

HORUSkop: Gewebedarstellung mittels zerstörungsfreier Bildgebungsmethoden

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Verena Stehl

aus Duisburg

Düsseldorf, 22.07.2025

aus dem Institut für Pathologie

des Universitätsklinikums Düsseldorf und der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichtersteller:

1. Dr. med. Maximilian Seidl

2. Prof. Dr. rer. nat. Henrike Heise

Tag der mündlichen Prüfung: 21.11.25

Mit der Arbeit in Verbindung stehende Publikationen

Finale Phase der iterativen Korrekturrunde der Autor:innen des fertigen Manuskripts, kurz vor geplanter Publikation:

Stehl V, Chen J, Weber A, Lölkes C, Thalwaththete Gedara M, Moser S, Langkemper R, Pichotka M, Meier N, Al Kallaa M, Scheckenbach K, Föll M, Heusinger-Hess V, Bronsert P, Wieczorek M, Seidl M. High Resolution X-ray Computed Tomography and Intelligent Evaluation of Histological Tissue Samples for Diagnostics (HORUS).

Vorhandene Publikationen:

von Schoenfeld A, Bronsert P, Poc M, Fuller A, Filby A, Kraft S, Kurowski K, Sörensen K, Huber J, Pfeiffer J, Proietti M, **Stehl V**, Werner M, Seidl M. Multiple Immunostainings with Different Epitope Retrievals-The FOLGAS Protocol. Int J Mol Sci. 2021 Dec 25;23(1):223. doi: 10.3390/ijms23010223. PMID: 35008649; PMCID: PMC8745613. [1]

Chen, J., Ronchetti, M., **Stehl, V.**, Nguyen, V., Kallaa, M. A., Gedara, M. T., Lölkes, C., Moser, S., Seidl, M., & Wieczorek, M. (2024). 2D-3D Deformable Image Registration of Histology Slide and Micro-CT with ML-based Initialization. arXiv (Cornell University). <https://doi.org/10.48550/arxiv.2410.14343> [2]

Lakkimsetty SS, Weber A, Bemis KA, **Stehl V**, Bronsert P, Föll MC, Vitek O. MSlreg: an R package for unsupervised coregistration of mass spectrometry and H&E images. Bioinformatics. 2024 Nov 1;40(11): btae624. doi: 10.1093/bioinformatics/btae624. PMID: 39418178; PMCID: PMC11530229. [3]



„This is fine“ – Abbildung verändert nach [4]

Zusammenfassung

Das Projekt „Hochauflösende Röntgentomographie und intelligente Auswertung histologischer Gewebeproben für die Diagnostik“ (HORUS, Förderkennzeichen: 13GW057D) wird vom BMBF gefördert und hat die Erforschung innovativer Lösungen zur Entlastung der Pathologie in Deutschland zum Ziel. Die Pathologie ist durch hohen Arbeitsaufwand, Fachkräftemangel und begrenzte digitale Prozesse geprägt. HORUSkop ist ein Teilprojekt, das den Fokus auf die Etablierung des Proof-of-Concept legt und die verschiedenen Möglichkeiten zur Ergänzung der pathologischen Diagnostik auslotet.

Der Fokus von HORUSkop liegt auf der Anwendung der Mikro-CT-Bildgebung (μ CT) zur Erzeugung dreidimensionaler Bilder von formalin-fixierten in Paraffin eingebetteten (FFPE) Gewebeproben und der Erkennung histologischer Gewebestrukturen in den dreidimensionalen Daten. Die erstellten μ CT-Datensätze dienen als Grundlage für die Identifikation optimaler Schnittebenen für mikroskopische Untersuchungen. Somit kann die präzise Schnittführung zur Optimierung der Diagnosefindung beitragen.

Ein wesentlicher Bestandteil von HORUSkop ist die Erkennung von Tumorgewebe im μ CT-Datensatz. Hierbei kommt künstliche Intelligenz (KI) und maschinelles Lernen zum Einsatz, um die automatisierte Erkennung des Tumorgewebes zu zeigen. Dies kann zukünftig eine schnellere, präzisere und ressourcenschonendere Diagnostik ermöglichen.

Weiterhin ist die Identifizierung histologischer Schnitte und molekularbiologischer Anwendungen in HORUSkop, wie Multiplex- oder immunhistochemische Färbungen, im μ CT-Datensatz mittels eines für HORUS programmierten Algorithmus. Die Verknüpfung der 2D-Informationen mit der räumlichen Information wird durch diese Entwicklung ebenfalls ermöglicht.

Der Ausblick von HORUSkop ist nach dem erfolgreichen Proof-of-Concept die Schaffung einer umfassenderen und individuelleren pathologischen Diagnostik, welche durch die zusätzlichen Möglichkeiten der zerstörungsfreien, räumlichen Gewebedarstellung eine patientenorientierte Ergänzung der konventionellen Pathologie ermöglicht.

Abstract

The project “High-resolution X-ray tomography and intelligent evaluation of histological tissue samples for diagnostics” (HORUS, funding code: 13GW057D) is funded by the BMBF and aims to research innovative solutions to relieve the burden on pathology in Germany. Pathology is characterized by a high workload, a shortage of specialists and limited digital processes. HORUSkop is a sub-project that focuses on establishing proof-of-concept and exploring the various options for supplementing pathological diagnostics.

The focus of HORUSkop is on the application of micro-CT imaging (μ CT) to generate three-dimensional images of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue samples and the recognition of histological tissue structures in the three-dimensional data. The μ CT data sets created serve as the basis for identifying optimal sectioning planes for microscopic examinations. In this way, precise sectioning can help to optimize the diagnosis.

A key component of HORUSkop is the detection of tumor tissue in the μ CT data set. Artificial intelligence (AI) and machine learning are used to demonstrate the automated detection of tumor tissue. This can enable faster, more precise and more resource-efficient diagnostics in the future.

Another key component of HORUSkop is the identification of histological sections and molecular biology applications, such as multiplex or immunohistochemical staining, in the μ CT data set using an algorithm programmed for HORUS. The linking of 2D information with spatial information is also made possible by this development.

Following the successful proof-of-concept, the outlook for HORUSkop is the creation of more comprehensive and individualized pathological diagnostics, which, thanks to the additional possibilities of non-destructive, spatial tissue imaging, enables a patient-oriented supplement to conventional pathology.

Inhaltsverzeichnis

Mit der Arbeit in Verbindung stehende Publikationen	17
Zusammenfassung	19
Abstract	20
Inhaltsverzeichnis	21
Abkürzungsverzeichnis	23
Tabellenverzeichnis	24
Abbildungsverzeichnis	25
1. Einleitung.....	15
1.1. Pathologie und Digitalisierung	15
1.2. Gewebe, Präparation und Immunologie	18
1.3. Färbemethoden in HORUS	24
1.4. Mikroskopische Methoden in HORUS.....	30
1.5. Zerstörungs- und markierungsfreie Bildgebungsmethoden	32
1.6. Annotation und Strukturerkennung von histopathologischen Strukturen	35
1.7. Statistische Auswertung von Annotationsdaten und Korrelation mit klinischen Daten 37	
2. Material und Methoden.....	40
2.1. Material	40
2.2. Methoden	48
3. Ergebnisse	57
3.1. Klinische Kohorte der Kopf-Hals-Tumorproben und korrespondierenden Lymphknotenmetastasen.....	57
3.2. Erfolgreiche Entparaffinierung und oberflächenmikroskopische Aufnahmen der FFPE- Blockoberfläche zur Hydrophilisierung und anschließenden Färbung.....	58
3.3. Deskriptive Statistik der Annotationsdaten von Tonsillen- und Tumorproben	63
3.4. Vergleich verschiedener Ebenen in den annotierten μ CT-Daten zeigt den Vorteil der räumlichen Komponente zur Erkennung von histopathologisch relevanten Gewebestrukturen 70	
3.5. Verschiedene μ CT-Messarten mit unterschiedlichen Auflösungen zur bestmöglichen Darstellung von histopathologisch relevanten Strukturen mit Phasenkontrast- μ CT und Synchrotron-Aufnahmen	82
3.6. Oberflächenmessungen der FFPE-Blöcke zeigen ungerade Oberfläche im Profil	84
3.7. Die annotierten Keimzentren zeigen eine Kreisähnlichkeit zwischen 0,8 und 1,1	85
3.8. Anhand der Annotationsdaten konnte ein Algorithmus für Ebenenfindung erstellt werden, der das automatisierte Wiederfinden der histologischen Schnittpräparate im μ CT- Datensatz ermöglicht	87

3.9.	Das Training der künstlichen Intelligenz zur automatisierten Annotation erfolgte anhand der manuellen Annotationsdaten	88
3.10.	Der Vergleich manueller Annotation gegen KI-Annotation konnte für die Genauigkeit der Annotation der Tonsillen-Probe einen Dice-Score von 0,57 und für die Tumorprobe einen Dice-Score von 0,71 erreichen.....	89
3.11.	Die Übertragung von H&E-Annotationsdaten auf μ CT-Datensätze ermöglicht eine Annotation von Strukturen bis zu 0,4 μ m Größe bei einer μ CT-Auflösung von 1 – 5 μ m mit einer Genauigkeit, die mit Dice-Werten von 0,61 für die Tonsille und 0,78 für die Tumor-Probe bestimmt wurde	92
3.12.	Korrelation der Annotationsdaten aller annotierten ROIs für die Marker verhorntes und nicht-verhorntes Tumorgewebe mit klinischen Daten, die zur Durchführung der Diagnostik erhoben wurden	93
3.13.	Verhornte Plattenepithelkarzinome nahmen einen signifikant kleineren Anteil am Probenvolumen ein als unverhornte Plattenepithelkarzinome	97
3.14.	Die Gefäßdaten in den ROIs der Tumorproben zeigen den Gefäßverlauf im Vergleich zum Tumorgewebe	97
3.15.	Die zuverlässige Relokalisation von Schnitten im μ CT-Datensatz lässt sich auf Multiplex-Färbungen übertragen	99
4.	Diskussion	105
4.1.	Projektbeschreibung	105
4.2.	Die Definition histopathologisch relevanter Strukturen bis zu 0,4 μ m beschreibt den Goldstandard der Pathologie	105
4.5.	Annotationen sowie die deskriptive Statistik der Annotationsdaten von Tonsillen- und Tumorproben.	109
4.6.	Statistische Flächendaten einzelner 2D-Flächen extrahiert aus dem μ CT-Datensatz zeigen die Relevanz der räumlichen Komponente und den möglichen Nutzen, diese in der pathologischen Diagnostik zu etablieren.....	111
4.7.	Die annotierten Keimzentren zeigen eine mittlere Kreisähnlichkeit von 0,92, was für Keimzentren mit regulärer Kreisform spricht.....	112
4.8.	Klinische Daten aller untersuchten Tumorproben und Vergleich der erkannten Gewebearten.....	114
4.9.	Die Multiplex-Bildgebung erwies sich als sinnvolle Ergänzung der HORUS-Methode und kann zukünftig Aufschluss über Tumorummunologie geben	115
5.	Ausblick.....	117
6.	Literaturverzeichnis	119
7.	Danksagung	129
	Eidesstattliche Erklärung	130

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
CD	Cluster of Differentiation
CFSE	Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester
CNN	<i>Convolutional Neural Network</i> , dt. Faltendes neuronales Netzwerk
EtBr	Ethidiumbromid
FFD	<i>Free Form Deformation</i> , dt. Freiform-Deformation
FFPE	Formalin-fixiert und Paraffin eingebettet
GAN	<i>Generative Adversarial Networks</i>
H&E	Hämatoxylin & Eosin
HNSCC	<i>Head and Neck Squamous Cell Carcinoma</i> , dt. Kopf-Hals Plattenepithelkarzinome
HPV	Humanes Papilloma Virus
KI	Künstliche Intelligenz
LC2-Metrik	<i>Linear Combination</i> , dt. Lineare Kombinationsmetrik
LNCC	lokale normalisierte Kreuzkorrelation
MeV	Mega-Elektronen-Volt
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> , dt. Haupthistokompatibilitätskomplex
OPSCC	<i>Oropharyngeal Sqamous Cell Carcinoma</i> , dt. oropharyngeale Plattenepithelkarzinom
OT	Objektträger
Pan-CK	Pan-Cytokeratin
PEK	Plattenepithelkarzinom
WHO	<i>World Health Organization</i> , dt. Welt Gesundheitsorganisation
μCT	Mikro-Computertomographie
μm	Mikrometer

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	40
Tabelle 2:	41
Tabelle 3:	41
Tabelle 4:	42
Tabelle 5:	43
Tabelle 6:	43
Tabelle 7:	44
Tabelle 8:	44
Tabelle 9:	45
Tabelle 10:.....	46
Tabelle 11:.....	47
Tabelle 12:.....	47
Tabelle 13:.....	48
Tabelle 14:.....	49
Tabelle 15:.....	50
Tabelle 16:.....	57
Tabelle 17:.....	64
Tabelle 18:.....	66
Tabelle 19:.....	67
Tabelle 20:.....	69
Tabelle 21:.....	71
Tabelle 22:.....	74
Tabelle 23:.....	76
Tabelle 24:.....	80
Tabelle 25:	85
Tabelle 26:.....	90
Tabelle 27:	93

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	17
Abbildung 2:	18
Abbildung 3:	20
Abbildung 4:	25
Abbildung 5:	27
Abbildung 6:	28
Abbildung 7:	34
Abbildung 8:	36
Abbildung 9:	52
Abbildung 10:	53
Abbildung 11:	57
Abbildung 12:	60
Abbildung 13:	61
Abbildung 14:	62
Abbildung 15:	63
Abbildung 16:	64
Abbildung 17:	65
Abbildung 18:	67
Abbildung 19:	69
Abbildung 20:	71
Abbildung 21:	73
Abbildung 22:	74
Abbildung 23:	76
Abbildung 24:	79
Abbildung 25:	79
Abbildung 26:	83
Abbildung 27:	85
Abbildung 28:	86
Abbildung 29:	87
Abbildung 30:	88
Abbildung 31:	90
Abbildung 32:	91
Abbildung 33:	92
Abbildung 34:	94
Abbildung 35:	96
Abbildung 36:	97
Abbildung 37:	98
Abbildung 38:	99
Abbildung 39:	102
Abbildung 40:	104

1. Einleitung

1.1. Pathologie und Digitalisierung

1.1.1. Konventionelle Pathologie und Histologie in Deutschland

In Deutschland spielt die Histopathologie eine zentrale Rolle in der medizinischen Diagnostik und Forschung. Über die mikroskopische Untersuchung von Gewebeproben, Zellen und Körperflüssigkeiten werden Krankheiten diagnostiziert und Informationen über deren Ursachen und Verlauf gewonnen [5]. Die Pathologie ist eng mit der medizinischen Praxis verbunden, da sie Ärzten dabei hilft, genaue Diagnosen zu stellen und geeignete Behandlungspläne zu entwickeln. Sie liefert wichtige Informationen für die medizinische Forschung, indem sie dazu beiträgt, neue Krankheiten zu identifizieren, ihre Ursachen zu erforschen und effektive Therapien zu entwickeln [5].

