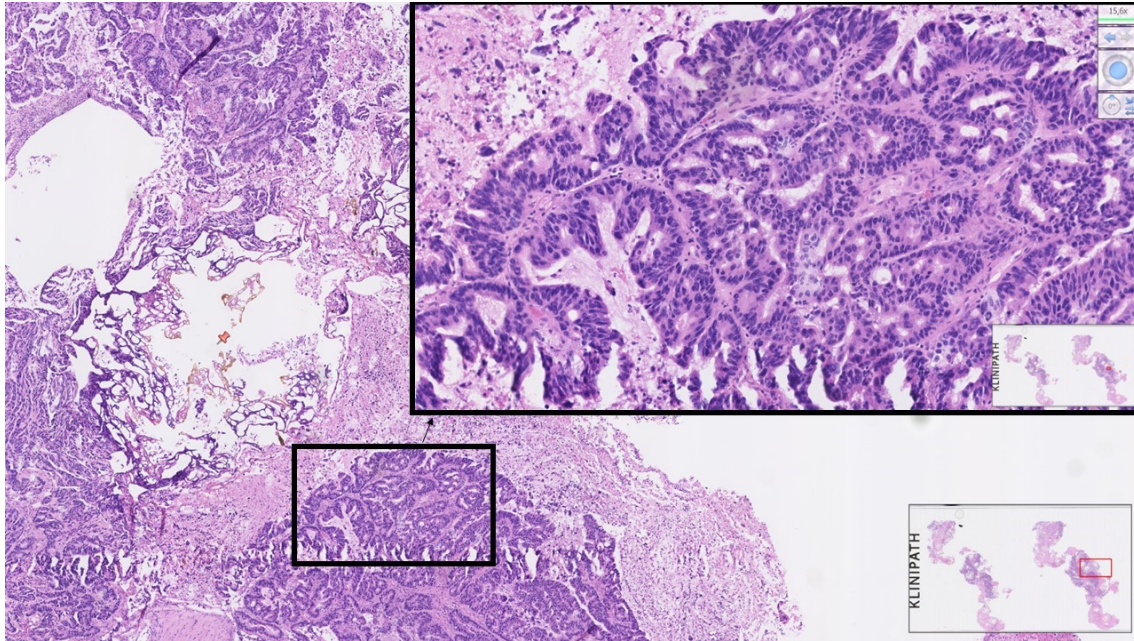


Abbildung 18: Histologische Auswertung eines Messpunktes in Tumorgewebe von Magen

Der Messpunkt wurde mit 70% Tumor und 30% Tumornekrose beschrieben

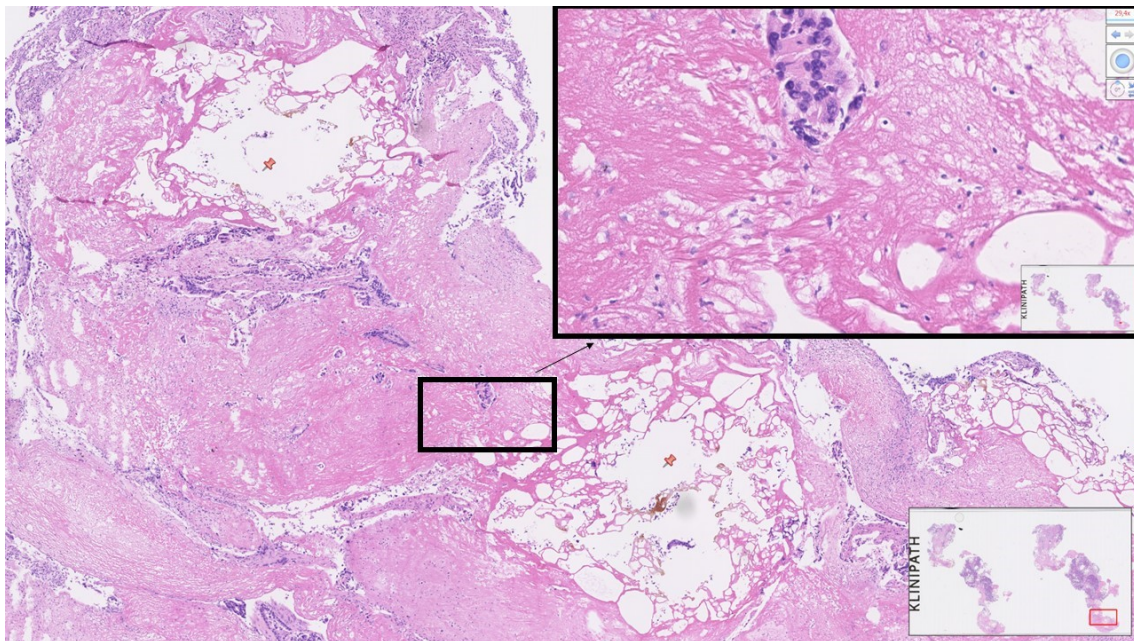


Abbildung 19: Histologische Auswertung eines Messpunktes in nekrotischem Tumorgewebe

Die zwei Messpunkte wurden in nekrotischen Arealen des Tumors (Magen) gesetzt. Es sind kaum noch Zellen oder Zellstrukturen auszumachen. Solche Messpunkte wurden nicht in die Klasse „Tumorgewebe“ aufgenommen

In der Summe wurden 518 Spektren Normalgewebe und 442 Spektren Tumorgewebe aufgenommen. Im Median waren dies pro Patient 15 Spektren Normalgewebe und 14 Spektren Tumorgewebe. Die Anzahl der Spektren sind in Abbildung 20 zu sehen.

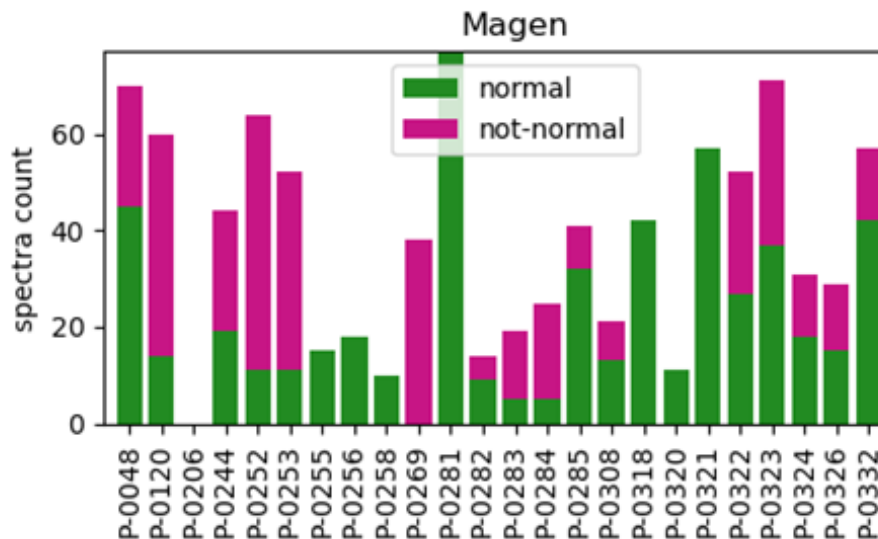


Abbildung 20: Anzahl gemessener Spektren pro Patienten mit Magenkarzinom

Jeder Patient hat eine unterschiedliche Anzahl an Messpunkten und somit Spektren in Tumor- und Normalgewebe. Diese ist maßgeblich von der Größe des Gewebestücks abhängig

In einem ersten Schritt wurden alle Proben miteinander verglichen. Mit einer Sensitivität von 52,3% und einer Spezifität von 77,0% ergab die Genauigkeit der Gewebewiedererkennung 66,7% (Abbildung 21). Ein genauerer Blick auf die spektroskopische Auswertung zeigt die in Abbildung 22 dargestellten Auffälligkeiten. Die Proben unterscheiden sich vor allem anhand bestimmter Magnesium Peaks (Tabelle 10). So gab es eine etwas größere Gruppe (n=7) mit höheren Magnesium Peaks und eine etwas kleinere Gruppe (n=6) mit niedrigeren Magnesium Peaks. Bei 4 Patienten gab es nur Normalgewebe, welches gut mit dem übrigen Normalgewebe übereinstimmte. Weiterer 4 Patienten zeigten jedoch auch einen hohen Magnesium Peak im Normalgewebe.

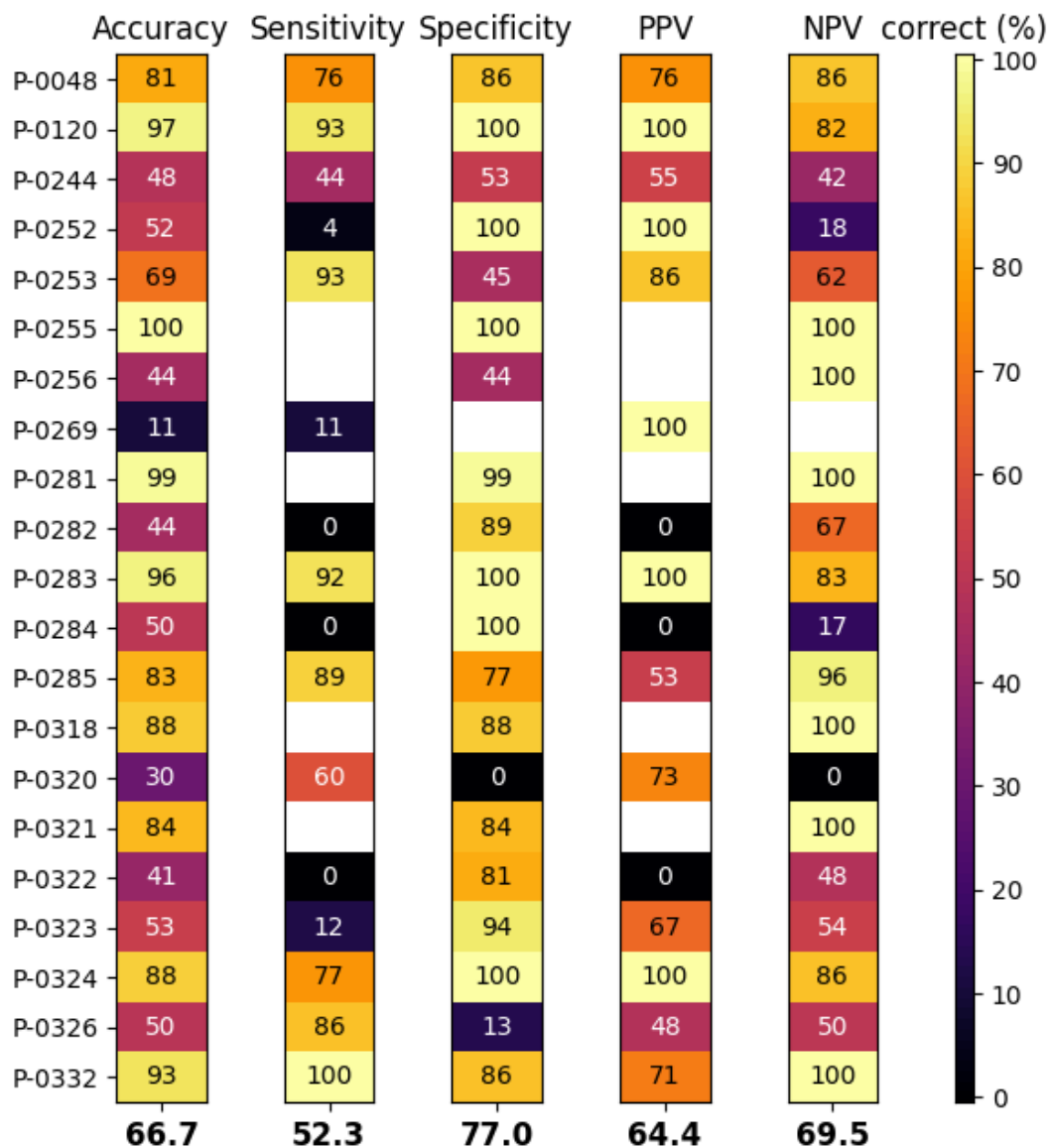


Abbildung 21: Ergebnisse aller Patienten mit Magenkarzinom

Die Ergebnisse werden mit Hilfe der Wahrheitsmatrix mit Sensitivität, Spezifität, Positiv prädiktivem Wert, Negativ prädiktivem Wert und der Genauigkeit der Gewebewiedererkennung als Mittelwert von Sensitivität und Spezifität dargestellt

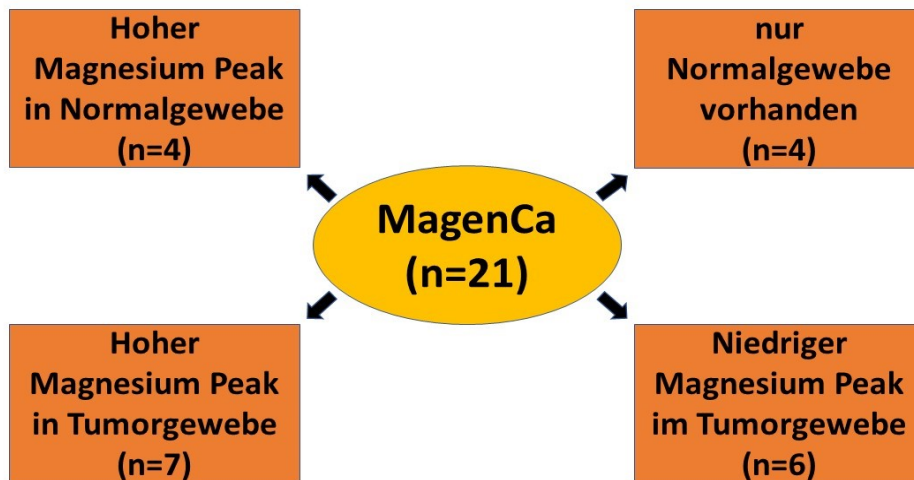


Abbildung 22: Auffälligkeiten der ersten Auswertung der Magenkarzinome

Nach der ersten Auswertung haben sich vier verschiedene Gruppen gezeigt

Tabelle 10: Verwendete Features bei Patienten mit Magenkarzinom

*Die Features sind ausgewählte Wellenlängen, bei denen sich spezifische Emissionspeaks finden
Mg=Magnesium*

Verwendete Features: Mengenelemente und deren Wellenlängen als Spektrumpeaks in nm		
Mg	Mg	Mg
279,5	280,2	285,2

Für die größere Gruppe scheint Magnesium ein sehr starkes Feature zu sein. Daher untersuchten wir die Gruppe mit den hohen Magnesium Peaks noch einmal einzeln. Patienten, die nur Normalgewebe aufwiesen, wurden in die Extraanalyse mit einbezogen. Mit einer Sensitivität von 85,9% und einer Spezifität von 91,9% ergab sich hier eine Genauigkeit der Gewebewiedererkennung von 89,5%. Dies ist in Abbildung 23 dargestellt. Auch hier stellt sich die Frage, wie dieses Ergebnis zustande kommt. Wie bei den

kolorektalen Karzinomen (Tabelle 8) wurden die Daten einzelner Patienten untersucht (Tabelle 11). Bei den Magenkarzinomen wurden dann noch zusätzliche Parameter auf Gemeinsamkeiten oder Unterschiede der beiden sich relativ klar voneinander trennenden Gruppen untersucht. Diese waren der Tumorgehalt der Proben, die Anzahl der Spektren, eine gegebenenfalls durchgeführte Vorbehandlung und ob das Gewebe nativ war oder aus der Biobank kommt. Diese Überprüfung ist in Tabelle 9 dargestellt.

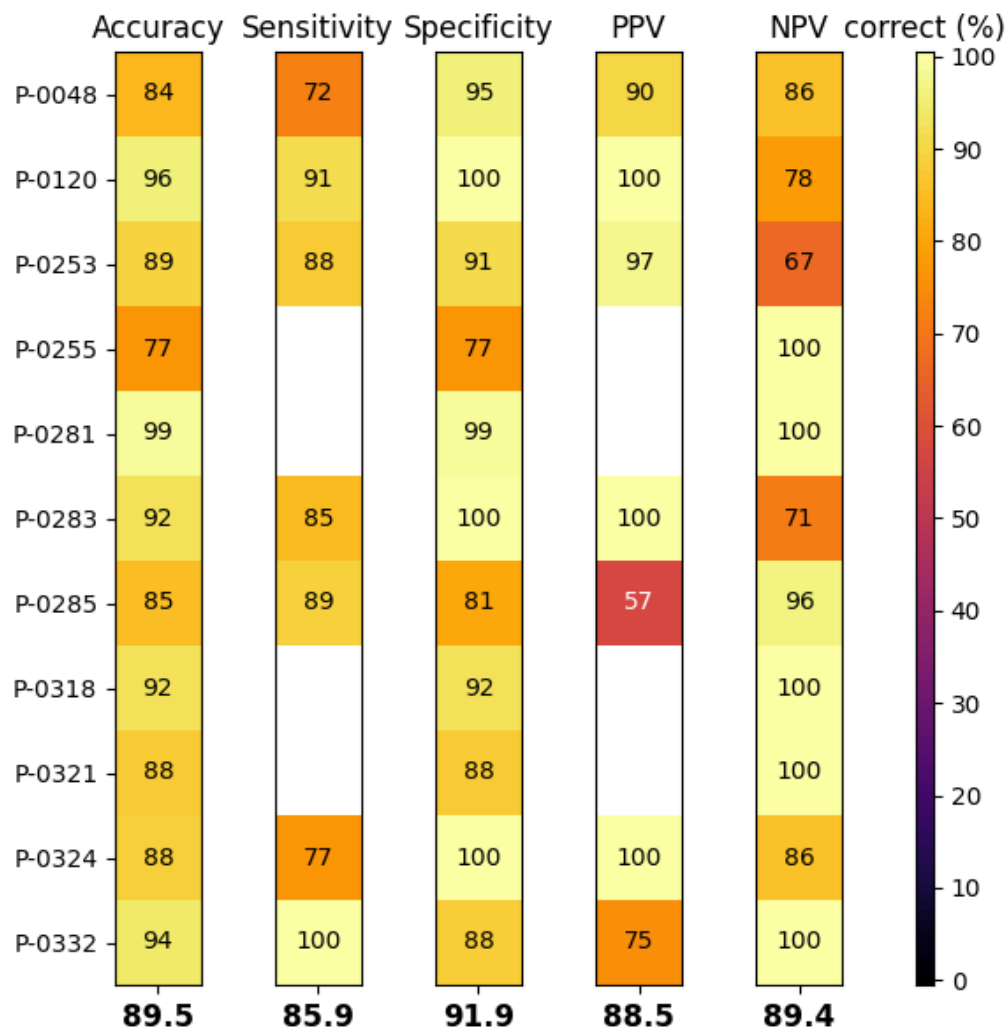


Abbildung 23: Ergebnisse der Magenkarzinome bei Betrachtung der Patienten mit hohem Magnesiumpeak und Patienten mit ausschließlich Normalgewebe

Die Ergebnisse werden mit Hilfe der Wahrheitsmatrix mit Sensitivität, Spezifität, Positiv prädiktivem Wert (PPV), Negativ prädiktivem Wert (NPV) und der Genauigkeit (Accuracy) der Gewebewiedererkennung als Mittelwert von Sensitivität und Spezifität dargestellt

Tabelle 11: Einzelne Auffälligkeiten bei der Überprüfung der Patienten mit Magenkarzinomen nach Kenntnis der Ergebnisse

Die aufgelisteten Merkmale könnten ursächlich für spektrale Abweichungen sein

Patientennummer	Auffälligkeiten
P-0244, P-0252, P-0253	keine Histologie vorhanden – Makroskopie: Normalgewebe kann auch Tumorgewebe sein
P-0256, P-0320, P-0323, P-0324	Narbengewebe mit sehr wenig Tumorzellen nach Therapie
P-0269, P-0322	Viele Messpunkte in Nekrosearealen
P-320, P-0326	Normalgewebe histologisch keine Mucosa
P-0282	Histologisch 1% Tumorgewebe, 99% Stroma

Bei Betrachtung der beiden Gruppen ist für die Gruppe mit dem niedrigen Magnesium Peak kein gemeinsamer Unterschied festzustellen. Die überprüften Parameter waren homogen über die beiden Gruppen verteilt. Die Überprüfung der einzelnen Patienten kann jedoch einigen Patienten mit schlechter Sensitivität oder Spezifität eine mögliche Begründung liefern. Wie schon bei den kolorektalen Karzinomen scheinen Nekroseareale das Spektrum zu verfälschen. Generell funktioniert die Gewebewiedererkennung bei niedrigem Tumorgehalt eher schlecht. Einige weitere Patienten sind durch fehlende Histologie kaum zu bewerten. So können für die Patientengruppen „niedriger Magnesium Peak in Tumorgewebe“ und „hoher Magnesium Peak in Normalgewebe“ für die meisten Spektren mögliche Erklärungen für die Abweichung des Magnesium Peaks gefunden werden. Eine tatsächliche Trennung der Tumorentität in zwei Spektren Gruppen scheint daher unwahrscheinlich.

Tabelle 12: Untersuchte Parameter auf Gemeinsamkeiten und Unterschiede der beiden verschiedenen Gruppen bei der Auswertung der Magenkarzinom Spektren

Es zeigen sich keine eindeutigen Merkmale der beiden Gruppen, die die unterschiedlichen Magnesium Peaks erklären würden

	Hoher Mg-Peak	Niedriger Mg-Peak
Durchschnittlicher Tumorgehalt (<50%/>50%)	3/4	3/3
Spektrenanzahl Median (TG)	15	29,5
Vorbehandlung (ja/nein)	5/2	4/2
Nativ/Biobank	2/5	1/5

3.6. Gastrointestinale Stromatumore (GIST)

Gastrointestinale Stromatumore kommen insgesamt seltener vor als die anderen beiden Tumorentitäten. Die Kohorte umfasst 30 Patientenproben, von denen 26 aus der Biobank und 4 natives Frischgewebe sind. Von den 30 Patienten waren 6 vorbehandelt. Da Gastrointestinale Stromatumore ihren Ursprung im Stroma haben, welches sich im ganzen Gastrointestinaltrakt befindet, kommen GIST auch im ganzen Gastrointestinaltrakt vor. Abbildung 25 gibt hierzu einen Überblick über die Lokalisationen der gemessenen Proben. Die meisten Proben stammen aus dem Magen, gefolgt von Dünndarm und Lebermetastasen.

Die histologische Auswertung war bei den GIST am deutlichsten. Die Tumore sind gut abgegrenzt, sehr homogen und zeigen eine hohe Rate an Tumorzellen. So ergaben sich häufig Trefferquoten von 95% Tumorgewebe und 5% Stroma. Ein solcher Messpunkt ist in Abbildung 24 zu sehen. Es stellte sich heraus, dass

bei 6 Patienten nur Tumorgewebe und bei einem Patienten nur Normalgewebe vorhanden war.

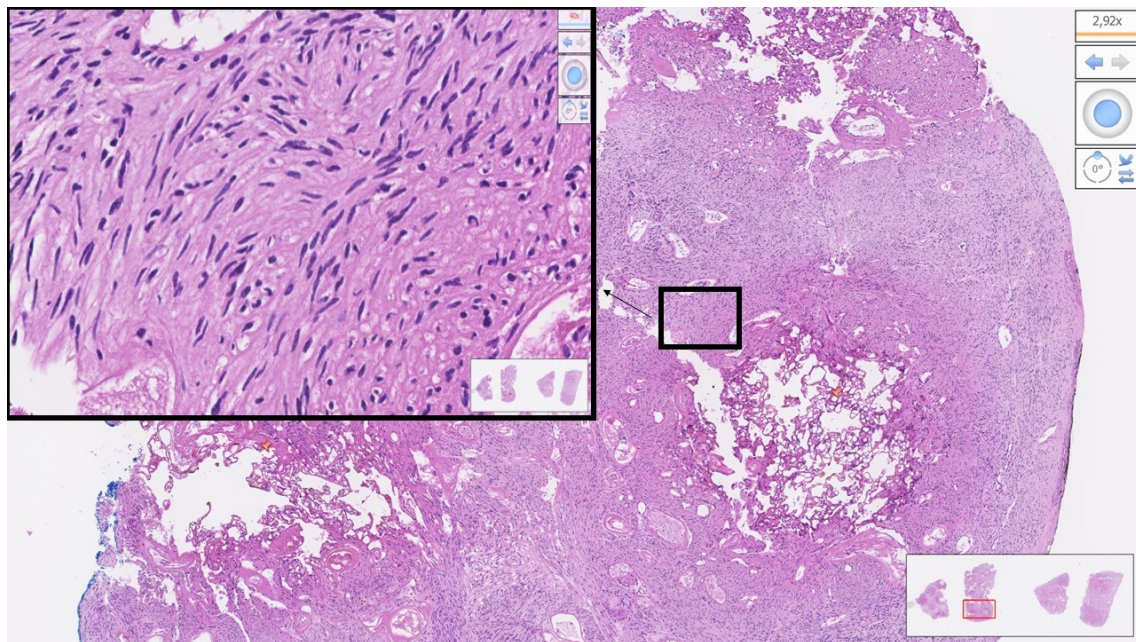


Abbildung 24: Histologische Auswertung eines Messpunktes in Tumorgewebe eines GIST

Bei den GIST zeigten die Messpunkte sehr häufig 95% Tumorgewebe und 5% Tumorstroma. Auch der hier abgebildete Messpunkt wurde so definiert

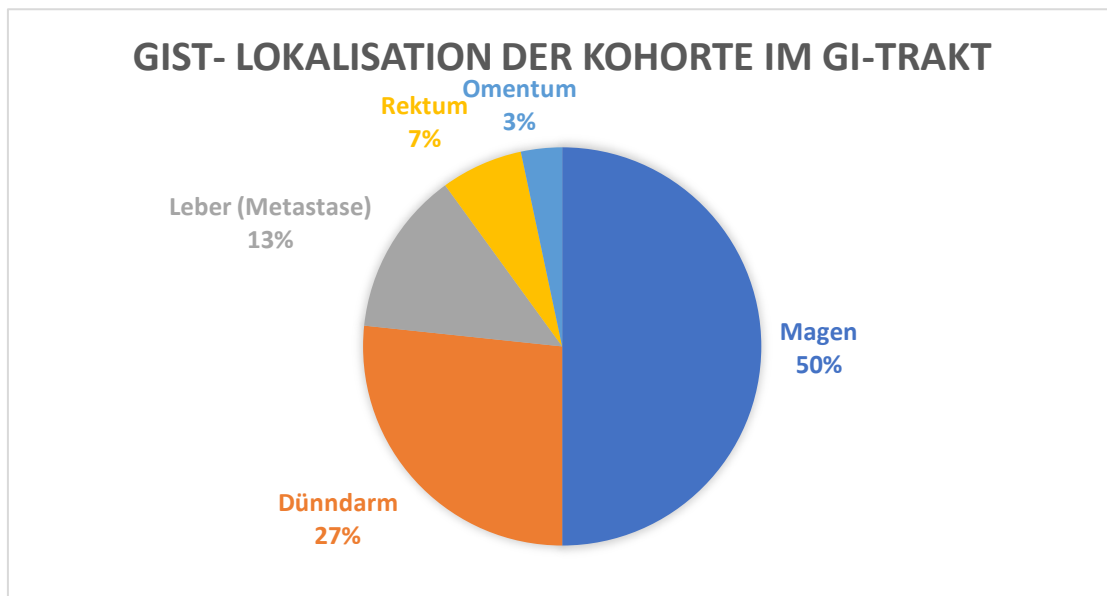


Abbildung 25: Verteilung der gemessenen GIST-Tumore im Gastrointestinaltrakt

Da GIST im ganzen Gastrointestinaltrakt vorkommen, sind auch die gemessenen Proben über diesen verteilt

Bei einem Patienten ergab die Histologie ein cholangiozelluläres Karzinom, weshalb er in der Auswertung nicht weiter berücksichtigt wurde. Von den 30 Patienten wurden 4 Patientenproben makroskopisch als Tumor- oder Normalgewebe definiert, die restlichen 26 Proben wurden einer genauen histologischen Untersuchung unterzogen.