Die Bedeutung der konventionellen Pathologie und Histologie in Deutschland spiegelt sich auch in der Anzahl der Fachärzt:innen für Pathologie wider. Mit etwa 1800 berufstätigen Fachärzt:innen, die jährlich rund 40 Millionen Gewebeproben auswerten und befunden müssen, ist dieser Bereich von entscheidender Bedeutung für das Gesundheitswesen [6]. Die Auswahl der zu befundenden Teile der Proben erfolgt auf Grundlage von Erfahrung, was zu Variabilität der Probenauswahl und Diagnose, somit den Behandlungsverlauf haben könnte. Es ist daher entscheidend, dass Prozesse in der Pathologie kontinuierlich überprüft und optimiert werden, um die bestmögliche Diagnosequalität und Patientenversorgung zu gewährleisten [5]. Um diesem Anspruch gerecht zu werden, implementiert die Pathologie in Deutschland angemessene Qualitätsstandards und Richtlinien, setzt geschultes Personal ein und verfügt über moderne technische Ausstattung [7], [8].

Ein Problem in der konventionellen Histologie ist, dass die ausgewählten Schnitte eine rein zweidimensionale Darstellung des Gewebes bieten, welche zusätzlich zum Rest des Gewebes verzerrt ist [9]. Die elastische Verzerrung ergibt sich durch die Anfertigung der Schnitte: Die Gewebe werden in der Regel in dünne Scheiben (ca. 1 bis 2 μm Dicke) geschnitten und auf ein Wasserbad übertragen. Etwaige Falten werden durch das warme Wasser gestreckt und dadurch geglättet. Anschließend wird der Schnitt auf Glasobjektträger überführt und gefärbt, um ihn unter dem Mikroskop zu betrachten. Somit können nur etwa 0,5 % einer Gesamtprobe präpariert und untersucht werden, was ein Risiko von Fehldiagnosen oder zum Übersehen wichtiger Informationen darstellt [9]. Da die durch die Schnitthanfertigung verursachte Verzerrung ungerichtet ist und sich je nach Schnitt anders verhält, führt dies zu einer nicht gleichbleibenden Qualität in der konventionellen Histologie. Die Einführung digitaler Lösungen in der Pathologie, insbesondere die digitale Bildgebung und Bildanalyse, bietet vielversprechende Möglichkeiten, diese Probleme zu lösen.

1.1.2. Bisherige Digitalisierung in der deutschen Pathologie

Die Digitalisierung spielt in der Pathologie in Deutschland eine zunehmende Rolle [10]. Sie ermöglicht die Verbesserung von Diagnoseverfahren, die effiziente Verwaltung von Patientendaten, die Möglichkeit zur Fernkonsultation und Zusammenarbeit zwischen verschiedenen Fachleuten. Die Implementierung digitaler Lösungen in der Pathologie eröffnet die Möglichkeit zur Integration von Künstlicher Intelligenz und maschinellen Lernverfahren, um die Diagnosegenauigkeit weiter zu erhöhen und automatisierte Analysemethoden zu entwickeln. Digitale Standards sind in der Pathologie jedoch noch nicht weit verbreitet, [11], [12]. Zu den

digitalpathologischen Standards gehören zu aktuellem Zeitpunkt im Institut für Pathologie in Düsseldorf ein Slidescanner und Speech-to-Text für die Befunderstellung. Sie ermöglichen die digitale Erfassung und Analyse von Gewebeproben sowie die automatisierte Erstellung von Befunden. Diese allerdings gestalten sich aktuell als Mehrarbeit für das Personal, da Scans von einzelnen Gewebeproben manuell zum Ende des Workflows durchgeführt werden müssen. Genauso ist es bei Speech-to-Text Assistenten: die aktuell verwendeten Systeme benötigen Korrektur und Anpassung durch das Personal, um eine fehlerfreie Übertragung der gesprochenen Texte zu gewährleisten. Die Implementierung einer effizienten digitalen Pathologie erfordert daher nicht nur die Bereitstellung entsprechender Technologien, sondern auch die Schulung des Personals, um diese Technologien effektiv nutzen zu können.

1.1.3. Der Ansatz von HORUS

Zu den Herausforderungen der Pathologie in Deutschland zählen insbesondere der hohe Arbeitsaufwand, der Mangel an Fachpersonal und die eingeschränkte Nutzung digitaler Arbeitsabläufe. Um diesen Herausforderungen zu begegnen, hat das BMBF-geförderte Projekt HORUS (Förderkennzeichen: 13GW057D) eine innovative Lösung erforscht (s. Abbildung 1). Mittels nicht-invasiver Röntgenbildgebung werden dreidimensionale Bilder von Gewebeproben erstellt, die eine detaillierte morphologische Analyse ermöglichen. Die zu untersuchenden Gewebeproben werden vor dem Scan formalin-fixiert und paraffin-eingebettet (FFPE), sodass anschließend konventionelle histopathologische Untersuchungen unverändert möglich sind. Mittels der 3D-Datensätze gesamter Proben können optimale Schnittebenen für folgende mikroskopische Untersuchungen identifiziert und somit die Diagnosefindung unterstützt werden. HORUS erweitert die konventionelle Histologie um die digitale Röntgenbildgebung und zusätzlich um eine virtuelle Histologie. Innerhalb des virtuell dargestellten Datensatzes kann auf Grundlage eines zuvor trainierten künstlichen neuronalen Netzwerks eine automatisierte Erkennung des Tumorgewebes erfolgen.

Ziel ist zunächst eine präzise Schnittführung, wodurch eine schnellere und zuverlässigere Diagnosestellung ermöglicht werden soll. Ein weiterer Aspekt ist die Materialersparnis. Diese führt zu einer effizienteren Nutzung der Ressourcen und einer möglichen Reduzierung von Kosten.

Die gesparten Gewebeproben können für die Erforschung verschiedener Therapien und die Optimierung der Patientenversorgung eingesetzt werden.

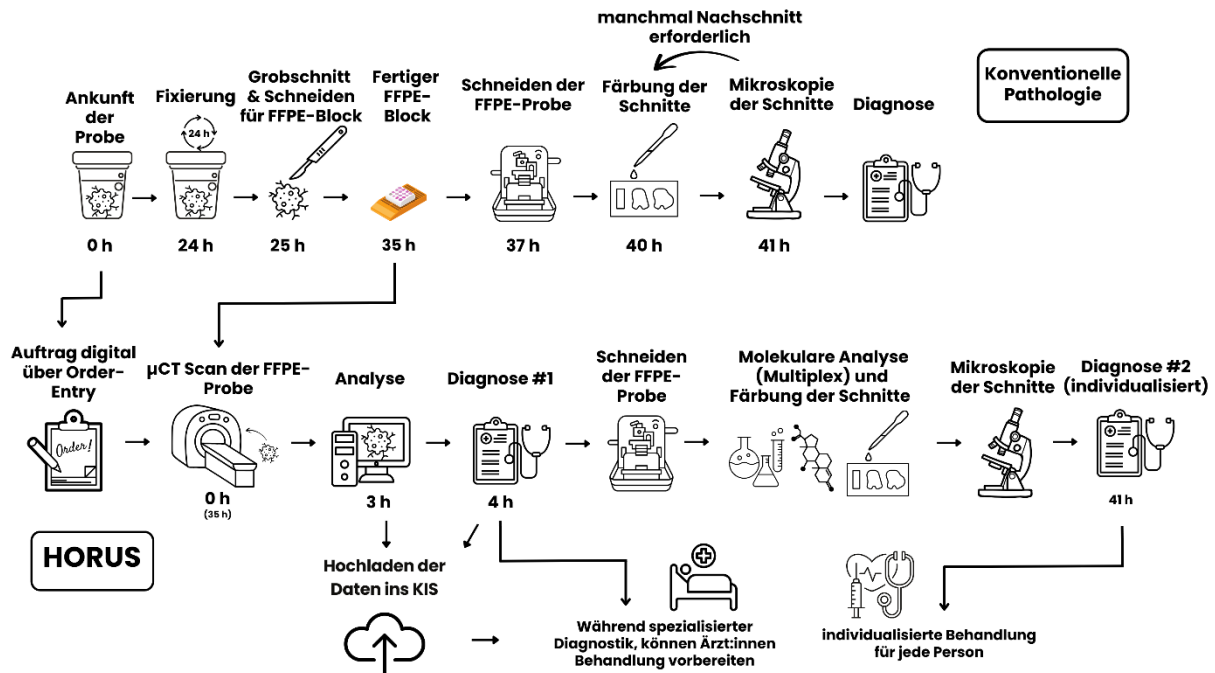


Abbildung 1: Schematische Darstellung des pathologischen Workflows und der HORUS-Methode. **Oben:** Sobald die Probe eintrifft, wird diese 24 Stunden in Formalin fixiert. Danach erfolgt der grobe Zuschnitt, bevor der Feinschnitt erfolgt. Diese Schritte erfolgen nach Erfahrung, es werden ca. 0,5% der Probe verarbeitet. Danach wird die Probe entwässert und paraffiniert, sodass eine formalin-fixierte, paraffineingebettete Probe auf einer Plastikkassette entsteht, der FFPE-Block. Die Probe wird danach in 1 bis 2 µm dünne Scheiben geschnitten und auf Glasobjektträger (OT) aufgezogen. Dann wird der Schnitt an den OT angebacken. Danach wird der Schnitt entparaffiniert und wieder bewässert über eine absteigende Alkoholreihe, bevor die histopathologischen Färbungen, wie bspw. Hämatoxylin-Eosin, durchgeführt werden. Nachfolgend wird eine aufsteigende Alkoholreihe durchgeführt und der Schnitt schließlich mit einem hydrophoben Eindeckmittel eingedeckt, sodass dieser dann an die behandelnden Patholog:innen übergeben werden kann. Je nachdem, ob der relevante Bereich in den dünnen Schnitten sichtbar ist, ist ein Nachschnitt der Probe erforderlich, sodass daraus ein iterativer Prozess wird. Nach der Beurteilung wird eine Diagnose abgegeben. **Unten:** Vor Ankunft der Probe, wird in der Klinik bereits ein Order-Entry-Auftrag erstellt, damit nach den Fixierungsschritten direkt der µCT-Scan der Probe erfolgen kann. Nach dem Scan werden die Daten in das Krankenhausinformationssystem (KIS) hochgeladen und können dort abgerufen werden. Bei Abruf werden die Daten in der ImFusion Software geöffnet. Mithilfe der zuvor trainierten KI werden Patholog:innen bei der Erkennung von Tumorgewebe im µCT-Datensatz unterstützt. Ggf. kann eine erste diagnostische Einschätzung gegeben werden. Während der digitalen Analyse können Schnitte gezielt angefertigt werden, da im 3D-Datensatz relevante Schnittebenen mittels eines Algorithmus festgestellt werden. Anhand der Schnitte können molekulare Analysen, wie bspw. Multiplex-Färbungen und histologische Analysen durchgeführt werden, sodass am Ende eine individualisierte Diagnose getätigt werden kann.

In dem von uns konzipierten Projekt HORUS wurde untersucht, inwiefern sich mithilfe von künstlicher Intelligenz und maschinellem Lernen histopathologische Bilder in einem µCT-Datensatz identifizieren und histologische Details im Mikrometerbereich in 3D auflösen lassen (s. Abbildung 2)

Die verschiedenen Messmethoden werden zur räumlichen Darstellung histologischer Details zusammengebracht. Diese Vereinbarung der histologischen Schnittpräparate (s. Abbildung 2b) mit den Messungen direkt am FFPE-Block durch die fluoreszente Oberflächenfärbung (s. Abbildung 2c), der Aufnahme des Oberflächenprofils (s. Abbildung 2a) und den µCT-Aufnahmen als räumliche Komponente (s. Abbildung 2d), stellen den HORUS-Workflow dar (s. Abbildung 1).

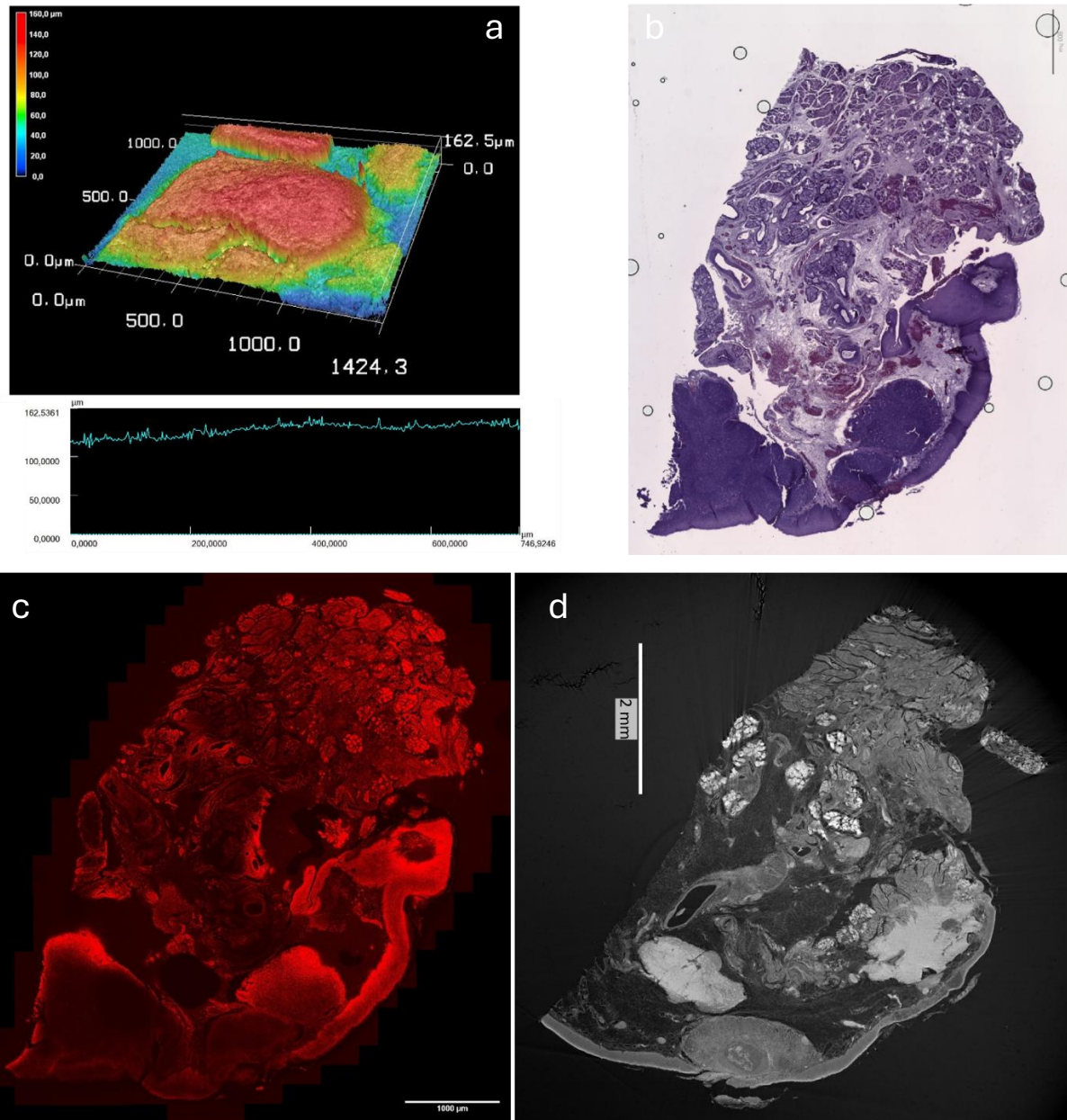


Abbildung 2: Oberflächenprofil und verschiedene Oberflächenaufnahmen von FFPE-Tonsillengewebe im Paraffinblock und auf dem Glasobjektträger. (a) Das Oberflächenprofil der Probe wurde mit einem Lasermikroskop vermessen, sodass eine Heatmap der Oberfläche erstellt werden konnte. Zu erkennen ist, dass der Höhenunterschied über die gesamte Probe 162,5 µm beträgt. Das Gewebe steht aus dem Paraffin hervor. Zur Färbung der FFPE-Blockoberfläche wurde eine hydrophile Oberfläche geschaffen. (b) Der auf einen Glasobjektträger gezogene H&E-Schnitt einer Probe zeigt die Standardfärbung in der Pathologie. (c) Die rote Fluoreszenzfärbung, zeigt eine Struktur- und Zellkernfärbung auf der Blockoberfläche, welche dank der hydrophilen hervorstehenden Gewebeoberfläche verzerrungsfrei durchgeführt werden konnte. (d) Dazu ist die Synchrotronaufnahme aus dem DESY an derselben Probe zu sehen, welche die histologisch auf dem HE-Schnitt festgelegten relevanten Strukturen in unverzerrtem und markierungsfreiem Zustand offenbart.

1.2. Gewebe, Präparation und Immunologie

1.2.1. Humanes Gewebe und Tumorummunologie

Krebs ist durch eine pathologische Veränderung des Gewebes gekennzeichnet, die durch unkontrolliertes Zellwachstum und invasives Eindringen in benachbartes Gewebe charakterisiert ist. Diese Transformation geht mit einer gestörten Zellteilung und der Fähigkeit zur Infiltration benachbarter Gewebe einher. Als ursächlich werden multifaktorielle Prozesse identifiziert, zu

denen insbesondere genetische Mutationen, Exposition gegenüber kanzerogenen Umweltfaktoren wie Tabakrauch und ionisierender Strahlung sowie bestimmte Infektionen zählen [13]. Zu den infektionsbedingten Ursachen zählen insbesondere onkogene Viren (Onkoviren), wie das Humane Papilloma Virus (HPV), das Epstein-Barr-Virus (EBV) und das Hepatitis-B-Virus (HBV). Die Integration der Viren in das Wirtsgenom bedingt eine Dysregulation der zellulären Kontrollmechanismen und eine unkontrollierte Proliferation [14].

Auf molekularer Ebene sind Krebszellen durch die Freisetzung von „Damage-Associated Molecular Patterns“ (DAMPs) charakterisiert. Diese Signalmoleküle werden bei Zellstress oder Gewebeschädigung freigesetzt und können das Immunsystem aktivieren. Je nach Tumorkontext fördern DAMPs entweder tumorunterdrückende Immunreaktionen oder begünstigen durch die Stimulierung chronischer Entzündungen das Tumorwachstum [15].

Ein weiteres tumorbiologisch relevantes Merkmal ist die Entstehung sogenannter Neoantigene. Diese entstehen durch genetische Mutationen und resultieren in neuartigen, für das Immunsystem potenziell erkennbaren Proteinstrukturen. Neoantigene sind von besonderem Interesse in der Krebsimmuntherapie, da sie Zielstrukturen für spezifische Immunantworten darstellen und Grundlage personalisierter Therapien bilden [16].

Das Fortschreiten der Tumorentwicklung wird durch komplexe Interaktionen zwischen Tumorzellen und dem Immunsystem beeinflusst. Tumorzellen entwickeln dabei spezifische Mechanismen zur Umgehung der Immunüberwachung (Immun-Escape-Strategien). Dazu zählt unter anderem die Herunterregulation von MHC-I-Molekülen, die für die Antigenpräsentation an zytotoxische T-Zellen essenziell sind. Zudem exprimieren Tumorzellen Checkpoint-Moleküle wie PD-L1 und CTLA-4-Liganden, welche T-Zellen in einen anergen Zustand versetzen und so deren zytotoxische Aktivität verhindern [17], [18], [19].

Darüber hinaus fördern Tumorzellen durch die Sekretion immunsuppressiver Zytokine wie Transforming Growth Factor-beta (TGF- β) und Interleukin-10 (IL-10) ein Tumormikromilieu, das regulatorische T-Zellen (Tregs) und myeloide Suppressorzellen (MDSCs) anzieht. Diese Zelltypen tragen aktiv zur Unterdrückung einer effektiven Immunantwort bei [20].

Die Analyse von Gewebeproben, insbesondere die Untersuchung von regionalen Lymphknotenmetastasen, liefert entscheidende Erkenntnisse über die Tumorbiologie und die Wechselwirkungen zwischen Tumorzellen und Immunzellen. Lymphknoten spielen eine zentrale Rolle in der Koordination der Immunantwort. Die Untersuchung von Metastasen in regionalen Lymphknoten kann wichtige Informationen über die Tumorbiologie liefern, da Lymphknoten eine zentrale Rolle bei der Aktivierung und Koordinierung der Immunantwort gegen den Tumor spielen [21]. Lymphknotenmetastasen treten auf, wenn Tumorzellen über die Lymphgefäße in nahegelegene Lymphknoten gelangen. Dies ist ein kritischer Schritt bei der Metastasierung, u.a. von Kopf-Hals-Tumoren. Die Präsenz von Tumorzellen in Lymphknoten kann das Immunsystem aktivieren, allerdings können Tumorzellen auch immunmodulatorische Mechanismen entwickeln, um der Erkennung und Zerstörung durch Immunzellen zu entgehen [17]. Die Interaktion zwischen Tumorzellen und Immunzellen in den Lymphknoten kann daher entscheidend für die Prognose und das Ansprechen auf Therapien sein.

1.2.2. Gaumenmandeln (*Tonsillae Palatinae*)

Die *Tonsillae palatinae*, Gaumenmandeln, sind lymphatische Organe im Waldeyer-Rachenring. Dies ist eine Gruppe von lymphatischen Geweben im Pharynx und in der Mundhöhle, die als erste „Verteidigungslinie“ gegen eindringende Pathogene dienen. Die immunologische Funktion und

der Aufbau der Tonsillen sind komplex und spezifisch darauf ausgerichtet, den Körper vor Infektionen zu schützen [22].

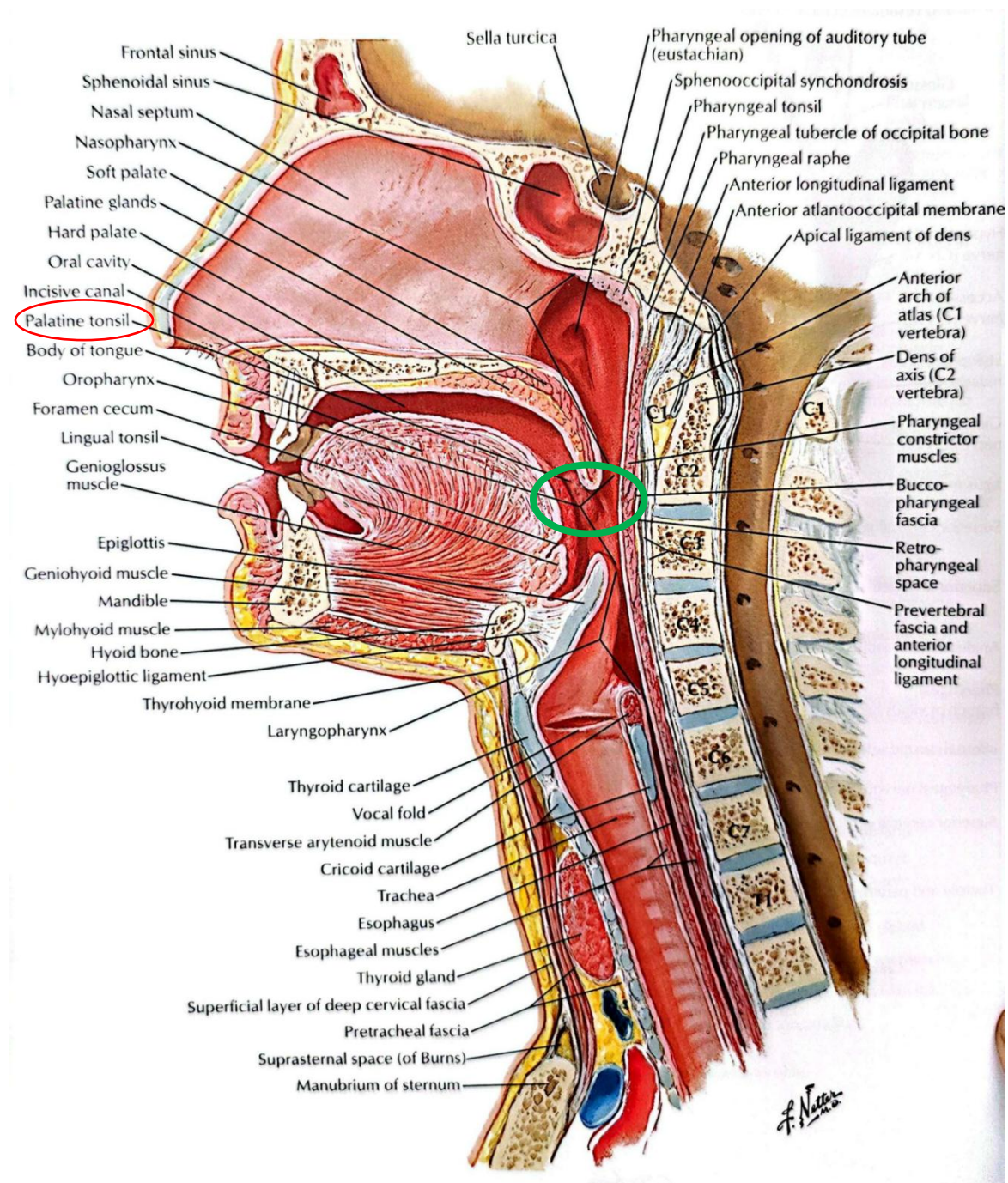


Abbildung 3: Anatomische Seitenansicht des humanen Kopf-Hals-Bereichs. Rot bzw. Grün eingekreist sind die Gaumenmandeln, welche sich im oberen Rachenbereich am Zungenende befinden. Abbildung verändert nach Netter [23].