Es konnten in der Summe 478 Spektren Normalgewebe und 1069 Spektren Tumorgewebe aufgezeichnet werden. Pro Patienten wurden im Median 15 Spektren Normalgewebe und 31 Spektren Tumorgewebe gemessen. Eine Übersicht der Spektren Anzahl pro Patienten bietet Abbildung 26. Gut zu erkennen ist der Unterschied in der Anzahl der Spektren pro Probe. Im Gegensatz zu den anderen untersuchten Tumorentitäten ließen sich bei den GIST nicht so viele Messpunkte im Normalgewebe sammeln. Die Therapie bei Kolon- und Magenkarzinomen besteht oft in einer Entfernung des Organs oder großer Teile davon, sodass sich hier auch mehr Messpunkte im Normalgewebe sammeln lassen.

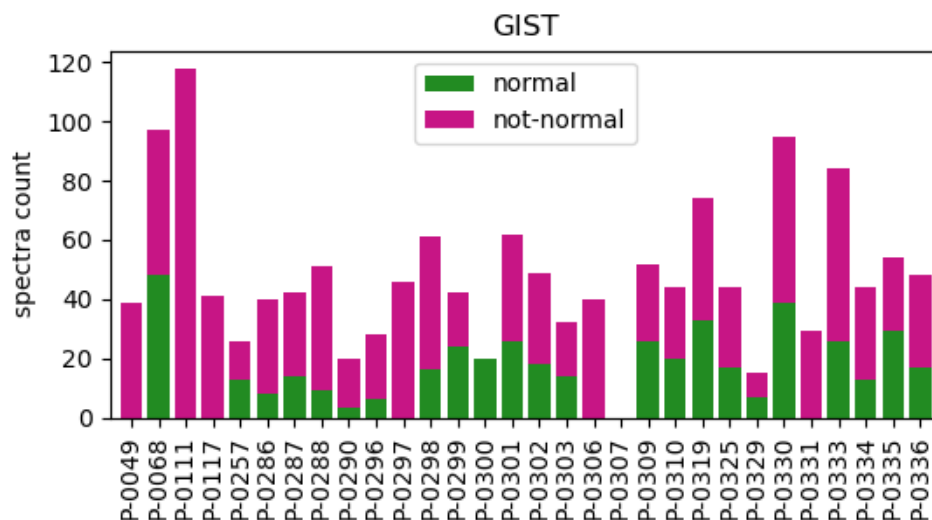


Abbildung 26: Anzahl gemessener Spektren pro Patienten mit GIST

Jeder Patient hat eine unterschiedliche Anzahl an Messpunkten und somit Spektren in Tumor- und Normalgewebe. Diese ist maßgeblich von der Größe des Gewebestücks abhängig

Die verwendeten Features zeigt Tabelle 13. Auch hier erfolgt zunächst ein Blick auf die Ergebnisse aller GIST-Patienten. Diese sind in Abbildung 27 dargestellt. Mit einer Sensitivität von 55,8% und einer Spezifität von 73,2% ergab sich hier eine Genauigkeit der Gewebewiedererkennung von 62,2%. Auf den ersten Blick erscheinen diese Zahlen nicht gut, jedoch müssen diese genauer betrachtet werden.

Tabelle 13: Verwendete Features der GIST im Magen

*Die Features sind ausgewählte Wellenlängen, bei denen sich spezifische Emissionspeaks finden
Zn=Zink, Mg=Magnesium, Na=Natrium, Ca=Calcium*

Verwendete Features: Mengenelemente und deren Wellenlängen als Spektrumpeaks in nm						
Zn	Mg	Mg	Mg	Na	Ca	Ca
213,6	279,5	280,2	285,2	330,2	393,3	396,8

Bei der Gewebewiedererkennung von Normalgewebe (Spezifität) muss bedacht werden, dass in der Auswertung aller Patienten mit GIST verschiedene Normalgewebe enthalten sind, wie Abbildung 26 zeigt. So sind z.B. P-0330 aus Omentum, P-0309 und P-0288 aus Lebergewebe und P-0335 und P-0336 aus dem Rektum. Bei P-0068 hat sich herausgestellt, dass in der Auswertung fälschlicherweise eine Probe als Normalgewebe eingetragen wurde, wobei diese Probe nur aus Tumorgewebe besteht. Für die meisten Ausreißer ist hier also eine Erklärung zu finden.

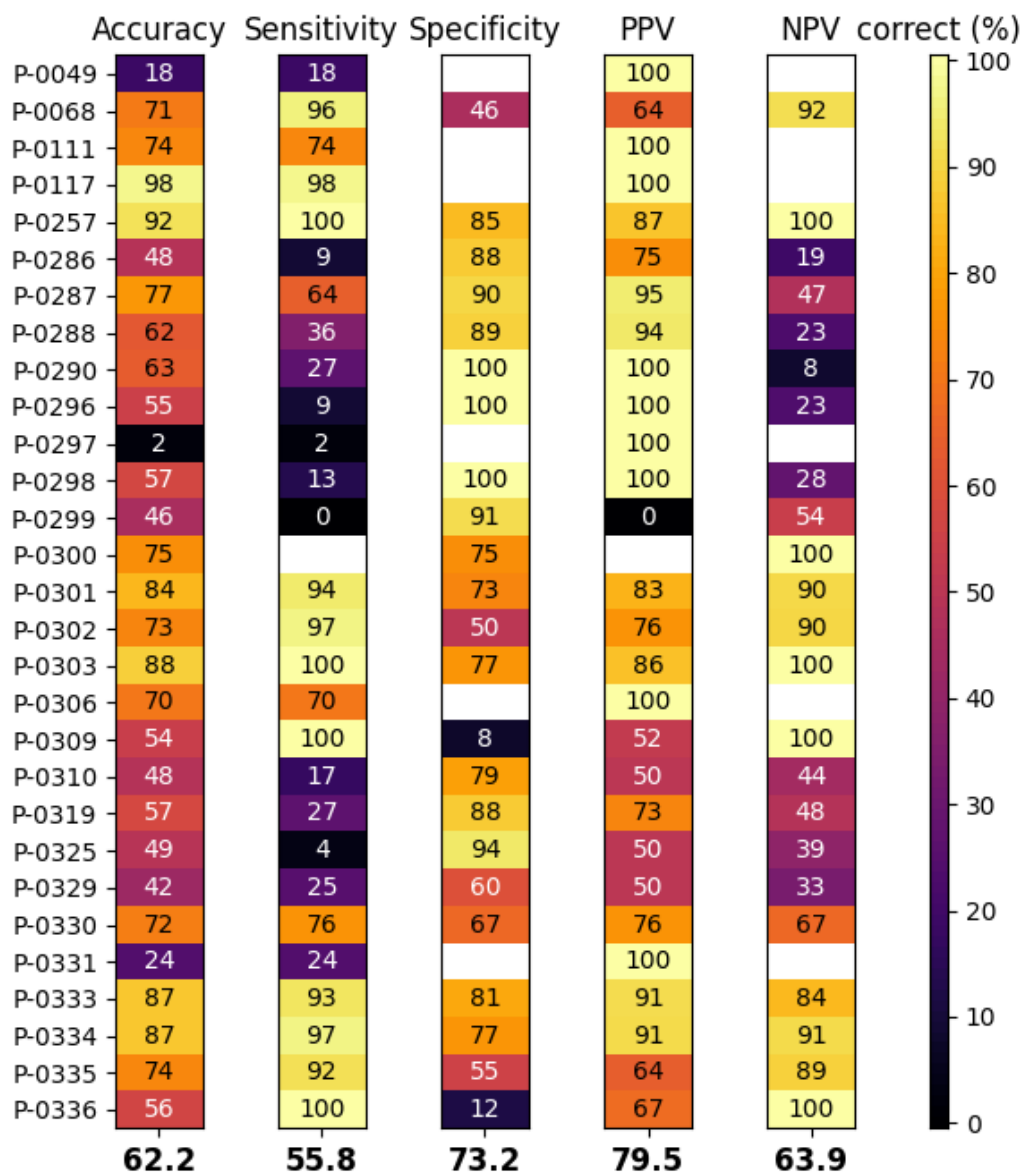


Abbildung 27: Ergebnisse aller Patientin mit GIST

Die Ergebnisse werden mit Hilfe der Wahrheitsmatrix mit Sensitivität, Spezifität, Positiv prädiktivem Wert, Negativ prädiktivem Wert und der Genauigkeit der Gewebewiedererkennung als Mittelwert von Sensitivität und Spezifität dargestellt

Bei der Gewebewiedererkennung von Tumorgewebe (Sensitivität) erkennt man eine klare Tendenz zweier Gruppen. So scheint der Klassifikator manche Patienten sehr gut einzuordnen und andere wiederum sehr schlecht. Von den insgesamt 29 ausgewerteten Patienten haben 11 Patienten eine Sensitivität von

>90% und 13 Patienten eine Sensitivität <37%. Nur 4 Patienten befinden sich dazwischen. In einer Patientenprobe war kein Tumorgewebe zu finden. Anhand dieser Ergebnisse wurde analog zu den beiden anderen Tumorentitäten eine genaue Untersuchung der Daten durchgeführt (Tabelle 8). Die Ergebnisse sind in Tabelle 14 aufgeführt. Zu den einzelnen Patienten ließen sich nur wenige Unstimmigkeiten finden. Betrachtet man die 13 Patienten mit einer Sensitivität <37%, so befinden sich 7 von insgesamt 8 Proben aus dem Dünndarm in dieser Gruppe. Von den 11 Patienten >90% sind 8 aus dem Magen, 2 aus dem Rektum und einer aus einer Lebermetastase.

Tabelle 14: Einzelne Auffälligkeiten bei der Überprüfung der Patienten mit GIST nach Kenntnis der Ergebnisse

Die aufgelisteten Merkmale könnten ursächlich für spektrale Abweichungen sein.

**Hinweis zum Messfehler: diese sind technisch bedingt und kamen zustande bei Verschmutzung der Elektroden Spitze. Einige wenige Proben führten aus unklarer Ursache sehr häufig zu einer solchen Verschmutzung und somit zu einem Messfehler. Die Spektren könnten dadurch beeinträchtigt sein*

Patientennummer	Auffälligkeiten
-----------------	-----------------

P-0298	Fast ausschließlich Nekroseareale
--------	-----------------------------------

P-0290	Viele Messfehler* (s. Kap. 2.4.1.)
--------	------------------------------------

P-0331	Normalgewebe aus der Leber bei Tumorgewebe eingetragen
--------	--

Da die GIST an unterschiedlichen Lokalisationen im Gastrointestinaltrakt vorkommen, wurde im Verlauf auch eine separate Analyse der größten Gruppe, der GIST im Magen, durchgeführt. In Abbildung 28 sind die Ergebnisse dieser Analyse dargestellt. Mit einer Sensitivität von 64% und einer Spezifität von 86% ergibt sich eine Genauigkeit von 75% für die Zuordnung der Messpunkte zu Normal- oder Tumorgewebe. Die Verbesserung der Spezifität erklärt sich durch das nun einheitliche Normalgewebe (Magen), wobei die Spezifität von P-0068 nach wie vor nicht beachtet werden darf, da hier Tumorgewebe fälschlicherweise

als Normalgewebe eingetragen wurde. Betrachtet man die Sensitivität, fallen auch hier zwei Gruppen auf, die sich voneinander unterscheiden. 5 der 15 Patientenproben mit GIST im Magen fallen deutlich schlechter aus als die restlichen 10. In einem nächsten Schritt wurden die Spektren der einzelnen Patienten noch einmal genauer untersucht. Dabei zeigten 4 Patienten niedrige Magnesium Peaks in Tumorgewebe. Diese 4 Patienten gehören zu den 5 Patienten mit schlechter Gewebedifferenzierung.

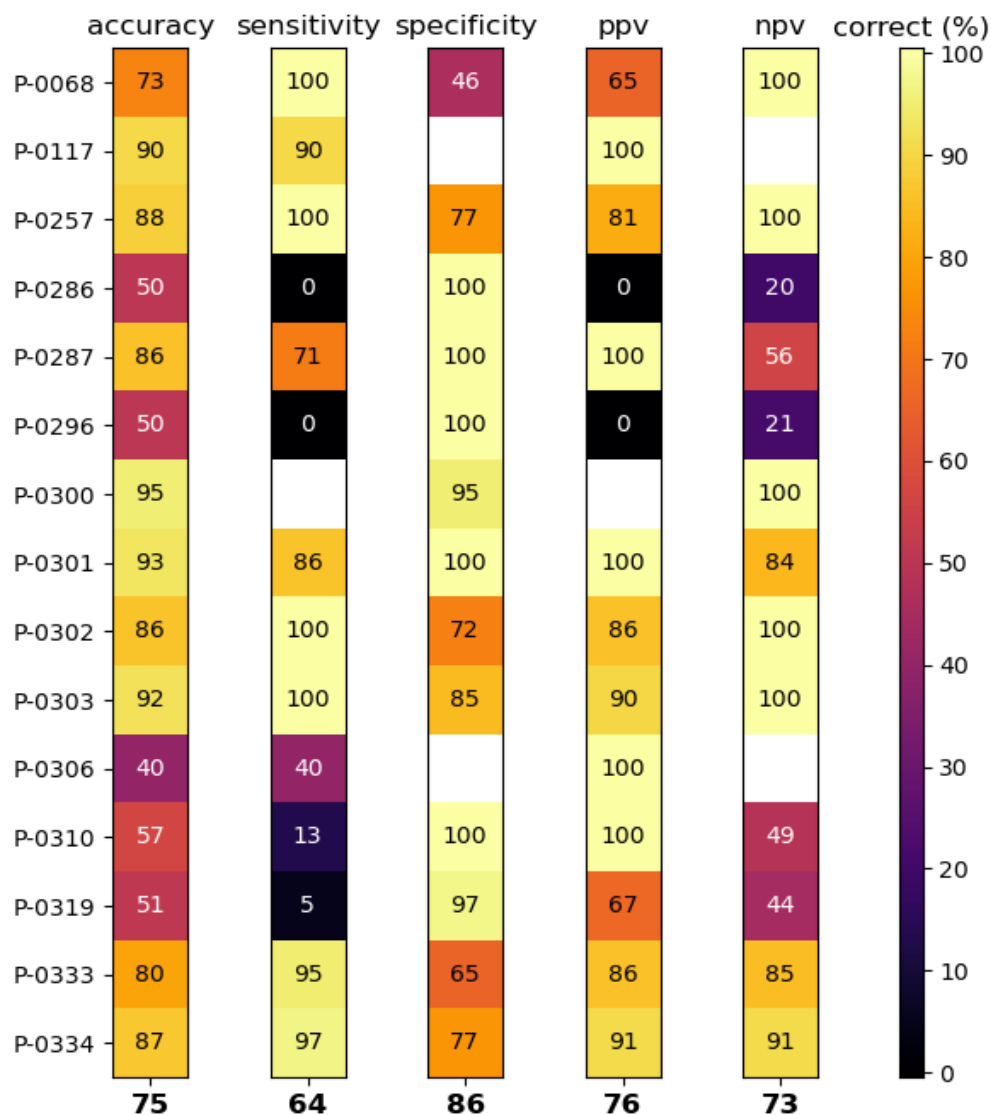


Abbildung 28: Ergebnisse der GIST mit Lokalisation im Magen

Die Ergebnisse werden mit Hilfe der Wahrheitsmatrix mit Sensitivität, Spezifität, Positiv prädiktivem Wert (PPV), Negativ prädiktivem Wert (NPV) und der Genauigkeit (Accuracy) der Gewebewiedererkennung als Mittelwert von Sensitivität und Spezifität dargestellt

In einem weiteren Schritt wurde untersucht, wie sich die Proben mit den hohen Magnesium Peaks untereinander verhalten. Bei Betrachtung der Ausschnitte von Spektren der einzelnen Patienten mit GIST im Magen in Abbildung 29 fällt die klare Trennung dieser Spektren auf, was vor allem bei Zink, Magnesium und Calcium zu sehen ist. In Abbildung 30 sind Ergebnisse dieser Auswertung dargestellt. Die Sensitivität steigt auf 92%, die Spezifität sinkt jedoch auf 78%. Für die Genauigkeit ergibt sich eine richtige Zuordnung von 85%. Auch hier scheint Magnesium also ein starkes Feature für die Gewebeerkennung zu sein. Hier stellt sich die Frage, was die 5 Patienten mit niedrigem Magnesium Peak vom Rest unterscheidet. Eine genauere Untersuchung dieser 5 Patienten ergab keine besonderen Auffälligkeiten. Sie sind histologisch klar als GIST zu erkennen.

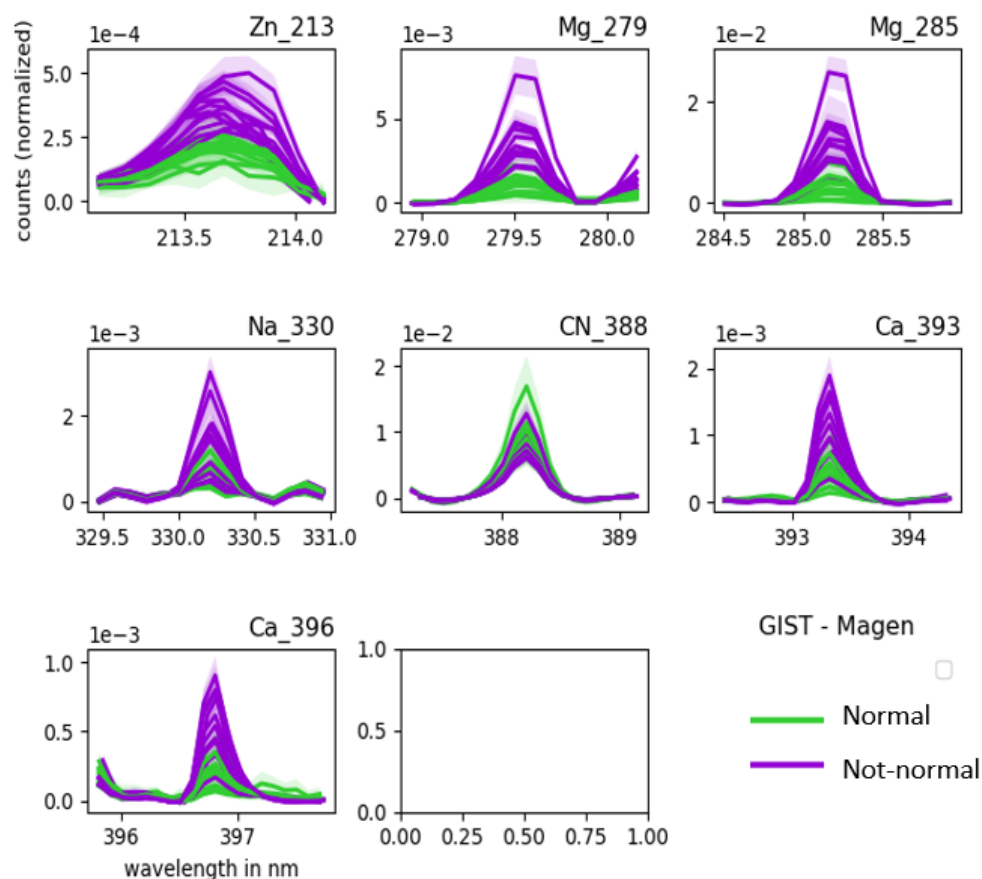


Abbildung 29: Ausschnitte von Spektren der einzelnen Patienten mit GIST im Magen mit hohem Magnesium Peak

Zu sehen ist die klare Trennung der Spektren, was vor allem bei Zink, Magnesium und Calcium sehr eindeutig ist

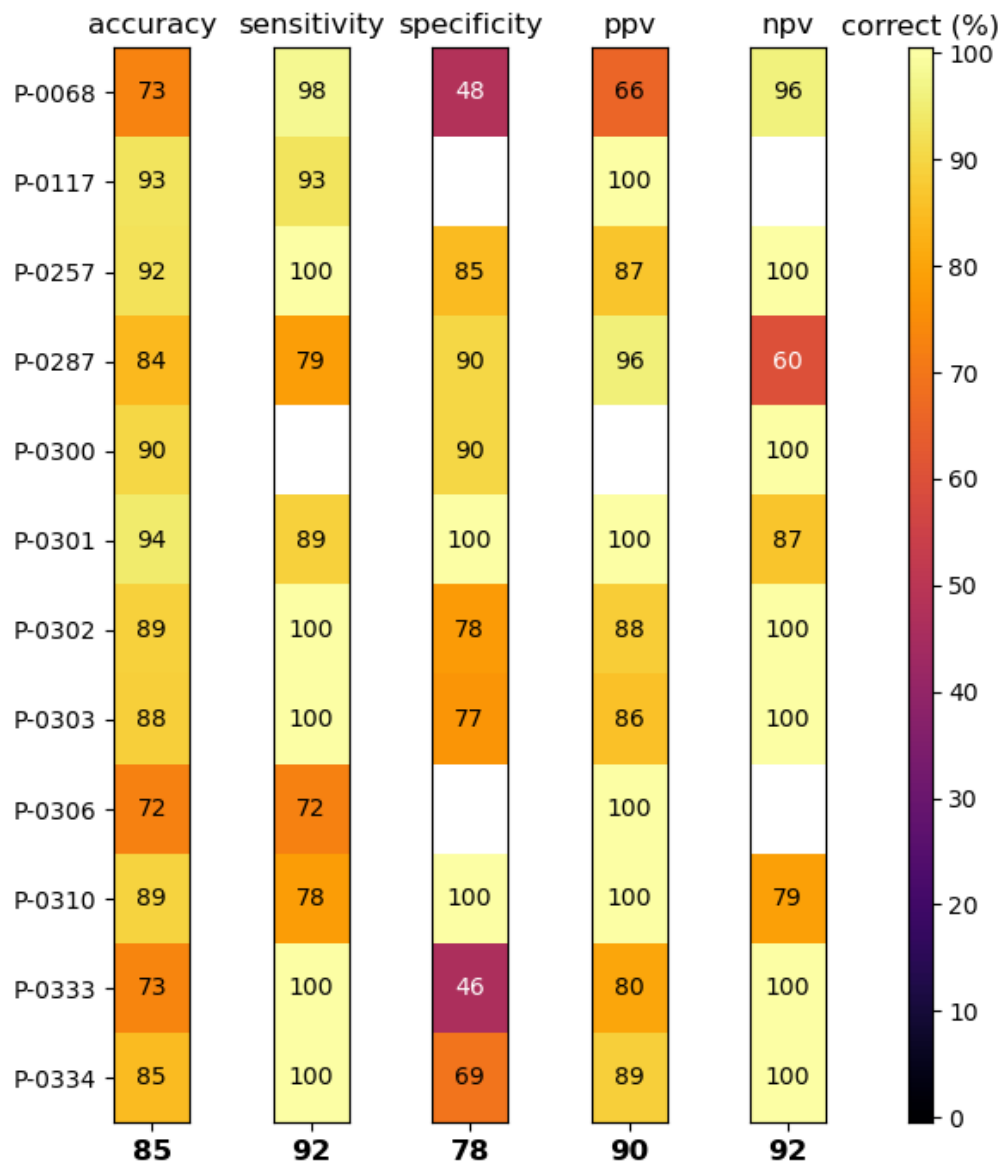


Abbildung 30: Ergebnisse der GIST-Proben im Magen mit hohen Magnesium Peaks

Die Ergebnisse werden mit Hilfe der Wahrheitsmatrix mit Sensitivität, Spezifität, Positiv prädiktivem Wert (PPV), Negativ prädiktivem Wert (NPV) und der Genauigkeit (Accuracy) der Gewebewiedererkennung als Mittelwert von Sensitivität und Spezifität dargestellt

Eine Korrelation von Sensitivität und Tumorgehalt ist bei den GIST-Proben wie bei den kolorektalen Karzinomen nicht zu erkennen (Abbildung 31). Was den Tumorgehalt betrifft, zeigen die GIST-Proben eine bimodale Verteilung. Hier müsste eine vorhandene Korrelation daher sehr gut zu erkennen sein. Diese Untersuchung bestätigt die Tatsache, dass die OES-Gewebeanalyse bei den

Gewebeproben sehr unterschiedlich gut funktioniert hat. Der Tumorgehalt scheint hier jedoch keine Rolle zu spielen.

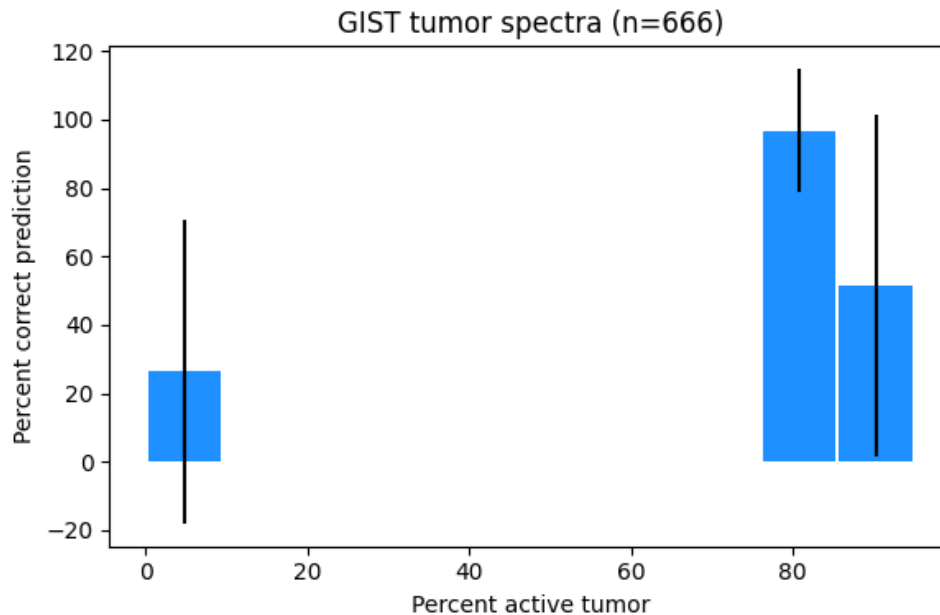


Abbildung 31: Korrelation von Tumorgehalt und Sensitivität bei GIST-Gewebeproben

Der Tumorgehalt jedes Messpunktes wurde mit der zugehörigen Sensitivität korreliert. Es konnte keine Korrelation festgestellt werden. Die Annahme, dass ein höherer Tumorgehalt mit einer besseren Sensitivität einhergeht, erwies sich als nicht zutreffend

Der Patient mit Vorbehandlung zeigt keine besonderen Auffälligkeiten in den spektralen Peaks. Auch bei den beiden nativen Geweben stechen keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den Biobank Proben heraus.

4. Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden, ob sich Gastrointestinale Tumore (Karzinome des Kolons und Rektums, Magenkarzinome sowie GIST) anhand ihres Spektrums von ihrem jeweiligen Normalgewebe als Ursprung des differenzierten Tumorgewebes unterscheiden lassen. Hierzu wurden Emissionsspektren von den genannten Tumorentitäten und auch deren Normalgewebe gemessen und die einzelnen Messpunkte mit Hilfe der histologischen Auswertung richtig eingeordnet. Mit den gewonnenen Daten wurde dann ein Klassifikator trainiert, welcher zukünftige Gewebemessungen anhand ihres Spektrums unterscheiden soll. Diese Technik beruht auf den Vorarbeiten von Spether *et. al.* zur Gewebedifferenzierung in Echtzeit [4].