Sie sind ein gutes Modell zur Erforschung und Diagnose von Krebserkrankungen im Kopf-Hals-Bereich. In allen Phasen der Tumorentwicklung spielen die Wechselwirkungen zwischen dem Immunsystem und den Tumorzellen sowie die Entstehung einer chronischen Entzündung in unmittelbarer Umgebung des Tumors eine entscheidende Rolle. Eine entzündliche Reaktion in den Gaumenmandeln (*Tonsillae palatinae*) geht mit charakteristischen histologischen Mustern einher [24], [25]. Zunächst zeigt sich eine ausgeprägte Infiltration des Gewebes mit Immunzellen, insbesondere T-Lymphozyten, B-Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen. Häufig geht

diese mit einer Hyperplasie der lymphatischen Follikel einher, die durch vergrößerte Keimzentren gekennzeichnet sind, in denen die Aktivierung und Proliferation von B-Zellen stattfindet. Auch die subepitheliale Zone, die T-Zell-reich ist, kann eine deutliche Vergrößerung aufweisen [22], [24]. Die Gewebearchitektur verändert sich weiter durch eine Hyperplasie des Epithels, das die Krypten der Gaumenmandeln auskleidet. In vielen Fällen sind die Krypten erweitert und enthalten vermehrt Zelldetritus sowie exsudative Bestandteile. Das Oberflächenepithel kann Anzeichen einer Erosion oder Ulzeration aufweisen. Zudem treten häufig vaskuläre Veränderungen auf, darunter eine Dilatation und Hyperämie der Blutgefäße [22]. Die Endothelzellen proliferieren und es bildet sich ein entzündliches Ödem im Interstitium. Zudem werden vermehrt Adhäsionsmoleküle auf den Endothelzellen exprimiert, die die Migration von Immunzellen ins Gewebe erleichtern. In chronischen Fällen kann eine Fibrosierung auftreten, wobei kollagene Fasern das lymphatische Gewebe durchziehen und dessen Funktion beeinträchtigen können. Diese strukturellen Veränderungen können zu einer gestörten Immunfunktion führen und ein potenziell immunsuppressives Mikromilieu schaffen, was wiederum das Risiko für eine tumoröse Transformation erhöhen kann [22], [26].

Immunologisch sind die Gaumenmandeln folgendermaßen aufgebaut [26], [27]: Sie bestehen aus lymphatischem Gewebe, das in eine Kapsel aus Bindegewebe eingebettet ist. Die Oberfläche der Tonsillen ist von einer Schleimhaut bedeckt, die tiefe Furchen, sogenannte Krypten, aufweist. Diese Krypten erhöhen die Oberfläche der Tonsillen erheblich. Die immunologischen Prozesse in den Tonsillen beginnen, wenn Pathogene in die Krypten gelangen. Die Aktivierung des Immunsystems in den Tonsillen führt oft zu einer Entzündungsreaktion, die durch die Anwesenheit von Immunzellen und die Produktion von Zytokinen gekennzeichnet ist. Diese Entzündung hilft, Pathogene zu eliminieren, kann aber auch zu den typischen Symptomen einer Tonsillitis führen, wie Schmerzen und Schwellungen.

Das lymphatische Gewebe der Tonsillen enthält hauptsächlich Lymphozyten, darunter B- und T-Zellen, sowie andere Immunzellen wie Makrophagen und dendritische Zellen. Innerhalb des lymphatischen Gewebes befinden sich Follikel mit Keimzentren, die besonders aktiv in der Immunantwort sind. In diesen Keimzentren finden die Proliferation und Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen statt, was zur Bildung von spezifischen Antikörpern gegen eingedrungene Pathogene führt. B-Zellen sind für die Produktion von Antikörpern verantwortlich, während T-Zellen eine Rolle bei der Zell-vermittelten Immunität spielen. Dendritische Zellen erkennen die eindringenden Pathogene und präsentieren ihre Antigene den T-Zellen. Dies aktiviert die T-Zellen, die wiederum B-Zellen aktivieren. Aktivierte B-Zellen differenzieren sich z.T. in Plasmazellen, die spezifische Antikörper gegen die erkannten Antigene produzieren. Diese Antikörper binden an die Pathogene und markieren sie für die Zerstörung durch andere Immunzellen, das Komplementsystem oder neutralisieren sie direkt. Einige der aktivierten B- und T-Zellen werden zu Gedächtniszellen, die bei einem erneuten Kontakt mit demselben Pathogen eine schnellere und stärkere Immunantwort ermöglichen [26], [28].

1.2.3. Kopf-Hals-Tumoren und korrespondierende Lymphknotenmetastasen

Kopf-Hals-Tumoren, insbesondere Plattenepithelkarzinome (HNSCCs – Head and Neck Squamous Cell Carcinomas), sind eine heterogene Gruppe von malignen Erkrankungen, die meist aus dem Epithel im Bereich von Mund, Rachen, Kehlkopf oder anderen Kopf-Hals-Regionen hervorgehen. Sie treten meist in Form von Plattenepithelkarzinomen auf. Diese Tumorarten können HPV-assoziiert sein. Kopf-Hals-Karzinome haben oft eine schlechte Prognose, da sie

meist erst in fortgeschrittenen Stadien erkannt werden. Zu diesem Zeitpunkt sind sie meist schon lymphonodal metastasiert [29].

In der vorliegenden Arbeit werden die verhornten und nicht-verhornten Anteile des Tumors identifiziert.

Verhorntes Tumorgewebe ist durch eine übermäßige Verhornung (Hyperkeratose) oder Parakeratose (Verhornung mit erhaltenen Zellkernen) gekennzeichnet [30]. Das Gewebe weist eine Differenzierung auf, die an normales Plattenepithel erinnert, jedoch durch Mutationen in Genen wie TP53, CDKN2A oder EGFR dysreguliert ist [31]. Die Verhornung wirkt oft als physische Barriere gegen die Infiltration von Immunzellen und erschwert die Präsentation tumorassoziierter Antigene, was zu einer verminderten Immunaktivität führt [30], [31]. Histologisch zeigt verhorntes Tumorgewebe eine starke Differenzierung mit eosinophilem Zytoplasma und charakteristischer Keratinbildung [32].

Demgegenüber weist nicht-verhorntes Tumorgewebe eine defizitäre Fähigkeit zur Keratinisierung auf, was sich in einer weniger differenzierten, häufig aggressiveren Morphologie manifestiert. Die zugrunde liegenden Mutationen umfassen Gene wie NOTCH1 oder PIK3CA [33], [34]. In HPV-assoziierten Tumoren spielt zusätzlich die virale Integration eine zentrale pathogenetische Rolle. Nicht-verhornte Tumoren zeigen oft eine stärkere metabolische Aktivität und ziehen mehr Immunzellen an [32]. Bei HPV-positiven Tumoren tritt zudem eine ausgeprägte Aktivierung von T-Zellen auf, was mit einer hohen Tumormutationslast und der Präsentation von Neoantigenen korreliert [35]. Dennoch ist es diesen Tumoren möglich, Mechanismen wie die Überexpression von PD-L1 zu nutzen, um die Immunantwort zu unterdrücken [36]. Histologisch zeigt sich ein hohes Kern-Plasma-Verhältnis mit basophiler Färbung und einem weniger differenzierten Erscheinungsbild [32].

Das Tumorstroma nimmt ebenfalls eine zentrale Rolle in der Tumorprogression und Immunregulation ein. Es besteht aus krebsassoziierten Fibroblasten (CAFs), Endothelzellen, Immunzellen wie tumorassozierten Makrophagen (TAMs), regulatorischen T-Zellen (Tregs) und myeloiden Suppressorzellen (MDSCs) sowie einer reichhaltigen extrazellulären Matrix (ECM) [37], [38]. Das Stroma fördert die Tumorentwicklung durch die Sekretion von Zytokinen wie IL-10 und TGF- β , die eine immunsuppressive Mikroumgebung schaffen. Gleichzeitig wirkt die Extrazelluläre Matrix (ECM) oft als physische Barriere, die die Migration von Immunzellen behindert. Fibroblasten und TAMs, die mit dem malignen Tumor assoziiert sind, fördern die Tumorprogression und die Bildung neuer Blutgefäße (Angiogenese) durch die Sekretion von Wachstumsfaktoren und chemotaktischen Molekülen [37], [38]. Das Stroma zeigt histologisch eine kollagenreiche Matrix und heterogene Zellpopulationen [32].

Immunzellen, einschließlich T-Zellen, natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und dendritischen Zellen, infiltrieren häufig Tumorgewebe und können sowohl tumorhemmende als auch tumorfördernde Wirkungen haben. T-Zellen erkennen spezifische Antigene auf Tumorzellen und können diese direkt angreifen [39]. NK-Zellen können Tumorzellen ohne vorherige Sensibilisierung abtöten [40]. Dendritische Zellen sind für die Präsentation von Tumorantigenen und die Aktivierung von T-Zellen entscheidend. Die Balance zwischen aktivierenden und inhibierenden Signalen bestimmt, ob eine effektive Immunantwort gegen den Tumor initiiert wird oder nicht.

Die Entdeckung der immunmodulatorischen Mechanismen von Tumorzellen hat zur Entwicklung von Immuntherapien geführt, insbesondere von Immuncheckpoint-Inhibitoren, die darauf abzielen, die durch Tumorzellen induzierte Immunsuppression zu überwinden [18]. Beispielsweise zielen Therapien, die PD-1 oder PD-L1 blockieren, darauf ab, die Aktivität von T-

Zellen gegen den Tumor wiederherzustellen [36]. Diese Therapien haben in der Behandlung von Kopf-Hals-Tumoren vielversprechende Ergebnisse gezeigt, insbesondere bei Patienten mit PD-L1 hoch exprimierenden Tumoren [36].

1.2.3.1. Humanes Papillomavirus und Bedeutung für Kopf-Hals-Tumorerkrankungen

Das humane Papillomavirus (HPV) bezeichnet eine Gruppe von DNA-Viren, welche vornehmlich Epithelien infizieren. Unter den über 200 bekannten HPV-Typen werden einige als hochrisikogen eingestuft, da sie in engem Zusammenhang mit der Entstehung von Karzinomen stehen [41]. Von besonderer Relevanz sind die Typen HPV-16 und HPV-18, die für einen Großteil der HPV-assoziierten Tumoren verantwortlich sind. Das Virus produziert Onkoproteine wie E6 und E7, welche Tumorsuppressoren wie p53 und Rb inaktivieren, ferner wird die virale DNA in das Genom infizierter Zellen integriert [42]. Es folgt ein unkontrolliertes Wachstum der Zellen, genetische Instabilität und letztlich Bildung von Tumoren.

Humane Papillomaviren (HPV) sind ein maßgeblicher Risikofaktor für die Entwicklung einer spezifischen Untergruppe von Kopf-Hals-Tumoren, insbesondere für das oropharyngeale Plattenepithelkarzinom (OPSCC) [43]. Obgleich klassische Risikofaktoren für Kopf-Hals-Tumoren wie Rauchen und Alkoholkonsum nach wie vor von Relevanz sind, zeigt sich eine Zunahme von Fällen, deren Ätiologie auf eine persistierende HPV-Infektion zurückzuführen ist [35]. Diese Tumoren weisen charakteristische Merkmale auf, darunter eine Lokalisation im Oropharynx, eine bessere Prognose als HPV-negative Tumoren sowie eine stärkere Assoziation mit Lymphknotenmetastasen [44], [45]. Bereits bei der Erstdiagnose lassen sich bei vielen Patientinnen und Patienten klinisch oder mikroskopisch nachweisbare Metastasen in den zervikalen Lymphknoten feststellen [46] [47]. Diese ausgeprägte Metastasierungsneigung wird durch die Modulation des Tumormikromilieus sowie die Aktivität viraler Onkoproteine gefördert [48]. Trotz dieser aggressiven Metastasierungsdynamik zeigen HPV-positive Tumoren eine bessere Ansprechrate auf Strahlen- und Chemotherapie, was mit einer insgesamt günstigeren Prognose einhergeht [49]. Diagnostisch sind bildgebende Verfahren wie PET-CT und MRT von entscheidender Bedeutung zur Detektion von Lymphknotenmetastasen. Zur Bestätigung der HPV-Ätiologie kommen immunhistochemische Marker wie p16 sowie molekulare Tests zum Nachweis von HPV-DNA zum Einsatz [50].

1.2.3.2. Immuntherapeutische Maßnahmen

Die Immuntherapie hat das Potenzial, die Behandlung von Krebserkrankungen grundlegend zu erweitern, indem sie das körpereigene Immunsystem gezielt aktiviert oder moduliert, um Tumorzellen zu bekämpfen [51]. Im Gegensatz zu klassischen Therapiemethoden wie der Chemo- oder Strahlentherapie fördern sie die immunologische Erkennung und Eliminierung von Tumorzellen. Zu den wichtigsten Ansätzen zählen die Blockade von Checkpunkten [18], die Immunmodulation durch Zytokine [20], adaptive Zelltherapien [52] sowie therapeutische Impfstoffe [53].

Ein zentraler Mechanismus ist dabei die Blockade des PD-1/PD-L1-Signalwegs, der normalerweise die T-Zell-Aktivität hemmt und damit eine Tumorflucht vor dem Immunsystem ermöglicht [36]. Checkpoint-Inhibitoren wie der monoklonale Antikörper Nivolumab verhindern diese Hemmung, indem sie die Interaktion zwischen PD-1 und seinen Liganden PD-L1/PD-L2 blockieren. Dies resultiert in der Reaktivierung von T-Zellen und einer verstärkten Immunantwort [18].

Insbesondere bei Kopf-Hals-Tumoren mit rezidivierenden oder metastasierenden Verläufen hat Nivolumab eine signifikante Verlängerung des Überlebens im Vergleich zu Standardtherapien

gezeigt [54] [55] [56]. Die Wirksamkeit ist bei Patienten mit hoher PD-L1-Expression besonders ausgeprägt [55]. Die zielgerichtete Blockade dieses Signalwegs verbessert sowohl die Tumorkontrolle als auch die Lebensqualität der Patientinnen und Patienten.