Fragestellungen

1. *Wie gut korrelieren OES-Gewebespektren mit den histologischen Befunden „Normalgewebe“ und „Nicht-Normalgewebe“ für die Neoplasien Kolorektales Karzinom, Magenkarzinom und GIST im Gastrointestinaltrakt?*

Es hat sich gezeigt, dass es auch bei Gastrointestinalen Tumoren eine Korrelation zwischen OES-Gewebespektren und deren histologischen Befunden gibt, mit welcher Normalgewebe von Nicht-Normalgewebe unterschieden werden kann. Diese Korrelation war bei den einzelnen Patienten jedoch sehr unterschiedlich ausgeprägt. Somit lassen sich einige Patientenproben mit sehr hoher Übereinstimmung korrelieren, andere wiederum fast gar nicht. Diese Feststellung zeigte sich bei allen drei gemessenen Entitäten. Auf die Fragestellung nach dem Grund dieser unterschiedlichen Ausprägung wurde mit den verfügbaren Daten umfassende Recherche betrieben. Hierbei konnten für einzelne schlecht korrelierende Gewebeproben mögliche Erklärungen gefunden werden, für den Rest ließen sich jedoch nur Hypothesen aufstellen (s.u.).

2. *Lassen sich Neoplasien in verschiedenen Abschnitten des Gastrointestinaltraktes anhand bestimmter spektraler Charakteristika durch einen universellen Klassifikator beschreiben?*

Die drei untersuchten Entitäten zeigen unterschiedliche OES-Gewebespektren, was eine Beschreibung durch einen universellen Klassifikator prinzipiell ermöglicht.

Auffällig waren bei allen dreien die spektralen Peaks bei den Wellenlängen von Magnesium in neoplastischem Gewebe.

3. *Welche Schwierigkeiten und Herausforderungen bringt die OES-Analyse im Gastrointestinaltrakt mit sich?*

Eine der größten Herausforderung bei der Untersuchung von OES-Gewebespektren ist die Inhomogenität von Gewebe. In den Gewebeproben sind differente Gewebsstrukturen zu finden, die ineinander übergehen und unterschiedliche Zellverbände besitzen. Jeder Messpunkt ist somit einzigartig und abweichende Gewebespektren sind immer im Kontext der histologischen Ergebnisse zu interpretieren. Die histologische Untersuchung ist daher für jeden einzelnen Messpunkt sehr wichtig. Bei der histologischen Untersuchung wiederum lässt sich das gemessene Gewebe nur anhand der benachbarten Zellen abschätzen, da die gemessenen Zellen selbst zerstört wurden.

Eine der größten Herausforderung stellt daher die Zuordnung der gemessenen Daten mit dem tatsächlichen ursprünglichen Gewebe dar.

4.1. Gewebedifferenzierung mit spektralen Daten

Wie Eingangs schon beschrieben ist die Emissionsspektrometrie nicht die einzige Möglichkeit, Gewebe anhand ihres Spektrums zu unterscheiden. Prominenter Vertreter anderer Möglichkeiten ist die *Rapid Evaporative Ionisation Mass Spectrometry*, die auf Massenspektrometrie beruht [32]. Des Weiteren gibt es die inelastische Streuung von Licht an Molekülen (Raman-Streuung), aus der ebenfalls Spektren hervorgehen, die zur Gewebedifferenzierung herangezogen werden können [26]. Während sich der Prozess und die Technik der Datengewinnung für die jeweiligen spektroskopischen Verfahren unterscheidet,

sind diese im Endeffekt alle darauf ausgelegt, Gewebe anhand der erhaltenen Spektren voneinander zu unterscheiden. Letztendlich haben all diese Verfahren die gleiche Endstrecke, nämlich die Interpretation der erhaltenen Spektren. Die Interpretation dieser stellt eine große Herausforderung dar. Bei der Anwendung von Raman Spektroskopie kommen z.B. konventionelle Algorithmen wie die SVM an ihre Grenzen [28]. Die Masse an Daten ist enorm. Eine Möglichkeit dieser Herausforderung gerecht zu werden ist es daher, so wenig wie möglich Informationen aus den Spektren zu nutzen und trotzdem eine gute Klassifizierung durchführen zu können [42].

Ein vielversprechender Ansatz zur Interpretation von Daten stellt die Künstliche Intelligenz dar. In den letzten Jahren zeigt sich hier ein enormer Fortschritt, wodurch z.B. die genetische und molekulare Medizin durch die Bereitstellung von immer besseren *Machine Learning* Algorithmen zunehmend vorangebracht werden [43]. Diese stellen Hilfe für diagnostische und therapeutische Entscheidungen bereit und übertreffen teilweise auch die Möglichkeiten menschlicher Entscheidungen [44]. Dadurch können die Datensätze mit immer neueren Ansätzen analysiert werden. So konnten auch die Datensätze dieser Arbeit nach Vollendung mit neuen Methoden virtueller Künstlicher Intelligenz analysiert werden, die aktuell weiter erprobt werden. Dies brachte jetzt schon Verbesserungen der hier vorgestellten Ergebnisse mit sich und ist für die weitere Forschung in dieser Richtung sehr vielversprechend.

Neben dem Prozess der Datengewinnung für die Spektren unterscheiden sich auch die biologisch relevanten Teilchen oder deren Konstrukte (Elemente, Moleküle, Proteine etc.), die hinter den verschiedenen Spektren stehen (siehe Kap. 4.2.). Je nach biologischem Teilchen gibt es unterschiedliche Möglichkeiten, Spektren dieser zu erhalten. Hierdurch kommen die verschiedenen Methoden zu spektralen Gewebedifferenzierung zustande.

4.2. Datengewinnung

Die Datengewinnung bezieht sich auf das Sammeln von Spektren. Die Spektren erhält man für die OES-Analyse durch Messung einzelner Punkte auf dem Gewebe, währenddessen die Lichterscheinung aufgenommen wird (s. Kap. 2.4.).

Für die Datengewinnung ist die Reliabilität von großer Bedeutung. Sie beschreibt die Zuverlässigkeit eines wissenschaftlichen Tests und sollte stets hoch sein [45]. Optimalerweise erhält man daher von jedem Patienten die gleiche Anzahl an Spektren. Da die Gewebestücke für die Messungen nicht homogen waren, gab es Patientenproben mit sehr vielen Messpunkten und andere wiederum mit sehr wenigen. Teilweise wurden auch mehrere vereinzelte Gewebeteilchen für die Messung herangezogen. Bei Patienten mit einem nur sehr kleinen Gewebestück konnten dementsprechend auch nur sehr wenige Messpunkte gesetzt werden. Je weniger Messpunkte auf einer Patientenprobe gesetzt werden konnten, desto mehr Einfluss hatte auch jeder einzelne Messpunkt auf das Ergebnis des jeweiligen Patienten. Je mehr Messpunkte also pro Patienten aufgenommen werden, desto verlässlicher ist das Ergebnis. Möglichst viele Messpunkte und trotzdem eine gleiche Anzahl pro Patienten zu erhalten war durch die Inhomogenität der Gewebestücke, bedingt durch z.B. das Tumorstadium oder auch die Art der chirurgischen Resektion, schwer zu erreichen.

Eine weitere Problematik stellen natürliche Prozesse dar, die das Gewebe nach der Entnahme aus dem Körper verändern. Hierbei wird es nämlich von der Blutversorgung und damit Sauerstoffzufuhr abgeschnitten. Dies führt zur Nekrose des Gewebes. Die Enzyme innerhalb der Zellen bewirken eine Autolyse [37]. Eine direkte Messung der Gewebeproben nach Entnahme wäre daher anzustreben. Dies war logistisch und ohne die tägliche Routine des pathologischen Instituts zu stören nicht möglich. Die Frischgewebeproben wurden daher maximal 48 Stunden ausschließlich im Kühlschrank aufbewahrt, da niedrige Temperaturen die meisten enzymatischen Prozesse verlangsamen [46].

Ein Teil der Gewebeproben wurde aus der Biodatenbank des UKT aufgetaut und gemessen. Beim Vorgang des Einfrierens hat man in der Pathologie am UKT eine Zeit lang das Einbettmedium „TissueTek“ benutzt. Mit der Substanz sollen Schäden und Austrocknung des Gewebes bei tiefgefrorener Langzeitlagerung verhindert werden. Welche Gewebe mit TissueTek eingefroren wurden und welche nicht, konnte leider nur abgeschätzt werden, da eine Dokumentation hier nicht stattfand. Bei der Messung von Gewebe, welches mit TissueTek eingebettet wurde, waren daher verschiedene Polymere als Teil des Einbettmediums in oder an den Gewebeproben vorhanden. In einer Studie von 2019 wurde untersucht, ob ein solches Einbettmedium wie TissueTek mit nachfolgenden Analysen interferiert. So wurde zwar ein gestörtes Signal bei massenspektroskopischen Messungen festgestellt, die Anzahl an gefundenen Proteinen war aber im Vergleich zum klassischen Einbettmedium trotzdem gleich [47]. Einige angefertigte Emissionsspektren der Substanz TissueTek und der Vergleich mit Darmproben konnte ebenfalls keine Überlagerung der für die Ergebnisse wichtigen Wellenlinien feststellen. Der Vorgang des Einfrierens oder auch das Vorhandensein von TissueTek sollte die Ergebnisse daher nicht beeinflusst haben. Es wurden diesbezüglich auch keine Auffälligkeiten gefunden.

4.3. Histologische Auswertung

Die Histologie ist nach wie vor der Goldstandard für die Diagnostik vieler Krankheiten. Vor allem für das Grading, Staging und Einordnen von Tumorerkrankungen in gewisse Klassen, also auch der Gewebedifferenzierung, wird die histologische Auswertung herangezogen [48]. So nutzten auch Bergholt *et al.* [28] in ihrer Studie die histopathologischen Ergebnisse als Goldstandard. Die Ergebnisse der histologischen Auswertung der Patientenproben dieser Arbeit sind grundlegend für den Klassifikator und die Gewebedifferenzierung. Die Genauigkeit dieser Auswertung ist daher sehr wichtig, was sich während der Datensammlung zunehmend gezeigt hat. Zu Beginn der Studie wurde das gemessene Gewebe zunächst nur makroskopisch in Tumor- und Normalgewebe eingeteilt. Im Verlauf wurde die Genauigkeit der Auswertung dann stetig

angepasst. Die ersten Proben, die nur makroskopischer beurteilt wurden, wurden nicht erneut genauer untersucht.

Das Normalgewebe wurde anfangs makroskopisch beurteilt und im Verlauf auch histologisch untersucht. Ein genaues Aufsuchen der einzelnen Messpunkte fand nicht statt. Die Beurteilung beschränkte sich hier auf die Frage nach etwaigem vorkommendem Tumorgewebe. Die Messpunkte wurden größtenteils in der Schleimhaut gesetzt. Diese ist häufig sehr dünn und die Gewebeproben beinhalten neben der Schleimhaut auch beispielsweise Fettgewebe, Bindegewebe, Muskel, etc. Eine genauere Untersuchung wäre hier von Vorteil gewesen. Die Ergebnisse des Klassifikators zur Gewebedifferenzierung zielen also auf den Unterschied von Tumorzellen zu generell gesundem Normalgewebe ab. Im Gegensatz hierzu war die Untersuchung von Nierengewebe in der Studie von Spether *et al.* [4] von Vorteil, da das Nierengewebe an sich sehr homogen ist und die einheitliche Definition von Normalgewebe so genauer ist.

Auch Tumorgewebe wurde histologisch genau untersucht. Um ein verlässliches Ergebnis zu erhalten, muss jeder einzelne Messpunkt identifiziert und ausgewertet werden. Leider war es nicht möglich, im Verlauf schon gemessene Patientenproben im Nachhinein auf jeden einzelnen Messpunkt hin zu untersuchen. Daher sind die ersten Patientenproben zum Teil etwas gröber anhand der kompletten Gewebeprobe beurteilt, die meisten anderen aber sehr genau anhand jedes einzelnen Messpunktes, der gefunden wurde.

Für eine optimale Vergleichbarkeit der Patientenproben hätten diese allesamt, also Tumor- als auch Normalgewebe, nach exakt dem gleichen Schema ausgewertet werden sollen. Die Unterschiede in der histologischen Untersuchung wurden bei der Überprüfung der Ergebnisse berücksichtigt (siehe Kap. 3)

4.4. Verwendete Features

Die Features sind Integrale unter charakteristischen Peaks in den Emissionsspektren, die eine auffällige Abweichung zwischen Normal- und

Tumorgewebe gezeigt haben. Anhand dieser Features lassen sich die Gewebearten in der vorgestellten Arbeit differenzieren. Hinter jedem Peak einer Emissionslinie steht eine bestimmte Wellenlänge der Photonen, die sich einem bestimmten Mengenelement, Spurenelement oder Molekül zuordnen lassen [4]. So waren in dieser Arbeit vor allem Abweichungen des Mengenelements Magnesium mit seinen Wellenlängen häufig vorhanden. Bei der Anwendung anderer Technologien zur intraoperativen Gewebedifferenzierung werden ebenfalls Unterschiede in der Zusammensetzung des Gewebes gemessen. Hierbei wurde bisher Magnesium nicht erwähnt. Bei Anwendung des iKnife unter Verwendung von REIMS [32] spielen vor allem das Verteilungsmuster der Phosphoglyceride bei der Gewebedifferenzierung eine Rolle, da diese sich innerhalb der verschiedenen Gewebearten deutlich unterscheiden [30]. Die Zusammensetzung von Phosphoglyceriden erlaubt eine Zuordnung zu bestimmten Gewebetypen [49]. So konnten Kirill *et al.* Tumorgewebe, gesunde Schleimhaut, glatte Muskulatur und kleine Gefäße mit einer Genauigkeit von über 98% voneinander unterscheiden [42]. Bei einer anderen Technik wiederum, der Raman Spektroskopie, erfolgt die Gewebedifferenzierung mit Hilfe von Raman Peak Intensitäten. Mit diesen kann auf mehr oder auch weniger Vorhandensein von Gewebearten wie z.B. Kollagen geschlossen werden. Wie eingangs schon erwähnt konnte mit dieser Technik bei benignen Ulcera im Magen mehr Kollagengewebe und Aktinfilamente im Gegensatz zu normaler Magen Mukosa gefunden werden [28].

Die Konzentration an Mengenelementen wie Magnesium, aber auch andere Spurenelemente, scheinen für die Ergebnisse der Analyse von Emissionsspektren im Gastrointestinaltrakt ausschlaggebend zu sein. Es gibt einige andere Arbeiten, die Gewebezusammensetzungen von Normal- und Tumorgewebe auf elementarer Ebene untersucht haben. Dabei wird die Bedeutung von Magnesium bei Tumoren kontrovers diskutiert. Einige Studien haben gezeigt, dass sich Magnesium in Tumorzellen anreichert [17, 50]. So haben wohl Tumorzellen mit erhöhtem intrazellulärem Magnesiumlevel einen metabolischen Vorteil, wohingegen ein genereller Magnesiummangel im Plasma ein Risikofaktor für die Entstehung bestimmter Tumorarten darzustellen scheint

[51]. Der Gehalt an Magnesium im Serum ist bei Erkrankungen mit soliden Tumoren oft erniedrigt, während er in Tumorgewebe als auch in Erythrozyten erhöht ist. Darüber hinaus korreliert diese Annahme mit der Ausprägung der Tumorerkrankung [52]. Auch Pasha *et al.* konnten in ihrer Studie zu Spurenelementen im Plasma bei Tumorpatienten erniedrigte Magnesiumlevel im Serum der Patienten beobachten. Generell konnte in der Studie gezeigt werden, dass Tumorerkrankungen einen Einfluss auf die Verteilung und Konzentration von Spurenelementen im Plasma haben [53]. Dies lässt auf einen Einfluss von Tumorerkrankungen auf den Magnesiumhaushalt schließen. Tumorzellen scheinen dabei Magnesium anzureichern, was sich auch in den Ergebnissen dieser Arbeit zeigt.

Das Verständnis von essenziellen Mengenelementen wie Magnesium hat sich in den letzten Jahrzehnten grundlegend verbessert. Magnesium als das zweithäufigste Kation innerhalb einer Zelle ist an zahlreichen physiologischen zellulären und enzymatischen Funktionen im Körper beteiligt. Hierunter fallen z.B. metabolische Kreisläufe, Signalkaskaden und Ionen-Kanal-Funktionen [54]. Bei der Energiebereitstellung der Zelle ist Magnesium mit der Hydrolyse von Adenosintriphosphat (ATP) zu Adenosindiphosphat (ADP) unabdingbar [55]. ATP spielt bei der Karzinogenese eine entscheidende Rolle und ist bei der Konfiguration der Tumormikroumgebung, die das Tumorstadium beeinflusst, maßgeblich beteiligt. Hohe Magnesiumlevel könnten also auf einen erhöhten ATP-Umsatz deuten, welcher bei der Karzinogenese benötigt wird [56]. Auch bei der genomischen Stabilität hat Magnesium einen großen Einfluss. Es ist bei der Replikation der Desoxyribonukleinsäure (DNA) und Proteinsynthese beteiligt, spielt als Cofaktor bei der DNA-Reparatur eine Rolle und hat einen Effekt auf Zellzyklus und Apoptose [57]. In einer Studie von 2005 ging eine erhöhte Aufnahme von Magnesium mit einem geringeren Risiko für kolorektale Karzinome einher [58], was die protektiven Funktionen von Magnesium vor der Karzinogenese stützt. So könnte Magnesium die Karzinogenese einerseits durch oxidativen Stress fördern, da dieser durch Modifizierungen der DNA dort Mutationen auslösen kann. Andererseits könnte die Karzinogenese durch DNA-

Reparatur Mechanismen auch gehemmt werden, da diese die genomische Stabilität fördern [59].

Wie schon erwähnt ist Magnesium nicht das einzige Mengenelement, dass in der Analyse als Feature dient. Neben Magnesium zeigen sich vor allem auch die Wellenlängen von Calcium und dem Spurenelement Zink. Aber auch Natrium, eine Cyanidgruppen-Bande (CN) und eine Hydroxylgruppen-Bande (OH) sind zu finden. Studien zeigten bereits, dass der Magnesiumhaushalt in neoplastischen Zellen verändert ist. Neoplastische Zellen scheinen eine hohe Affinität für Magnesium zu haben und dieses anzureichern [51]. Dies könnte an einer Überexpression des *Transient Receptor Potential Cation Channel M7 (TRPM7)* liegen [50, 51]. TRPM7 ist ein Ionen-Kanal, der eine zentrale Rolle im Magnesiumhaushalt und der Magnesiumaufnahme hat [60, 61]. Neben Magnesium ist TRPM7 aber auch für Calcium und Zink durchlässig. TRPM7 nimmt daher eine wichtige Rolle in der Regulation der zweiwertigen Kationen Magnesium, Zink und Calcium ein [62]. Die gefundenen Features in dieser Arbeit als Peaks bei den Wellenlängen von Magnesium, Zink und Calcium sprechen für eine höhere Konzentration dieser drei Mengen- und Spurenelemente im Tumorgewebe im Vergleich zu dessen Normalgewebe. Diese Tatsache würde sich mit den zuvor genannten Studienergebnissen einer Überexpression des Ionen-Kanals TRPM7 und den damit einhergehenden höheren Konzentrationen der drei Kationen decken und diese bestätigen.

4.5. Gewebe- und Organspezifische Eigenschaften

Mit einer Sensitivität von 74,4% und einer Spezifität von 77,7% ist eine Tendenz zu erkennen, dass sich die Kolorektalen Karzinome mittels Emissionsspektroskopie unterscheiden lassen. Auch die Magenkarzinome und GIST zeigen diese Tendenz. Im Vergleich zu der Arbeit von Spether *et al.* bei Nierenkarzinomen, bei der eine Sensitivität von 96% und eine Spezifität von 93% erreicht wurde [4], liegen die Ergebnisse dieser Arbeit jedoch zurück. Dies könnte auf die Emissionslinie und das Vorhandensein von Cadmium in Nierengewebe zurückzuführen sein, welches in dortigem Tumorgewebe kaum vorhanden ist

[35]. Die niedrige Cadmiumkonzentration in renalen Tumorzellen könnte durch die Verdünnung durch die sich schnell teilenden Tumorzellen zustande kommen [63]. Ein Merkmal, dass sich stark hervorhebt, dient dem Klassifikator als starkes Feature. Cadmium könnte daher als starkes Feature einen großen Beitrag zu den guten Studienergebnissen in der genannten Arbeit geleistet haben.

So konnten bei den gastrointestinalen Tumoren im Mittel zwar auch Unterschiede zwischen verschiedenen Spuren – und Mengenelementen festgestellt werden, diese waren jedoch nicht sehr stark ausgeprägt und bei manchen Patienten kaum oder gar nicht vorhanden. Die Gewebedifferenzierung beruht in dieser Arbeit eher auf der Kombination verschiedener Features, die für sich allein keine starke Gewichtung haben.

Wenn solide Tumore zu schnell wachsen, kann es zu Tumornekrosen kommen. Diese entstehen durch einen chronisch ischämischen Schaden, da die vaskuläre Versorgung mit dem Tumorwachstum nicht mithalten kann [64, 65]. Bei einer Nekrose kommt es zur Proteindenaturierung und Zellkernveränderungen [37]. Die Gewebezusammensetzung von Tumorzellen und Tumornekrose könnte sich daher erheblich unterscheiden. Bei der Auswertung der Spektren wurden Messpunkte mit viel Tumornekrose daher nicht berücksichtigt. Da jedoch manche Tumorgewebeproben nicht pro Messpunkt ausgewertet wurden, kann hier auch eine Ursache für eine schlechte Gewebedifferenzierung liegen. Einige dieser Tumorproben, die keine gute Sensitivität hatten, wiesen makroskopisch in der Tat größere Nekrose Areale auf.

4.5.1. Kolonkarzinome

Die heterogen verteilte Sensitivität bei der Analyse der Kolorektalen Karzinome spricht dafür, dass es kein eindeutiges Feature für die Gewebewiedererkennung gibt. Vielmehr wurden bei der Analyse acht verschiedene Peaks verwendet, deren Kombination letztendlich zu den Ergebnissen führt. Trotzdem bleibt der erhöhte Magnesiumgehalt im gemessenen Tumorgewebe das wichtigste Feature. Eine Erhöhung der intrazellulären Magnesiumkonzentration in neoplastischen Zellen wurde in anderen Studien mehrfach bestätigt [17, 50, 51].

Obwohl für einzelne Patienten ein möglicher Grund für niedrige Gewebewiedererkennungswerte gefunden wurde, bleiben einige Ergebnisse trotz umfangreicher Recherche auch ohne Erklärung.

4.5.2. Magenkarzinome

Magenkarzinome werden vor der chirurgischen Entfernung häufig chemotherapeutisch vorbehandelt [41]. Durch diese neoadjuvante Behandlung der Magenkarzinome sind die Gewebeproben sehr inhomogen. Manche bestehen nur noch aus Tumornarbe ohne wirklichen Nachweis von Tumorzellen, bei anderen wiederum hat die neoadjuvante Therapie nicht angeschlagen. Für die erste Klassifikation dieser Karzinome mittels OES ist dies eine sehr anspruchsvolle Voraussetzung, da in der histologischen Untersuchung kaum gleichartige und somit gut vergleichbare Gewebeproben gefunden wurden.

4.5.3. GIST

Histopathologisch zeigen sich GIST meist als scharf abgegrenzte Tumore im Gastrointestinaltrakt [66]. Bei der histopathologischen Untersuchung lassen sich GIST deswegen meist eindeutig von Normalgewebe abgrenzen und sie zeigen oft einen hohen Tumorzellgehalt. Die Bedingungen erscheinen für die OES-Analyse daher sehr gut. Da GIST zu den mesenchymalen Tumoren zählen, kommen sie auch im ganzen Gastrointestinaltrakt vor [67]. Folglich ist das gesammelte Normalgewebe auch aus unterschiedlichen Organen. Somit lassen sich bei der OES-Analyse die Tumorgewebeproben miteinander vergleichen, ein Vergleich aller Normalgewebeproben ergibt jedoch wenig Sinn und erklärt auch die relativ niedrige Spezifität von 73% bei der Analyse der GIST, die z.B. bei der separaten Analyse nur der Magenproben auf 86% steigt. Trotz der vermeintlich guten Bedingungen für die Analyse der GIST-Spektren zeigte sich im Ergebnis eine starke bimodale Verteilung. Einige GIST-Analysen fielen sehr schlecht aus. Auffällig ist hierbei, dass 7 von insgesamt 8 GIST mit Ursprung im Dünndarm zu dieser Gruppe mit schlechtem Ergebnis (Sensitivität <34%) gehören, trotz eindeutiger histologischer Zuordnung und hohem Tumorgehalt. Recherchen zu einem Grund dieses Ergebnisses führten zu der Überlegung, dass

Dünndarmzellen maßgeblich an der Magnesiumresorption beteiligt sind. Der größte Anteil an aufgenommenem Magnesium wird im distalen Dünndarm resorbiert [68]. In einer Studie von 2015 wurde festgestellt, dass der Ionen-Kanal TRPM6, der mit dem schon genannten TRPM7 hauptsächlich für die Magnesiumaufnahme verantwortlich ist, vor allem im distalen Dünndarm exprimiert wird [69]. Womöglich geht die physiologische Funktion der Dünndarmzellen mit einer intrazellulären Magnesiumkonzentration einher, die die OES-Analyse erschwert. Dies bleibt jedoch zunächst eine Vermutung und muss für genauere Aussagen weiter untersucht werden.

4.6. Kritische Auseinandersetzung zur Vorarbeit

Spether *et al.* leisteten mit der Veröffentlichung ihrer OES-Analyse an humanem Gewebe einen entscheidenden Beitrag für die Anwendung von Emissionsspektroskopie in der Medizin. Nach den sehr guten ersten Ergebnissen des OES-Systems wurde dieses in der vorliegenden Arbeit in anderen Organsystemen mit einer weitaus größeren Anzahl an Messungen erforscht. Die ersten Ergebnisse von Spether *et al.* setzen sich zusammen aus 11 Patienten mit insgesamt 229 gemessenen OES-Spektren, beschränkt auf die Niere. Unsere Arbeit umfasst Gewebe von 97 Patienten mit insgesamt 4455 Spektren von Tumor- und Normalgewebe aus verschiedenen Organen und deren häufigsten malignen Tumoren aus dem Gastrointestinaltrakt. Unsere Resultate kamen dabei an die erreichten Sensitivitäts- und Spezifitätswerte der Vorarbeit nicht heran. Neben dem Resultat der Sensitivitäts- und Spezifitätswerte konnten aber auch andere Erkenntnisse gewonnen werden (s.o.)

Spether *et al.* entschieden sich für die Untersuchung von Tumoren im Nierengewebe, da sich diese makroskopisch relativ eindeutig vom Normalgewebe unterscheiden lassen. Dies ist auf die Homogenität des Gewebes und klare Tumorgrenzen bei Nierentumoren zurückzuführen. Kolonkarzinome und Magenkarzinome entstehen aus Epithelzellen, welche sich in der Schleimhautschicht des Gastrointestinaltraktes befinden. Da diese sehr dünn ist, betrifft eine maligne Entartung sehr schnell andere Gewebeschichten. Bei den

GIST verhält sich diese Tatsache ähnlich, diese bringen jedoch noch ein zusätzliches Problem mit sich. Sie können im gesamten Gastrointestinaltrakt aus dem Bindegewebe hervorgehen und daher ubiquitär auftreten, wo es Bindegewebe gibt. So ergibt sich bei jedem GIST eine spezifische Gewebekonstellationen in der Umgebung. Dasselbe gilt beim Normalgewebe der untersuchten Tumoren. Ein Messpunkt zum Beispiel auf der Schleimhaut von Dickdarm misst nicht nur Epithelzellen, sondern umfasst immer auch andere, dahinter liegende Gewebeschichten, sodass Normalgewebe eine Mischung aus Gewebe bis hin zur kompletten Darmwand beinhalten kann.