1.2.4. Präparationsvorgang von Proben in der Pathologie

In die Pathologie werden Gewebeentnahmen aus der Klinik eingesandt. Die Gewebeentnahme wird zunächst in Formalin fixiert, meist 24 Stunden für Operationspräparate. Danach erfolgt die Präparation, mit gezielter Entnahme von Proben zur weiteren Aufarbeitung. Anschließend wird die Probe in den Einbettautomaten gegeben. Dort wird sie entwässert und mit Paraffin geflutet, im Anschluss in einen Paraffinblock gegossen, es resultiert ein formalinfixierter, paraffineingebetteter (FFPE) Gewebeblock. Nach etwa 37 Stunden ist der FFPE-Block schnittbereit am Mikrotom. Dabei werden die meist zwischen 1 - 2 µm dicke Schnitte auf ein Wasserbad überführt, sodass diese sich strecken. Aus dem Wasserbad heraus werden die Schnitte auf Glasobjektträger (OTs) aufgezogen. Dieser Schritt führt zu einer elastischen Verzerrung gegenüber dem übrigen FFPE-Block. Anschließend werden die Schnitte, nachdem sie getrocknet sind, in einem Ofen erhitzt, um die Adhäsion des Gewebeschnittes an das Glas zu verstärken. Das umgebende Paraffin schmilzt häufig bereits an. Danach wird das auf dem Glasobjektträger befindliche Gewebe wieder durch eine absteigende Alkoholreihe hydrophilisiert, um es empfänglich für die nachfolgenden Färbemethoden zu machen. Nach der jeweiligen Färbung wird ein Deckglas aufgesetzt, um das Gewebe zu schützen und die optische Qualität zu verbessern. Anschließend ist es für die Patholog:innen zur Befundung bereit. In vielen Fällen ist ein Nachschnitt der Probe erforderlich. In den meisten Fällen werden nur ca. 0,5 % der Gesamtprobe von Patholog:innen begutachtet, was unvollständige oder gar falsche Diagnosen zur Folge haben kann [5].

In HORUS soll dieser Workflow durch das Einbinden von zerstörungsfreien, hochauflösenden Bildgebungsmethoden ergänzt werden. Dabei wird vor der Erstellung der ersten Schnitte der vorbereitete FFPE-Block mit einem µCT gescannt, um eine präzisere Schnittführung zu ermöglichen, sodass kein Nachschnitt mehr erforderlich ist. Die Nutzung dieser zusätzlichen Bildgebungsmethoden ermöglicht eine verbesserte Präzision bei der Histologie. So könnte bereits nach dem µCT-Scan eine erste grobe Behandlungsempfehlung ausgesprochen und der Schnitt durch die dreidimensionale Darstellung präzise gelenkt werden. Dadurch könnte Material gespart und effizientere diagnostische Entscheidungen getroffen werden.

1.3. Färbemethoden in HORUS

Innerhalb des Projektes wurden an den Geweben verschiedene Färbemethoden durchgeführt. Färbungen von Gewebe dienen in erster Linie dazu, strukturelle Merkmale sichtbar zu machen und bestimmte Komponenten oder Zellen im Gewebe gezielt anzufärben. Diese Färbemethoden ermöglichen es den Patholog:innen, wichtige Informationen über das Gewebe zu erhalten und Diagnosen und Behandlungsempfehlungen abzugeben.

1.3.1. Hämatoxylin-Eosin Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung ist eine der wichtigsten Färbemethoden in der Histologie. Sie besteht aus zwei Schritten: der Hämatoxylin-Färbung und der Eosin-Färbung (s. Abbildung 4).

Hämatoxylin ist üblicherweise in Blauholz enthalten. Es handelt sich dabei um einen farblosen, leicht beigen Stoff, welcher durch Oxidation zu Hämatein oxidiert wird. Dadurch wird die Anwesenheit eines Oxidationsmittels vonnöten, um den gewünschten Färbeeffekt hervorzurufen. Dafür werden in der Regel mehrwertige Kationen verwendet, durch dessen Zugabe sich

Farbstoffkomplexe durch Chelatbildung bilden. Die Kationen sind meist Eisen oder Aluminium, sogenannte Hämalane. Durch die gebildeten Metallkomplexe entsteht der Färbereffekt. Bei der Hämatoxylin-Färbung wird Hämatoxylin als Farbstoff verwendet, der vor allem die Zellkerne und basophilen Strukturen blauviolett anfärbt. Dies ermöglicht die Unterscheidung von differenten Zelltypen und Strukturen im Gewebe. Hämatoxylin fungiert dabei chemisch als basischer Farbstoff und bindet an säurereiche Bestandteile der Zellen [57].

Eosin hingegen ist ein saurer Farbstoff, welcher üblicherweise aus Steinkohle und Teer gewonnen wird. In der Pathologie wird häufig Eosin Y verwendet. Eosin leitet sich grundlegend von Fluorescein ab. Eosin ist ein Triphenylmethanfarbstoff, der basische Bestandteile im Gewebe anfärbt und somit eosinophil wirkende Strukturen wie Zytoplasma und extrazelluläre Komponenten rot bis rosa färbt. Es hat eine tetrazyklische Struktur und enthält zwei hydroxylierte Seitenketten, was seine saure Eigenschaft verleiht [58].

Nachdem das Gewebe geschnitten wurde, wird es an die Objektträger über Erhitzung angebacken. Danach wird das hydrophobe, paraffinierte Material durch eine Alkoholreihe wie Xylol und absteigende Ethanolkonzentrationen wieder hydrophil gemacht, um es für die Färbung zu behandeln. Zunächst erfolgt die Hämatoxylin-Färbung, bei der die Zellkerne blau-violett gefärbt werden. Anschließend wird mit Eosin gegengefärbt, bei dem die Zytoplasmastrukturen rot-violett erscheinen. Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung gibt Aufschluss über die Gewebearchitektur, die Zellmorphologie, die Verteilung von Matrix und Stroma sowie den Differenzierungsgrad von Tumoren [59].

Die HE-Färbung ist eine der häufigsten Färbungen in der pathologischen Diagnostik und stellt den Goldstandard dar. Sie ermöglicht die Darstellung von Zellkernen, Zytoplasma und extrazellulären Strukturen wie Bindegewebe und verknüpft die Stärken beider Einzelfärbungen miteinander.

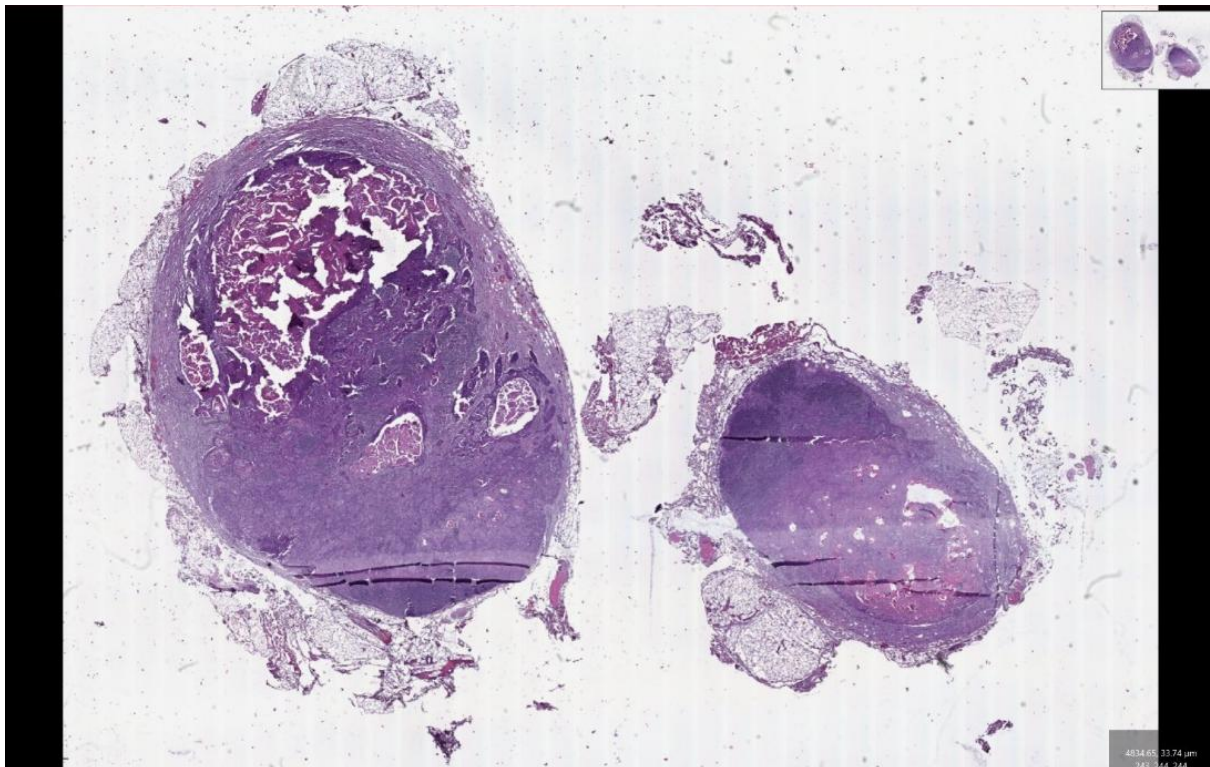


Abbildung 4: Beispielbild eines 1,5 µm dicken und HE-gefärbten Schnittes einer Kopf-Hals-Tumorprobe. Die Probe wurde mit einem 40x Objektiv im Slide Scanner Aperio AT2 der Firma Leica gescannt.

1.3.2. Ethidiumbromid-CFSE Färbung

Weiterhin haben wir in HORUS eine fluoreszente Färbung für die korrespondierende Schnittfläche auf dem FFPE-Block entwickelt. Die fluoreszente Färbung besteht aus den Bestandteilen einer Strukturfärbung über Carboxyfluoresceinsuccinimidylester (CFSE) und einer Zellkernfärbung über Ethidiumbromid (EtBr). Diese Färbemethode wurde gewählt, weil die Eigenschaften von EtBr die Röntgendichte potenziell gewährleisten können, so dass Zellkerne in der μ CT durch fluoreszierende Oberflächenfärbung mit hoher Röntgenabsorption sichtbar gemacht werden könnten.

Ethidiumbromid ist ein Phenanthridin-Derivat, das in die kleine Furche doppelsträngiger DNA-Moleküle interkaliert. Hierbei bindet EtBr aufgrund seiner planaren Struktur. EtBr zeichnet sich durch eine hohe Affinität und Selektivität gegenüber DNA aus. Üblicherweise wird EtBr zur Färbung von Nukleinsäuren eingesetzt, da es unter UV-Licht fluoresziert und somit eine Visualisierung ermöglicht [60]. Die Röntgenabsorption von EtBr könnte für die Kontrastierung der Zellkerne im μ CT-Bild zukünftig gewinnbringend eingesetzt werden. Ethidiumbromid besitzt eine hohe Absorption bei niedrigen Röntgenenergien, was auf die Präsenz schwerer Atome (wie Brom) zurückzuführen ist. Dies macht es geeignet für Anwendungen, bei denen eine hohe Röntgendichte erforderlich ist.

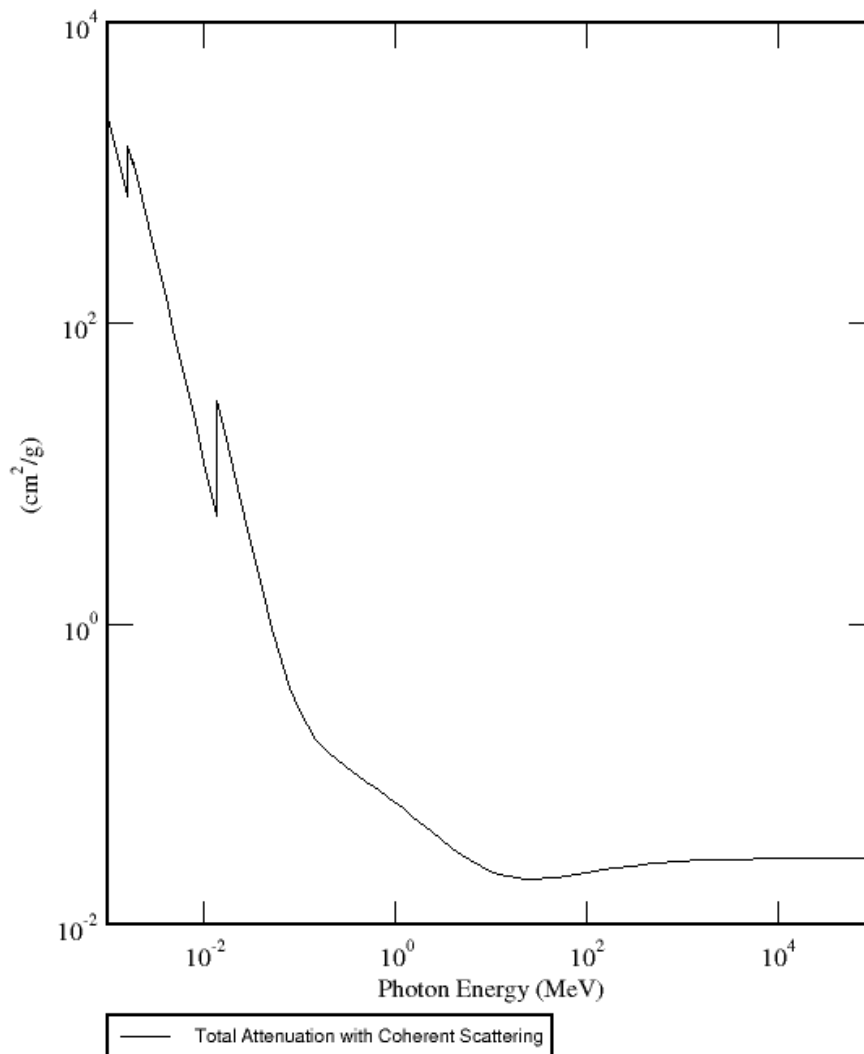


Abbildung 5: Die Kurve stellt die totale Absorption inklusive der kohärenten Streuung von EtBr dar. X-Achse (Photon Energy in MeV): Dies ist die Energie der Photonen in Megaelektronenvolt (MeV). Sie ist logarithmisch skaliert. Y-Achse (cm^2/g): Dies ist der totale Absorptionskoeffizient, ausgedrückt in Quadratcentimetern pro Gramm (cm^2/g). Sie ist ebenfalls logarithmisch skaliert. Der Graph wurde online generiert bei XCOM [61].