Durch den engen Kontakt zum Nahrungsbrei sind Magen und Kolon möglicherweise einer zusätzlichen Variablen ausgesetzt. Nahrungsbestandteile, die nach der Verdauung durch die Zellen aufgenommen werden, könnten ebenfalls einen Einfluss auf die Messergebnisse haben.

Wir gehen davon aus, dass die Inhomogenität des Gewebes ein entscheidender Faktor für die niedrigeren Sensitivitäts- und Spezifitätswerte ist.

4.7. Anwendungsgebiete

Neben der makroskopischen Tumorausbreitung gibt es auch oft eine mikroskopische Ausbreitung, die mit dem bloßen Auge nicht zu sehen ist. Zur Identifizierung dieser Ausbreitung werden Schnellschnittuntersuchungen angewendet [70, 71]. Wie schon erwähnt kosten diese Zeit und damit Ressourcen. In Zeiten, in denen in einem Operationssaal die Produktivität und der Umsatz an hoher Stelle stehen, ist die Gefahr groß, dass die Qualität der Untersuchung darunter leidet [3]. Eine intraoperative Gewebedifferenzierung in Echtzeit wäre daher ein enormer Fortschritt in der onkologisch-chirurgischen Behandlung. Das OES-System erfüllt diese Kriterien, indem es die Gewebeanalyse in 0,05 Sekunden durchführt. Diese Echtzeitmessung erlaubt es z.B., dem Chirurgen Informationen über das aktuell geschnittene Gewebe zu geben und ihn ggf. zu warnen, sollte er z.B. ungewollt in Tumorgewebe schneiden [4]. Bei der Anwendung von Raman Spektroskopie in der Endoskopie konnten schon Analysezeiten von 0,5 Sekunden erreicht werden [28]. Im

Gegensatz hierzu hat das iKnife eine Analysezeit von 0,7-2,5 Sekunden, was keiner Echtzeitanalyse entspricht [30]. Im Vergleich zum Goldstandard der histopathologischen Schnellschnittuntersuchung (20-30 Minuten) unterbieten die genannten Verfahren diese jedoch zeitlich gesehen enorm.

Neben der Anforderung einer verlässlichen und guten Gewebedifferenzierung sollte eine Technologie wie die hier angewendete im klinischen Alltag auch praktikabel und finanzierbar sein. Durch technischen Fortschritt und zunehmendes Wissen kommen immer neuere und gegebenenfalls auch bessere Interventionsmöglichkeiten, Medikamente und Techniken auf den Markt. Diese gehen oft mit hohen Kosten einher, wodurch Gesundheitssysteme unter Druck geraten [72]. Dies schürt immer häufiger Bedenken, was die finanzielle Tragbarkeit einiger dieser Fortschritte angeht. Neue Methoden sollten daher immer auch im Kontext von Kosten- und Effektanalysen betrachtet werden [73]. Das beinhaltet auch die Größe, Wartung und Bedienung eines solchen Gerätes, da es z.B. im Operationssaal untergebracht werden muss und ggf. ein zusätzlicher Mitarbeiter benötigt wird. Während z.B. das Massenspektrometer, welches für das iKnife verwendet wird, eine große zusätzliche Maschine darstellt, lässt sich das in dieser Arbeit verwendete OES-System problemlos in schon lange in Anwendung befindliche elektrochirurgische Einheiten (s. Abb. 3) integrieren. Dies hält einerseits die Kosten minimal und bringt andererseits viel Potential für die Umsetzbarkeit in der klinische Praxis mit sich [4].

Neben der Anwendung im Operationssaal könnte das OES-System aber auch in der Endoskopie eingesetzt werden. Bei der endoskopischen Diagnostik und Vorsorge Kolorektaler Karzinome könnten z.B. direkt beim Abtragen von Polypen Informationen zu diesen in Echtzeit gegeben werden. Kolorektale Karzinome entstehen meist über einen längeren Zeitraum aus Darmpolypen, die sich stufenweise verändern. Dies geschieht durch aufeinanderfolgende genetische und epigenetische DNA Mutationen [74]. Inwiefern diese stufenweise Zellveränderung mit der OES-Analyse erfasst werden könnte, bedarf weiterer Studien. Das Massenspektroskopische Verfahren iKnife wird aktuell für die Verwendung in der endoskopischen Vorsorge für kolorektale Karzinome getestet.

Die ersten Ergebnisse sprechen für einen positiven Effekt durch die Kombination des iKnife mit endoskopischen - oder bildgebenden Verfahren zur Vorsorge von kolorektalen Karzinomen [75].

Mit vielversprechenden Anwendungsmöglichkeiten, der Integrationsmöglichkeit in schon im medizinischen Einsatz befindlichen technischen Geräten und einem tragbaren Kosten-Effekt-Verhältnis ist das OES-Verfahren ein spannender Ansatz im Bereich zukünftiger Möglichkeiten zur Gewebedifferenzierung. Das Verfahren sollte dabei auch an anderen Organsystemen untersucht werden. Für den klinischen Einsatz im Gastrointestinaltrakt sind weitere Studien notwendig, um die Genauigkeit der Gewebedifferenzierung zu verbessern.

5. Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Studie wurde untersucht, ob sich OES-Gewebespektren mit den histologischen Befunden „Normalgewebe“ und „Tumorgewebe“ für die Neoplasien Kolorektales Karzinom, Magenkarzinom und Gastrointestinale Stromatumore korrelieren lassen. Zu diesem Zweck wurden von insgesamt 97 Patienten Gewebeproben der genannten Tumorentitäten und deren Normalgewebe gesammelt. In der Summe wurden 2036 Messpunkte von Normalgewebe und 2419 Messpunkte von Tumorgewebe und somit insgesamt 4455 OES-Gewebespektren gemessen. Danach wurden die Proben histopathologisch untersucht und deren Gewebe definiert. Durch Unterschiede in den Spektren zwischen Normal- und Tumorgewebe und der Ergebnisse der histopathologischen Untersuchung ließ sich mit Hilfe einer SVM ein Algorithmus zur Gewebewiedererkennung erstellen. Es hat sich gezeigt, dass mit diesem Algorithmus Normal- als auch Tumorgewebe anhand ihrer OES-Spektren voneinander unterschieden werden können. Die Genauigkeit einer solchen Unterscheidung war jedoch zwischen den einzelnen Patienten sehr unterschiedlich. So hat die Unterscheidung bei einigen Patienten sehr gut funktioniert, bei einigen war sie allerdings kaum möglich. Durch umfassende Recherche der verfügbaren Daten konnten für diese Tatsache nur bei einzelnen Patienten mögliche Gründe für eine schlechte Gewebewiedererkennung gefunden werden. Bei einigen bleibt der Unterschied in der Genauigkeit dieser Gewebewiedererkennung zunächst unklar. Die Inhomogenität des Gewebes macht jeden Messpunkt einzigartig, was eine Herausforderung an eine solche Analyse darstellt. Im Verlauf der Datensammlung hat sich gezeigt, dass eine genaue histologische Untersuchung jedes einzelnen Messpunktes enorm wichtig ist. Das Problem jedoch ist, dass diese Untersuchung nur in der unmittelbaren Umgebung des Messpunktes stattfinden kann, da das gemessene Gewebe selbst bei der Messung zerstört wird.

Die Unterscheidung der Gewebe wurde anhand von Features durchgeführt. Diese sind definiert als Integrale unter den Peaks bestimmter Photonen-Wellenlängen, welche bei Normal- und Tumorgewebe Unterschiede aufwiesen.

Hinter den Wellenlängen stehen bestimmte Mengenelemente und Molekülbanden, die im Gewebe folglich vermehrt oder vermindert vorkommen. Eine Kombination dieser Features gibt jedem Gewebe einen spezifischen „Fingerabdruck“. Vor allem das Mengenelement Magnesium mit seinen unterschiedlichen Wellenlängen wurde bei allen drei Tumorentitäten mit erhöhten Peaks, also auch erhöhter Konzentration im Gewebe, gefunden. Die untersuchten Tumorentitäten scheinen also Magnesium anzureichern.

Anwendung finden könnte die OES-Gewebeanalyse im Bereich der onkologisch-chirurgischen Therapie. Eine Gewebeanalyse in Echtzeit kann dem Chirurgen helfen, Resektionsgrenzen besser zu beurteilen und bietet großes Potential bei der Zeitersparnis im Operationssaal und beim Behandlungserfolg für den Patienten. Auch eine Anwendung in der endoskopischen Vorsorge oder zur Unterstützung von Gewebeanalysen in pathologischen Instituten ist denkbar. Zwar konnte anhand der Ergebnisse dieser Studie gezeigt werden, dass sich die untersuchten gastrointestinalen Tumore anhand ihres OES-Gewebespektrums voneinander unterscheiden lassen, für einen klinischen Einsatz ist die durchschnittliche Genauigkeit der Gewebewiedererkennung aber zu niedrig und muss verbessert werden. Vor allem neue Ansätze im Bereich der Datenverarbeitung durch künstliche Intelligenz versprechen hier heute schon bessere Ergebnisse im Bereich der Genauigkeit der Gewebewiedererkennung. Insofern sollte die OES-Gewebeanalyse, nicht nur im Gastrointestinaltrakt, sondern auch in anderen Gewebe- und Organsystemen weiter erforscht und vorangebracht werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Barnes, B., et al., *Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016*. 2016, Robert Koch-Institut.
2. Laakman, J.M., et al., *Frozen Section Quality Assurance*. Am J Clin Pathol, 2021. **156**(3): p. 461-470.
3. Nakhleh, R.E., *What is quality in surgical pathology?* J Clin Pathol, 2006. **59**(7): p. 669-72.
4. Spether, D., et al., *Real-time tissue differentiation based on optical emission spectroscopy for guided electrosurgical tumor resection*. Biomed Opt Express, 2015. **6**(4): p. 1419-28.
5. Robert Koch Institut, Z.f.K., *Krebs in Deutschland für 2017/2018*. Robert Koch Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2021.
6. El-Menyar, A., A. Mekkodathil, and H. Al-Thani, *Diagnosis and management of gastrointestinal stromal tumors: An up-to-date literature review*. J Cancer Res Ther, 2017. **13**(6): p. 889-900.
7. Schmiegell, W., et al., *S-3 Leitlinie - Kolorektales Karzinom*. Z Gastroenterol, 2017. **55**(12): p. 1344-1498.
8. Cho, W.Y., J.Y. Jang, and D.H. Lee, *Recent Advances in Image-enhanced Endoscopy*. Clin Endosc, 2011. **44**(2): p. 65-75.
9. Kim, W.J., et al., *Increased Detection of Colorectal Polyps in Screening Colonoscopy Using High Definition i-SCAN Compared with Standard White Light*. Clin Endosc, 2016. **49**(1): p. 69-75.
10. Guo, C.G., R. Ji, and Y.Q. Li, *Accuracy of i-Scan for Optical Diagnosis of Colonic Polyps: A Meta-Analysis*. PLoS One, 2015. **10**(5): p. e0126237.
11. Repici, A., et al., *Efficacy of Real-Time Computer-Aided Detection of Colorectal Neoplasia in a Randomized Trial*. Gastroenterology, 2020. **159**(2): p. 512-520.e7.
12. Kudo, S.E., et al., *Artificial Intelligence-assisted System Improves Endoscopic Identification of Colorectal Neoplasms*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2020. **18**(8): p. 1874-1881.e2.

13. Cushing, H., *Macewen Memorial Lecture ON THE MENINGIOMAS ARISING FROM THE OLFACTORY GROOVE AND THEIR REMOVAL BY THE AID OF ELECTRO-SURGERY*. The Lancet, 1927. **209**(5417): p. 1329-1339.
14. Massarweh, N.N., N. Cosgriff, and D.P. Slakey, *Electrosurgery: history, principles, and current and future uses*. J Am Coll Surg, 2006. **202**(3): p. 520-30.
15. Taheri, A., et al., *Electrosurgery: part I. Basics and principles*. J Am Acad Dermatol, 2014. **70**(4): p. 591.e1-591.e14.
16. Jones, C.M., et al., *Electrosurgery*. Curr Surg, 2006. **63**(6): p. 458-63.
17. Nawi, A.M., et al., *Tissue and Serum Trace Elements Concentration among Colorectal Patients: A Systematic Review of Case-Control Studies*. Iran J Public Health, 2019. **48**(4): p. 632-643.
18. Juloski, J.T., et al., *Colorectal cancer and trace elements alteration*. J Trace Elem Med Biol, 2020. **59**: p. 126451.
19. Al-Ebraheem, A., M.J. Farquharson, and E. Ryan, *The evaluation of biologically important trace metals in liver, kidney and breast tissue*. Appl Radiat Isot, 2009. **67**(3): p. 470-4.
20. Mesa, K.J., et al., *Intraoperative optical coherence tomography for soft tissue sarcoma differentiation and margin identification*. Lasers Surg Med, 2017. **49**(3): p. 240-248.
21. Golman, K., et al., *Metabolic imaging by hyperpolarized ¹³C magnetic resonance imaging for in vivo tumor diagnosis*. Cancer Res, 2006. **66**(22): p. 10855-60.
22. Müller-Schimpfle, M., et al., *Recurrent rectal cancer: diagnosis with dynamic MR imaging*. Radiology, 1993. **189**(3): p. 881-9.
23. Kishimoto, H., et al., *In vivo internal tumor illumination by telomerase-dependent adenoviral GFP for precise surgical navigation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(34): p. 14514-7.
24. Vo-Dinh, T., et al., *In vivo cancer diagnosis of the esophagus using differential normalized fluorescence (DNF) indices*. Lasers Surg Med, 1995. **16**(1): p. 41-7.

25. Kim, H.H., *Endoscopic Raman Spectroscopy for Molecular Fingerprinting of Gastric Cancer: Principle to Implementation*. Biomed Res Int, 2015. **2015**: p. 670121.
26. Hanlon, E.B., et al., *Prospects for in vivo Raman spectroscopy*. Phys Med Biol, 2000. **45**(2): p. R1-59.
27. Teh, S.K., et al., *Near-infrared Raman spectroscopy for early diagnosis and typing of adenocarcinoma in the stomach*. Br J Surg, 2010. **97**(4): p. 550-7.
28. Bergholt, M.S., et al., *Raman endoscopy for in vivo differentiation between benign and malignant ulcers in the stomach*. Analyst, 2010. **135**(12): p. 3162-8.
29. Fatou, B., et al., *In vivo Real-Time Mass Spectrometry for Guided Surgery Application*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 25919.
30. Balog, J., et al., *Intraoperative tissue identification using rapid evaporative ionization mass spectrometry*. Sci Transl Med, 2013. **5**(194): p. 194ra93.
31. Schäfer, K.C., et al., *In vivo, in situ tissue analysis using rapid evaporative ionization mass spectrometry*. Angew Chem Int Ed Engl, 2009. **48**(44): p. 8240-2.
32. Balog, J., et al., *Identification of biological tissues by rapid evaporative ionization mass spectrometry*. Anal Chem, 2010. **82**(17): p. 7343-50.
33. Mason, S., et al., *Mass spectrometry transanal minimally invasive surgery (MS-TAMIS) to promote organ preservation in rectal cancer*. Surg Endosc, 2020. **34**(8): p. 3618-3625.
34. Joosten, G.u.F., *Atom-Emissions-Spektrometrie*. De Gruyter, 2018.
35. Bürger, I., et al., *Tissue differentiation by means of high resolution optical emission spectroscopy during electrosurgical intervention*. Journal of Physics D Applied Physics, 2017. **50**: p. 035401.
36. Hummel, M. and C. Specht, *Biobanks for future medicine*. Journal of Laboratory Medicine, 2019. **43**(6): p. 383-388.
37. Lang, G., *Histotechnik*, SpringerWienNewYork, Editor. 2013.
38. Eilers, P. and H. Boelens, *Baseline Correction with Asymmetric Least Squares Smoothing*. Unpubl. Manuscr, 2005.

39. Noble, W.S., *What is a support vector machine?* Nature Biotechnology, 2006. **24**(12): p. 1565-1567.
40. Huang, S., et al., *Applications of Support Vector Machine (SVM) Learning in Cancer Genomics*. Cancer Genomics Proteomics, 2018. **15**(1): p. 41-51.
41. Levenson, G., et al., *Tumor downstaging after neoadjuvant chemotherapy determines survival after surgery for gastric adenocarcinoma*. Surgery, 2021. **170**(6): p. 1711-1717.
42. Veselkov, K.A., et al., *Chemo-informatic strategy for imaging mass spectrometry-based hyperspectral profiling of lipid signatures in colorectal cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(3): p. 1216-21.
43. Gore, J.C., *Artificial intelligence in medical imaging*. Magn Reson Imaging, 2020. **68**: p. A1-a4.
44. Cinteza, M., *Medicine with Intelligence. Be It an Artificial One*. Maedica (Bucur), 2022. **17**(2): p. 251-252.
45. Ahmed, I. and S. Ishtiaq, *Reliability and validity: Importance in Medical Research*. J Pak Med Assoc, 2021. **71**(10): p. 2401-2406.
46. Marshall, C.J., *Cold-adapted enzymes*. Trends Biotechnol, 1997. **15**(9): p. 359-64.
47. Snijders, M.L.H., et al., *Cryo-Gel embedding compound for renal biopsy biobanking*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 15250.
48. Chapman, J.A., L.M.J. Lee, and N.T. Swailes, *From Scope to Screen: The Evolution of Histology Education*. Adv Exp Med Biol, 2020. **1260**: p. 75-107.
49. Hicks, A.M., et al., *Unique molecular signatures of glycerophospholipid species in different rat tissues analyzed by tandem mass spectrometry*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1761**(9): p. 1022-9.
50. Blaszczyk, U. and A. Duda-Chodak, *Magnesium: its role in nutrition and carcinogenesis*. Rocznik Panstw Zakl Hig, 2013. **64**(3): p. 165-71.
51. Castiglioni, S. and J.A. Maier, *Magnesium and cancer: a dangerous liason*. Magnes Res, 2011. **24**(3): p. S92-100.

52. Sartori, S., et al., *Serum and erythrocyte magnesium concentrations in solid tumours: relationship with stage of malignancy*. Magnes Res, 1992. **5**(3): p. 189-92.
53. Pasha, Q., S.A. Malik, and M.H. Shah, *Statistical analysis of trace metals in the plasma of cancer patients versus controls*. J Hazard Mater, 2008. **153**(3): p. 1215-21.
54. Romani, A.M., *Cellular magnesium homeostasis*. Arch Biochem Biophys, 2011. **512**(1): p. 1-23.
55. Anastassopoulou, J. and T. Theophanides, *Magnesium-DNA interactions and the possible relation of magnesium to carcinogenesis. Irradiation and free radicals*. Crit Rev Oncol Hematol, 2002. **42**(1): p. 79-91.
56. Kepp, O., et al., *ATP and cancer immunosurveillance*. Embo j, 2021. **40**(13): p. e108130.
57. Hartwig, A., *Role of magnesium in genomic stability*. Mutat Res, 2001. **475**(1-2): p. 113-21.
58. Larsson, S.C., L. Bergkvist, and A. Wolk, *Magnesium intake in relation to risk of colorectal cancer in women*. Jama, 2005. **293**(1): p. 86-9.
59. Wolf, F.I., et al., *Magnesium and neoplasia: from carcinogenesis to tumor growth and progression or treatment*. Arch Biochem Biophys, 2007. **458**(1): p. 24-32.
60. Sahmoun, A.E. and B.B. Singh, *Does a higher ratio of serum calcium to magnesium increase the risk for postmenopausal breast cancer?* Med Hypotheses, 2010. **75**(3): p. 315-8.
61. Schmitz, C., et al., *Regulation of vertebrate cellular Mg²⁺ homeostasis by TRPM7*. Cell, 2003. **114**(2): p. 191-200.
62. Zou, Z.G., et al., *TRPM7, Magnesium, and Signaling*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(8).
63. Il'yasova, D. and G.G. Schwartz, *Cadmium and renal cancer*. Toxicol Appl Pharmacol, 2005. **207**(2): p. 179-86.
64. Väyrynen, S.A., et al., *Clinical impact and network of determinants of tumour necrosis in colorectal cancer*. Br J Cancer, 2016. **114**(12): p. 1334-42.

65. Swinson, D.E., et al., *Tumour necrosis is an independent prognostic marker in non-small cell lung cancer: correlation with biological variables*. Lung Cancer, 2002. **37**(3): p. 235-40.
66. Schaefer, I.M., A. Mariño-Enríquez, and J.A. Fletcher, *What is New in Gastrointestinal Stromal Tumor?* Adv Anat Pathol, 2017. **24**(5): p. 259-267.
67. Miettinen, M. and J. Lasota, *Gastrointestinal stromal tumors: pathology and prognosis at different sites*. Semin Diagn Pathol, 2006. **23**(2): p. 70-83.
68. Rude, R.K., *Magnesium deficiency: a cause of heterogeneous disease in humans*. J Bone Miner Res, 1998. **13**(4): p. 749-58.
69. Lameris, A.L., et al., *Segmental transport of Ca^{2+} and Mg^{2+} along the gastrointestinal tract*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2015. **308**(3): p. G206-16.
70. Khoury, W., et al., *Frozen section examination may facilitate reconstructive surgery for mid and low rectal cancer*. J Surg Oncol, 2014. **110**(8): p. 997-1001.
71. Shirouzu, K., H. Isomoto, and T. Kakegawa, *Distal spread of rectal cancer and optimal distal margin of resection for sphincter-preserving surgery*. Cancer, 1995. **76**(3): p. 388-92.
72. Hill, S.R., *Cost-effectiveness analysis for clinicians*. BMC Med, 2012. **10**: p. 10.
73. Rudmik, L. and M. Drummond, *Health economic evaluation: important principles and methodology*. Laryngoscope, 2013. **123**(6): p. 1341-7.
74. Simon, K., *Colorectal cancer development and advances in screening*. Clin Interv Aging, 2016. **11**: p. 967-76.
75. Alexander, J., et al., *A novel methodology for in vivo endoscopic phenotyping of colorectal cancer based on real-time analysis of the mucosal lipidome: a prospective observational study of the iKnife*. Surg Endosc, 2017. **31**(3): p. 1361-1370.

7. Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde am Universitätsklinikum für Pathologie und Neuropathologie Tübingen in der Abteilung Allgemeine und Molekulare Pathologie und Pathologische Anatomie unter der Betreuung von Prof. Dr. Falko Fend (Chefarzt Pathologie UKT) und in Zusammenarbeit mit der Firma Erbe Elektromedizin GmbH aus Tübingen unter der Leitung von Prof. Dr. Markus Enderle (Mitglied der Geschäftsleitung bei Erbe Elektromedizin) durchgeführt.

Nach erfolgreichen Vorversuchen im Bereich der OES-Analyse erfolgte die Konzeption der Studie durch Dr. Marcus Scharpf (damals Oberarzt Pathologie UKT), Dr. Sascha Dammeier (Projektmanager Erbe Elektromedizin), Daniela Nüßle (Histologiefachkraft Erbe Elektromedizin) und mich.

Die Messungen der verwendeten Proben wurden nach Einarbeitung von Dr. Marcus Scharpf und Daniela Nüßle zum größten Teil von mir durchgeführt. Wenige Proben wurden auch von anderen Mitarbeitern gemessen.

Das Aufsuchen der Messpunkte für die histologische Auswertung erfolgte zum größten Teil durch mich. Die histopathologische Untersuchung wurde hauptsächlich von mir in Zusammenarbeit mit Dr. Marcus Scharpf durchgeführt, teilweise auch von Dr. Irene Gonzalez Menendez (Pathologie UKT) ausgewertet.

Die Planung der statistischen Auswertung habe ich in enger Zusammenarbeit mit Dr. Marcus Scharpf, Dr. Ivonne Aidee Montes Mojarro (Pathologie UKT), Dr. Sascha Dammeier und Dr. Ovidiu Jurjut (Engineer Erbe Elektromedizin) gemacht. Die statistische Auswertung und Anwendung des OES-Algorithmus wurde in regelmäßiger Rücksprache mit mir von Dr. Ovidiu Jurjut durchgeführt.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Ostfildern, 20.10.2023

Fabian Karcher

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich recht herzlich bei allen Personen bedanken, die mir diese Promotion ermöglicht, mit mir zusammengearbeitet, mich motiviert und unterstützt haben.

Zuallererst gilt mein Dank Prof. Dr. F. Fend, der mir als Doktorvater stets zur Seite stand und es mir überhaupt erst ermöglicht hat, diese Arbeit zu erstellen. Für die hilfreichen Anregungen, konstruktive Kritik und Lösungsvorschläge zur Fertigstellung der Arbeit bedanke ich mich recht herzlich.

Einen großen Dank richte ich auch an Prof. Dr. M. Enderle, der mir als Mitglied der Geschäftsleitung bei Erbe Elektromedizin den Zugang zu den notwendigen medizintechnischen Untersuchungsmethoden und die Zusammenarbeit mit Erbe Elektromedizin ermöglicht hat.

Durch einen Aufruf zu einem Hiwi-Job mit Möglichkeit einer Promotion in der Vorlesungsreihe Pathologie während meines Studiums bin ich auf dieses Thema aufmerksam geworden. Ich bedanke mich an dieser Stelle herzlich bei Dr. Marcus Scharpf als meinen Betreuer, der mich diesem interessanten Thema nähergebracht hat, mir insbesondere den Umgang mit dem Messstand als auch Fertigkeiten in der histopathologischen Untersuchung beigebracht und diese kontrolliert hat. Zudem bedanke ich mich auch bei Daniela Nüßle von Erbe Elektromedizin, die mir bei der Datensammlung stets eine große Hilfe war. Bei der Erstellung der Dissertationsschrift wurde meine Betreuung schließlich durch Fr. Dr. Ivonne Aidee Montes Mojarro übernommen, die mir tatkräftig zur Seite stand und mir bei der Erstellung meiner Dissertationsschrift behilflich war. Ich bedanke mich herzlich für die Unterstützung und Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten.

An dieser Stelle gilt mein Dank auch allen Mitarbeitern des pathologischen Instituts, die mir mit der Auswertung der histologischen Schnitte als auch das Anfertigen der Paraffin-Blöcke geholfen haben.

Ein großes Dankeschön geht auch an Dr. Sascha Dammeier, der mir als primärer Ansprechpartner bei Erbe Elektromedizin stets zeitnah und sehr unterstützend zur Seite stand. Durch ihn war der Kontakt zu Erbe Elektromedizin stets reibungslos möglich, ich konnte viele wissenschaftliche Fragen klären und habe viel von ihm lernen können, ich bedanke mich vielmals für die investierte Zeit.

Tatkräftiges Know-how und viel Unterstützung bei der Auswertung der OES-Daten bekam ich von Dr. Ovidiu Jurjut, der mir spannende Einblicke in die Informatik und Datenauswertung gegeben hat, vielen Dank.

Danke auch an das komplette OES-Forschungsteam von Erbe-Elektromedizin für die gute, produktive und angenehme Zusammenarbeit.

Zu guter Letzt bedanke ich mich herzlich bei meiner Familie, meiner Mutter, die mich emotional und nicht zuletzt finanziell durch das Studium begleitet hat, was eine enorme Hilfe darstellte, meinen Geschwistern, die mit bohrenden Fragen Interesse an meiner Arbeit gezeigt haben und mich so weiter motiviert haben. Zudem danke ich Simone Uhlig von Herzen für die Motivation, ihr Interesse in mein Promotionsvorhaben und die investierte Zeit, sie diente mir als emotionale Stütze und konnte mich des Öfteren für ein konstantes Voranschreiten meiner Arbeit motivieren.