Im niedrigen Energiebereich (unter 0,1 MeV) zeigt der Graph eine hohe Absorption (s. Abbildung 5). Das deutet darauf hin, dass Ethidiumbromid in diesem Bereich Photonen stark absorbiert. Dies ist typisch für Substanzen mit schweren Atomen wie Brom, das eine hohe Wahrscheinlichkeit für den Photoelektrischen Effekt hat. Die steilen Abfälle im niedrigen Energiebereich sind charakteristisch für Absorptionskanten. Diese treten auf, wenn die Photonenergie die Bindungsenergie der inneren Elektronen eines Atoms erreicht, was zu einem sprunghaften Anstieg der Absorption führt. Zwischen etwa 0,1 und 10 MeV sinkt die Absorption kontinuierlich. In diesem Bereich dominiert der Compton-Effekt, bei dem Photonen Energie verlieren, indem sie an Elektronen inelastisch streuen. Ab etwa 10 MeV flacht die Kurve ab und zeigt einen relativ konstanten niedrigen Absorptionswert. In diesem Bereich dominiert die Paarbildung, bei der Photonen in der Nähe des Atomkerns ein Elektron-Positron-Paar erzeugen können. Der konstante Wert deutet darauf hin, dass die Wahrscheinlichkeit dieses Prozesses über einen weiten Energiebereich hinweg konstant bleibt.

CFSE ist ein Fluorophor mit gelber Emission beim Anregen mit blauem Licht. Er reagiert mit nukleophilen Gruppen, wie primären Aminen oder Thiolen, welche in Proteinen und

Zellmembranen zu finden sind. Somit können Zellumrisse und extrazelluläre Matrix kontrastreich angefärbt werden [62].

Die Kombination aus EtBr und CFSE stellt eine fluoreszente Oberflächenfärbung des FFPE-Blocks zur Verfügung, die sowohl Zellkerne als auch Zellstrukturen markiert. Mithilfe dieser Färbung ist eine Beschriftung des korrespondierenden Gewebeteils im μ CT möglich.

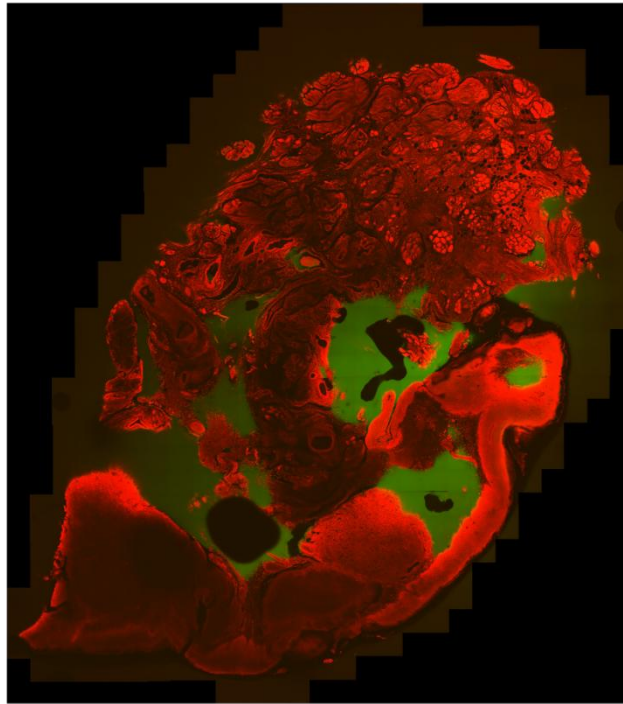


Abbildung 6: Ethidiumbromid-CFSE-Färbung auf der Oberfläche eines FFPE-Blockes mit präpariertem Tonsillengewebe. Für die Aufnahme wurden mehrere Teilscreens mit einem 60x Objektiv mit Wasserimmersion verwendet und schlussendlich zusammengelegt.

1.3.3. Multiplex-Färbungen verschiedener Marker

Multiplex-Färbungen stellen eine Technik dar, welche die simultane Detektion mehrerer Biomarker in einer Probe ermöglicht. Ihr besonderer Wert für die Biomedizin liegt in der Möglichkeit, eine Vielzahl von Proteinen oder anderen molekularen Zielstrukturen gleichzeitig zu untersuchen, wodurch ein tieferes Verständnis zellulärer Prozesse ermöglicht wird [63], [64]. So erlaubt beispielsweise die gleichzeitige Analyse von Immunzellinfiltration, Tumorzellmarkern und Signalwegen in Tumor-Mikroumgebungen ein tiefes Verständnis über das Zusammenspiel verschiedener Zelltypen [65].

Die Heterogenität von Tumoren stellt einen zentralen Aspekt bei der Krebsentwicklung und der Reaktion auf therapeutische Maßnahmen in der Onkologie dar [66]. Durch den Einsatz von Multiplex-Färbungen ist es möglich, die genannten Zelltypen gleichzeitig zu untersuchen, um sowohl Tumorzellen als auch Immunzellen in der Tumormikroumgebung sichtbar zu machen [66]. Dies ermöglicht ein besseres Verständnis der Interaktionen zwischen verschiedenen Zellpopulationen sowie der Reaktion des Immunsystems auf Tumoren. Dies ist insbesondere in der personalisierten Medizin und Immunonkologie von Bedeutung, da die detaillierte Analyse der Immunzellinfiltration im Tumor Aufschluss über das potenzielle Ansprechen auf Immuntherapien wie Checkpoint-Inhibitoren gibt [18], [66].

In der Immunologie ermöglichen Multiplex-Färbungen die Untersuchung von Immunzellpopulationen und ihrer Aktivierungszustände in verschiedenen Geweben [64].

Multiplex-Färbungen ermöglichen die gleichzeitige Analyse dieser Zelltypen und ihrer Interaktionen [64], [66]. Dies erweist sich insbesondere bei der Erforschung von Autoimmunerkrankungen, Infektionskrankheiten sowie bei der Bewertung von Immuntherapien als vorteilhaft, bei denen die Aktivierung oder Unterdrückung spezifischer Immunzellpopulationen eine zentrale Rolle spielt [18].

Im Rahmen des vorliegenden Projekts wurden insgesamt 17 verschiedene, für die Immunologie relevante Marker eingesetzt. Das Oberflächenprotein CD4 wird vornehmlich auf T-Helferzellen exprimiert [67]. Diese Zellen spielen eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung anderer Immunzellen, wie B-Zellen, die Antikörper produzieren, und Makrophagen [67]. Eine Interaktion zwischen CD4 und dem MHC-II-Komplex findet auf antigenpräsentierenden Zellen statt. Ein Verlust von CD4-Zellen, wie er bei HIV-Infizierten beobachtet wird, führt zu einer Beeinträchtigung der immunologischen Antwort [67]. CD8 wird auf zytotoxischen T-Zellen exprimiert, welche die Aufgabe haben, infizierte oder entartete Zellen zu erkennen und zu zerstören [68]. Diese Zellen spielen eine wesentliche Rolle bei der Kontrolle von Virusinfektionen und Tumorzellen [68].

CD3 ist ein essenzieller Oberflächenmarker, der auf allen T-Zellen exprimiert wird und eine zentrale Rolle bei der Signaltransduktion der T-Zellen spielt [69]. Es ist ein Proteinkomplex, der aus mehreren Untereinheiten besteht, darunter CD3 γ , CD3 δ und CD3 ϵ . Diese Untereinheiten sind Bestandteil des T-Zell-Rezeptor-Komplexes (TCR), der für die Erkennung von Antigenen verantwortlich ist, die von MHC-Molekülen (Major Histocompatibility Complex) präsentiert werden. Der TCR erkennt Antigene spezifisch, besitzt aber keine intrinsische Fähigkeit zur Signalübertragung [70]. Nach der Antigenerkennung durch den TCR leiten CD3-Moleküle, die intrazelluläre ITAMs (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs) enthalten, Aktivierungssignale in das Zellinnere weiter. Dies führt zur Aktivierung von Signalkaskaden, die für die Proliferation, Differenzierung und Effektorfunktion der T-Zellen essenziell sind [69], [70].

PD-1/CD279 ist ein inhibitorischer Rezeptor auf T-Zellen, welcher durch Bindung an PD-L1 oder PD-L2 die Aktivierung von T-Zellen hemmt und somit die Immunantwort dämpft [71]. Dies dient dem Schutz des Organismus vor überschießenden Reaktionen, wird jedoch häufig von Tumorzellen genutzt, um einer Erkennung durch das Immunsystem zu entgehen [71].

CD20 ist ein Oberflächenmolekül, welches auf B-Zellen exprimiert wird und an deren Aktivierung beteiligt ist [72]. Es stellt ein Ziel für therapeutische Antikörper wie Rituximab dar, welche bei der Behandlung von B-Zell-Lymphomen und Autoimmunerkrankungen zum Einsatz kommen [72]. CD79a stellt einen Bestandteil des B-Zell-Rezeptorkomplexes dar und ist an der Aktivierung von B-Zellen beteiligt [73]. Des Weiteren findet der Marker Anwendung in der Diagnostik von B-Zell-Lymphomen. PD-L1/CD274 fungiert als Ligand für PD-1 und ermöglicht Tumorzellen, sich der Immunüberwachung zu entziehen. Therapeutische Ansätze zielen darauf ab, diese Interaktion zu blockieren, um eine Verstärkung der T-Zell-Aktivität gegen Tumoren zu erreichen [73].

CD68 ist ein Marker für Makrophagen, deren Funktion in der Phagozytose von Pathogenen und Zelltrümmern besteht [74]. Der Nachweis dieser Zellen in Gewebeproben erfolgt häufig unter Verwendung des genannten Markers, insbesondere in der Tumorphathologie und bei entzündlichen Erkrankungen [74]. FoxP3 ist ein Transkriptionsfaktor, der in regulatorischen T-Zellen (Tregs) exprimiert wird [75]. Diese Zellen unterdrücken übermäßige Immunreaktionen und verhindern die Entwicklung von Autoimmunität. Eine Veränderung des FoxP3-Gens kann zu einer Reihe von schwerwiegenden Autoimmunerkrankungen führen [75].

Tbet ist ein Transkriptionsfaktor, dessen Funktion in der Steuerung der Differenzierung von Th1-Zellen liegt [76]. Diese Zellen sind von essenzieller Bedeutung für die Abwehr von intrazellulären

Pathogenen, wie Viren, und spielen zudem eine Rolle bei der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen [76]. CD163 hingegen fungiert als Marker für M2-Makrophagen, die antiinflammatorische Funktionen aufweisen und eine Rolle bei der Auflösung von Entzündungen spielen [77].

Der Marker CD138 ist ein spezifisches Merkmal von Plasmazellen und Epithelien und findet daher häufig Anwendung in der Diagnose von Plasmazellmyelomen [78]. CD31 ist ein Zelladhäsionsmolekül, welches auf Endothelzellen sowie einigen Immunzellen vorkommt [79]. Des Weiteren ist es an der Transmigration von Leukozyten durch das Endothel beteiligt und wird als Marker für Gefäßendothelzellen verwendet [79]. CD34 stellt einen Marker für hämatopoetische Stammzellen dar, welcher zur Identifizierung und Isolation dieser Zellen, beispielsweise im Kontext der Stammzelltransplantation, zum Einsatz kommt [80].

Der Antikörper Pan-Cytokeratin ist in der Lage, verschiedene Cytokeratine zu erkennen, die ihrerseits in epithelialen Zellen vorkommen [81], [82]. In der Pathologie finden diese Marker Anwendung bei der Identifikation epithelialer Tumoren [81], [82].

LAG-3/CD223 stellt einen inhibitorischen Rezeptor auf T-Zellen dar, welcher deren Aktivierung hemmt [83]. Es stellt ein potenzielles Ziel in der Immuntherapie dar, da eine Blockade desselben eine Verstärkung der Immunantwort gegen Tumore zur Folge haben könnte [83]. TIM-3/CD366 stellt einen weiteren inhibitorischen Rezeptor dar, welcher die Immunantwort reguliert und in der Tumormikroumgebung von Interesse ist, da er bei der Erschöpfung von T-Zellen in der Tumormikroumgebung eine Rolle spielt [84].

1.4. Mikroskopische Methoden in HORUS

Neben der Volumenbildgebung mittels μ CT kommen im HORUS-Projekt konventionelle oberflächenmikroskopische Verfahren zum Einsatz, um zusätzliche Informationen über die Gewebeproben zu gewinnen [85], [86].

1.4.1. Lichtmikroskopie

Die Lichtmikroskopie zählt zu den zentralen Methoden in der Pathologie [87]. Sie ermöglicht die hochauflösende Darstellung von Zellen und Gewebestrukturen und bleibt bis heute das wichtigste Diagnosewerkzeug für Patholog:innen. Mit verschiedenen Färbetechniken, wie der Hämatoxylin-Eosin-Färbung, lassen sich Gewebe kontrastreich darstellen. Immunhistochemische Färbungen zeigen zusätzlich die Verteilung molekularer Marker [88] [87].

Ein Lichtmikroskop nutzt das Prinzip der Lichtbrechung: Licht wird durch einen Kondensor auf die Probe gelenkt, durchläuft diese und wird vom Objektiv vergrößert abgebildet. Unterschiede in Brechungsindex, Absorption und Streuung erzeugen Kontraste. Die numerische Apertur (NA) beschreibt die Fähigkeit eines Objektivs, Licht zu sammeln und Details aufzulösen. Sie beeinflusst zusammen mit der Lichtwellenlänge die Abbesche Auflösungsgrenze [89]. Dies bedeutet im mathematischen Kontext folgendes:

$$a = \frac{1,22}{2} * \frac{\lambda}{NA} = 0,61 * \frac{\lambda}{n * \sin \theta}$$

Zur Kontraststeigerung kommen Methoden wie Hellefeld-, Phasenkontrast- oder Differentieller Interferenzkontrast (DIC) zum Einsatz. Diese ermöglichen eine verbesserte Darstellung spezifischer Gewebeeigenschaften.

1.4.2. Aufnahmen der histologischen Schnittpräparate mittels Slide Scanner

Slide Scanner wandeln mikroskopische Präparate in hochauflösende digitale Bilder um („Whole Slide Imaging“). Sie bestehen aus einem Lichtmikroskop mit hochauflösender Kamera und präziser Objektischsteuerung. Die Proben werden zeilenweise gescannt und die Einzelbilder zu einem nahtlosen Gesamtbild zusammengesetzt [90].

Digitale Slides erlauben die Betrachtung unter verschiedenen Vergrößerungen, den einfachen Datenaustausch und die Fernbefundung [91]. Moderne Geräte ermöglichen hohe Scangeschwindigkeiten und unterstützen automatisierte Workflows [92], [93].

1.4.3. Multiplex-Bildgebung von FFPE-Schnittpräparaten

Die Multiplex-Bildgebung erlaubt die gleichzeitige Visualisierung mehrerer Proteine in Gewebeproben [94], [95].

Sie basiert auf dem Einsatz spezifischer Antikörper, die durch Fluorophore markiert sind und an Zielantigene binden [96], [97]. Dabei werden Signale verstärkt, z. B. durch sekundäre Antikörper oder die Tyramid-Signalverstärkung (TSA) [98], [99].

Die Bildaufnahme erfolgt meist mittels Fluoreszenz- oder konfokaler Mikroskopie. Zur Trennung überlappender Emissionsspektren verschiedener Fluorophore wird eine spektrale Entmischung durchgeführt [100] [95].

Im Projekt kommt das MACSima™ Imaging System von Miltenyi Biotec zum Einsatz. Es kombiniert Färbung und Bildgebung in einem automatisierten Workflow und nutzt das REAffinity™-System für wiederholbare Färbungen [101]. Durch sequentielle Inkubation und Entfernung von Antikörpern sind Analysen zahlreicher Proteinmarker innerhalb einer einzigen Probe möglich – ohne Signalüberlagerung [101], [102].

1.4.4. Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Diese Technik ermöglicht optische Schnittbilder mit hoher Auflösung. Eine zentrale Komponente ist die Lochblende, die nur Licht aus der Fokusebene durchlässt. Die Anregung erfolgt durch Laser, die Fluorophore zur Emission bringen [103].

Das emittierte Licht durchläuft eine konfokale Apertur, die Streulicht aus anderen Ebenen unterdrückt, wodurch Bildkontrast und Auflösung verbessert werden [100], [103].

Durch punktwises Abscannen der Probe entstehen hochauflösende Bilder, die sich zu 3D-Rekonstruktionen zusammensetzen lassen.

1.4.5. Oberflächenscans der entparaffinierten FFPE-Blockoberflächen

Zur besseren Rückführung 2D-Bildinformationen auf die 3D-Gewebestrukturen wurden im Projekt 3D-Laserscanningmikroskopie-Scans entparaffinierter FFPE-Blockoberflächen durchgeführt [104]. Die Technik kombiniert Lasertriangulation und konfokale Mikroskopie zur präzisen Höhenmessung.

Ein fokussierter Laserpunkt wird auf die Oberfläche projiziert, die Reflektion analysiert, und daraus die Höheninformation berechnet [105].

Die resultierenden 3D-Höhenkarten erlauben eine exakte Zuordnung der x-, y- und z-Koordinaten. Vertikale Auflösungen im Nanometerbereich und hohe Scan-Geschwindigkeit ermöglichen die automatisierte Analyse auch größerer Probenareale [106].

1.5. Zerstörungs- und markierungsfreie Bildgebungsmethoden

In der medizinischen Bildgebung sind zerstörungsfreie Methoden wie die Computertomographie (CT) und die Magnetresonanztomographie (MRT) von großer Bedeutung. Diese Methoden ermöglichen es, detaillierte Bilder des Körperinneren zu erstellen, ohne dass der Patient invasiven Eingriffen unterzogen werden muss. Allerdings können diese Methoden ebenfalls für biologische und medizinische Proben verwendet werden, um die Proben zerstörungs- und markierungsfrei von innen betrachten zu können.

1.5.1. Mikro-Computertomographie

Die Mikro-Computertomographie (μ CT) ist eine hochauflösende Variante der Computertomographie, die es ermöglicht, kleine Strukturen und Gewebe in höchster Detailgenauigkeit darzustellen. Anwendung findet die Methode normalerweise in der Materialforschung, der Paläontologie und der präklinischen Forschung [107].

Die Mikro-CT funktioniert nach demselben Prinzip wie die klinische CT, wobei jedoch anstelle eines Ganzkörper-Scanners ein Gerät mit deutlich kleineren Dimensionen verwendet wird. Der zu untersuchende Probenhalter wird langsam durch einen feinen Röntgenstrahl gefahren, wobei eine Vielzahl von Projektionen aufgenommen werden. Aus diesen Projektionen wird dann rechnerisch ein dreidimensionales Bild der Probe rekonstruiert [107].

Ein typisches Anwendungsgebiet der Mikro-CT ist die Bildgebung von biologischen Proben, wie zum Beispiel kleine Tiere, Organteile oder einzelne Zellen. Durch die zerstörungsfreie, hochauflösende Darstellung können so wertvolle Informationen über die innere Struktur und Morphologie gewonnen werden, ohne dass die Probe dafür präpariert oder gar zerstört werden muss [108].

Ein μ CT-System besteht aus einer Röntgenquelle, welche eine Energie zwischen 20 und 150 keV aufweisen kann [108]. Sie erzeugt Röntgenstrahlung durch die Beschleunigung von Elektronen auf ein Metallziel. Zudem besitzt ein μ CT-Gerät einen Probenhalter, der die Probe während des Scans in den Strahlengang positioniert und sie während des Scanvorgangs dreht. Weiterhin gibt es einen Detektor im Gerät, der die Intensität der durch die Probe hindurchgehenden Röntgenstrahlung misst. Dieser wandelt die durchdringenden und auf ihn treffenden Röntgenstrahlen in Grauwerte um. Aus diesen können Bilder rekonstruiert werden [108]. Dichtes Material, wie Knochen oder Metall, absorbiert mehr Strahlung und erscheint auf den aufgenommenen Bildern dunkler, während weniger dichtes Material, wie Gewebe oder Kunststoff, weniger Strahlung absorbiert und heller dargestellt wird [109].

Der Detektor erfasst die abgeschwächten Röntgenstrahlen, die durch die Probe hindurchtreten [109], und erstellt dabei viele 2D-Projektionsbilder aus verschiedenen Winkeln. Die aufgenommenen 2D-Projektionsbilder werden mithilfe von Rekonstruktionsalgorithmen, wie der gefilterten Rückprojektion, zu einem 3D-Bild zusammengesetzt. Jedes Volumenpixel (Voxel) im 3D-Bild repräsentiert die Röntgendichte des entsprechenden Bereichs der Probe. Diese volumetrische Rekonstruktion ermöglicht es, die innere Struktur der Probe in hoher räumlicher Auflösung zu visualisieren. Die Bildqualität eines μ CT-Scanners hängt von verschiedenen Faktoren ab, darunter die Auflösung des Detektors, die Größe der Röntgenquelle und die

geometrische Vergrößerung. Typische μ CT-Scanner bieten eine räumliche Auflösung zwischen 2 μ m und 50 μ m.

Das Phasenkontrast- μ CT ist eine Technik, die es ermöglicht, die inneren Strukturen eines Objekts mit hoher Auflösung darzustellen, insbesondere wenn die Materialien schwache Absorptionseigenschaften haben, wie Weichgewebe [110]. Phasenkontrast- μ CT nutzt die Änderung der Phasen der Röntgenstrahlen, die durch das Objekt hindurchgehen. Wenn Röntgenstrahlen ein Objekt passieren, werden sie nicht nur abgeschwächt, sondern ihre Phase wird ebenfalls verändert. Diese Phasenverschiebung wird von der Dichte und dem Brechungsindex des Materials beeinflusst [111]. Während bei der normalen Absorptionsbildgebung nur die Intensitätsunterschiede erfasst werden, detektiert der Phasenkontrast- μ CT auch diese Phasenverschiebungen. Dazu verwendet das System spezielle Detektoren oder Interferometrien, um die Phasenänderungen sichtbar zu machen [112].

Der Vorteil des Phasenkontrasts besteht darin, dass er auch feine Strukturen und Materialübergänge darstellen kann, die in der klassischen Röntgenbildgebung schwer zu erkennen sind [110]. Besonders nützlich ist das Verfahren in der Biologie und Medizin, da es weiche Materialien, wie Gewebe, ohne die Notwendigkeit von Kontrastmitteln sichtbar machen kann.

Für HORUS wurden FFPE-Blöcke mittels eines Absorptions- μ CT-Geräts des Fraunhofer Ernst-Mach-Instituts (EMI) und mittels eines Phasenkontrast- μ CT der Firma Exciscope (im Auftrag von Fraunhofer EMI) untersucht.

1.5.2. Synchrotron-Bildgebung

Synchrotron-Bildgebung ermöglicht eine noch höhere räumliche Auflösung und detailliertere 3D Rekonstruktion. Hierbei wird anstelle einer konventionellen Röntgenquelle ein Synchrotronstrahl verwendet. Synchrotronstrahlung entsteht, wenn Elektronen mit nahezu Lichtgeschwindigkeit durch ein Magnetfeld gelenkt werden. Diese Strahlung ist extrem intensiv, kohärent und hat ein breites Energiespektrum, was sie ideal für verschiedene Bildgebungsverfahren macht [111], [113]. Die Bestandteile eines Synchrotrons sind Hilfskomponenten wie Biegemagnete und Einfügevorrückungen in Speicherringen, und freie Elektronenlaser werden verwendet, um hochenergetische Elektronen zur Aussendung von Photonen anzuregen [114] (s. Abbildung 7).

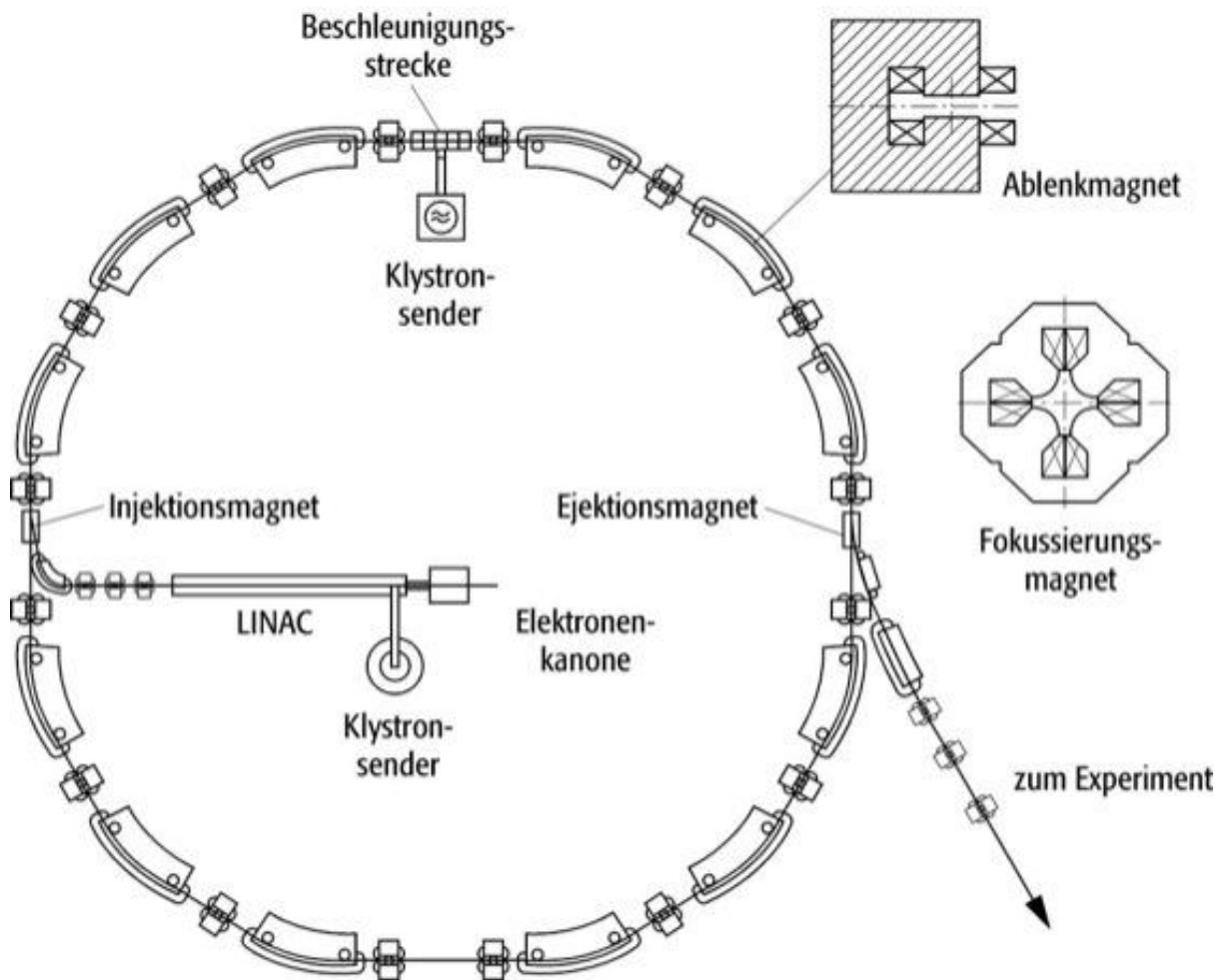


Abbildung 7: Schematischer Aufbau eines Elektronensynchrotrons. Im Zentrum befindet sich der Linearbeschleuniger (LINAC), der die Elektronen von der Elektronenkanone beschleunigt und sie über den Injektionsmagneten in den Synchrotronring einspeist. Der Ring besteht aus mehreren Beschleunigungsstrecken und wird von Klystron-Sendern angetrieben. Fokussierungsmagnete und Ablenkmagnete sorgen für die Stabilisierung und Umlenkung des Elektronenstrahls im Ring. Sobald die Elektronen die gewünschte Energie erreicht haben, werden sie über den Ejektionsmagneten zum Experiment geleitet. Abbildung verändert nach Spektrum.de.

Die erzeugte Strahlung wird durch Kollimatoren und Filter geleitet, um einen speziell abgestimmten Strahl zu erzeugen. Diese Strahlung kann ein breites Energiespektrum umfassen, von ultravioletter Licht bis zu harter Röntgenstrahlung. Der Strahl wird auf das zu untersuchende Objekt gerichtet. Die Strahlung durchdringt das Objekt und interagiert mit dessen Materie, wobei sie je nach Material unterschiedlich abgeschwächt oder gestreut wird. Hinter dem Objekt befindet sich ein Detektor, der die Strahlung aufzeichnet, die das Objekt durchdringt. Moderne Detektoren sind oft digitale Systeme, die hochauflösende Bilder in Echtzeit erzeugen können [114]. Die gesammelten Daten werden mithilfe von Computeralgorithmen verarbeitet, um detaillierte Bilder zu erstellen. Diese Bilder können verschiedene Informationen über die innere Struktur des Objekts liefern, einschließlich Dichteverteilungen und Materialzusammensetzungen.

Im Projekt HORUS haben wir ergänzend zu den hochauflösenden μ CT-Bilddaten ebenfalls Synchrotron Radiographie-Verfahren eingesetzt, um zusätzliche Informationen über die Probe zu erhalten. Diese Methode ermöglicht es uns, feinere Details im Inneren der Probe zu erfassen und damit eine genauere Strukturannotation durchzuführen, um diese auf die schlechter aufgelösten μ CT-Bilddaten zur Weiterverarbeitung zu übertragen.

1.6. Annotation und Strukturerkennung von histopathologischen Strukturen

Zu Beginn wurden histopathologische Details in einem Lastenheft (s. Anhang) festgehalten, um festzulegen, welche Strukturen im μ CT-Datensatz erkannt werden müssen, um eine vergleichbare Qualität der histopathologischen Analyse zu gewährleisten.

1.6.1. Software zur Annotation und Segmentierung

Innerhalb des Projektes wurden verschiedene Software-Werkzeuge zur Annotation und Segmentierung der hochauflösenden 3D-Bilddaten und den 2D-HE-Slidescans eingesetzt.

Zunächst wurde eine μ CT-Sichtungssoftware verwendet, um die 3D-Datensätze zu visualisieren, zu navigieren und eine erste manuelle Annotation durchzuführen. Diese Software wurde uns von unseren Kooperations- und Projektpartnern von der ImFusion GmbH zur Verfügung gestellt.

Nach den ersten μ CT-Aufnahmen wurden zudem HE-Schnitte und von diesen 2D-HE-Slidescans unserer Gewebeproben erstellt. Diese wurden mit der Open-Source Software QuPath [115] annotiert und segmentiert.

Die Ergebnisse dieser manuellen Annotation und Segmentierung wurden anschließend genutzt, um supervised Machine Learning Algorithmen im Bereich der Bildsegmentierung zu trainieren.

1.6.1.1. QuPath

QuPath ist eine frei verfügbare, offene Software-Plattform für die digitale Bildanalyse, insbesondere für die quantitative Bildanalyse in den Lebenswissenschaften. QuPath wurde speziell für die Analyse von histologischen Gewebeschnitten entwickelt, bietet aber auch Funktionen für die Analyse von Zellkulturen, Mikroskopaufnahmen und andere Bildtypen [116].

Die Software unterstützt eine Vielzahl an Funktionen wie die Visualisierung und Navigation durch digitale Pathologie-Slides, Annotationen und Segmentierungen von Objekten wie Zellen oder Gewebebereichen sowie fortgeschrittene Bildanalysefunktionen wie z.B. die Quantifizierung von immunhistochemischen Färbungen [116], [117].

QuPath wurde von Forschenden der Queen's University Belfast entwickelt und steht unter der GNU General Public License v3. zur freien Nutzung zur Verfügung [116].

Die Annotation der HE-Schnitte lief mithilfe von QuPath folgendermaßen ab: Zunächst wurden die Slides digital eingescannt und als high-resolution svs-Bilddateien in QuPath geladen. Dann wurden die relevanten histologischen Strukturen wie Gewebe, Zellen oder Gewebearten manuell mit Hilfe von Zeichenwerkzeugen markiert und annotiert. Die einzelnen Annotationen wurden dann mittels Zellzählung ausgewertet. Diese Werte wurden in Tabellen überführt und miteinander verglichen.

1.6.1.2. ImFusion Labels

Zur Annotation der fluoreszent gefärbten FFPE-Block-Schnittflächen und der dreidimensionalen μ CT-Daten wurde die Software der Kooperationspartner, ImFusion Labels, genutzt. ImFusion Labels ist eine Bildannotations-Software, die es erlaubt, auf 2D- und 3D-Bilddaten manuell Annotationen und Segmentierungen vorzunehmen.

Innerhalb unseres Projektes dienten die erzeugten Annotationen dazu, Trainingssets für machine learning-basierte Segmentierungsmethoden zu erstellen.

Bei den in ImFusion Labels annotierten Daten handelt es sich zunächst um die Daten der fluoreszent gefärbten FFPE-Block-Schnittflächen.

Bei den hochauflösenden dreidimensionalen Bilddaten wurden μ CT-Daten aus einem Phasenkontrast- μ CT der Firma Exciscope und Bilddaten aus einem Synchrotron in ImFusion Labels annotiert.

Die Annotation der fluoreszent gefärbten Blockschnittflächen lief zunächst über manuelle Annotation der Zellkerne ab, um die Grundlage für ein überwachtes Lernverfahren zur automatischen Segmentierung zu schaffen. Auf Grundlage der manuellen Annotation wurde anschließend ein machine learning-basierter Algorithmus trainiert, um die Zellkerne automatisch zu erkennen. Die Zellkerne können so über die unverzerrte fluoreszente Oberflächenfärbung im 3D-Datensatz identifiziert und kartiert werden.

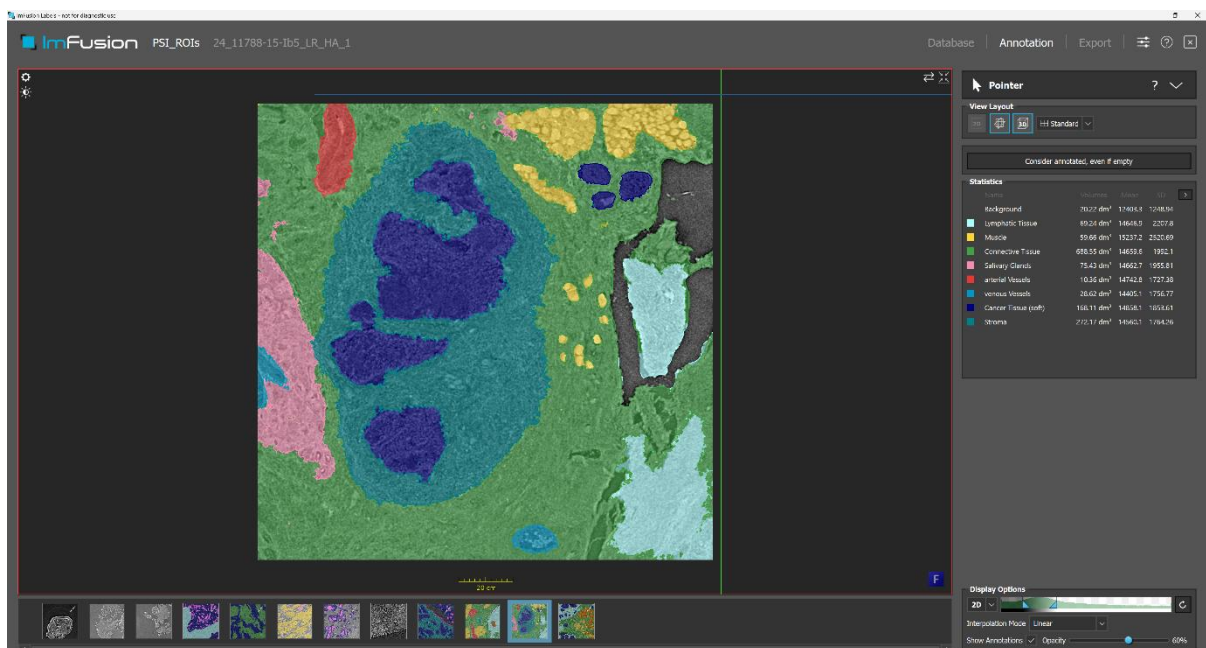


Abbildung 8: Annotierte Tumorprobe in der ImFusion Labels Software. Zu sehen ist der Ausschnitt eines μ CT-Bildes, in welchem die histopathologisch erkennbaren Strukturen mit verschiedenen Markern gekennzeichnet wurden.

Die Annotation der μ CT-Daten lief ähnlich ab. Die Daten wurden allerdings aufgrund der Größe in kleinere Subvolumen aufgeteilt, welche dann einzeln annotiert wurden. Anhand der einzeln annotierten Subvolumen konnten ebenfalls die Bilddaten, welche für das Training des Modells unerlässlich sind, künstlich vermehrt werden, da es nur eine begrenzte Anzahl an μ CT-Scans gibt. Es wurden verschiedene histopathologische Strukturen von Relevanz ausgewählt, die leicht erkennbar im μ CT-Datensatz waren. Dazu gehörten unter anderem Gefäße, Fettzellen, lymphatisches Gewebe mit Keimzentren und Bindegewebe. Diese wurden manuell annotiert, um anschließend als Trainingsdaten für überwachtes maschinelle Lernverfahren zur automatischen Segmentierung dienen zu können. Die Annotation erfolgte über eine Graphen-basierte Segmentierung. Mit Hilfe der graphenbasierten interaktiven Segmentierung ist es nicht notwendig gewesen, jede Ebene einzeln zu annotieren, da die graphenbasierte Segmentierung die Beschriftung vervollständigt, indem sie zunächst einen Graphen aus dem Bild erzeugt, bei dem jedes Pixel ein Knoten ist. Das Gewicht einer Kante ist ein Maß für die Unähnlichkeit zwischen den beiden Pixeln. Dieser Algorithmus findet die Kanten, die den Graphen in mehrere Komponenten aufteilen und somit das Eingabebild segmentieren. Mithilfe dieser Daten wurde ein Deep

Learning-Modell trainiert, um die histologischen Strukturen vollautomatisch in neuen Bilddatensätzen zu segmentieren [118], [119].

1.6.2. Einbindung künstlicher Intelligenz zur Annotation und Ebenenfindung

1.6.2.1. Segmentierungsmodelle

Zur automatisierten Segmentierung anatomischer Strukturen in μ CT-Daten wurde ein U-Net-Modell mit DiceLoss-Optimierung eingesetzt [120]. Die U-Net-Architektur, bestehend aus Encoder und Decoder mit Skip-Verbindungen, ermöglicht eine präzise Lokalisierung von Objekten. DiceLoss verbessert die Modellleistung bei unbalancierten Daten, da es die Überlappung mit den Referenzsegmentierungen misst und kleinste Strukturen gleichwertig berücksichtigt [121].

1.6.2.2. Ebenenfindung

Für die multimodale Registrierung wurden LC2-Metrik, GANs, LNCC und FFD kombiniert. Die LC2-Metrik misst lokale Bildähnlichkeit auch bei intensitätsunterschiedlichen Modalitäten [122] [123] [2], [124].

Ein kleines CNN beschleunigt die Berechnung. GANs, insbesondere CycleGANs, erzeugen realistische Bilder ohne gepaarte Trainingsdaten, sind aber trainingsinstabil [125] [126].

LNCC bewertet die lokale Bildähnlichkeit unabhängig von Helligkeitsschwankungen [127] [128] und dient zur Optimierung der Freiformverformung (FFD), die Bildverzerrungen durch Kontrollpunktverschiebungen modelliert. Diese Methode ermöglicht flexible, lokal begrenzte Verformungen auf Basis von B-Splines [129]. Die Kombination dieser Verfahren erlaubt robuste Segmentierung, präzise Ebenenfindung und effektive Bildregistrierung selbst bei stark variierenden Bildmodalitäten [130].

1.7. Statistische Auswertung von Annotationsdaten und Korrelation mit klinischen Daten

Die Ableitung diagnostischer Prognosen aus den erhobenen Daten erfordert eine statistische Auswertung. Eine Quantifizierung der Daten ermöglicht eine präzisere Einschätzung von Werten wie der Tumordinfiltrationsrate (TIR) sowie des Tumordifferenzierungsgrads.

1.7.1. Statistische Auswertung und Quantifizierung von Annotationsdaten

Die in μ CT-Datensätzen enthaltenen Annotationsdaten liefern wesentliche strukturelle Informationen, beispielsweise hinsichtlich des Tumordifferenzierungsgrads. Die Erhebung dieser Parameter erfolgt typischerweise durch manuelle oder algorithmische Annotation der μ CT-Bilder, wobei sowohl qualitative als auch quantitative Merkmale des Tumorgewebes erfasst werden.

1.7.1.1. Verhältnis von verschiedenen Gewebearten des Tumors

Im Rahmen des histopathologischen Gradings findet das Verhältnis von nicht-verhorntem Tumorgewebe zu verhorntem Tumorgewebe Anwendung, um den Differenzierungsgrad des Tumors zu bestimmen. Diese Information ist relevant für die Einschätzung der Bösartigkeit und des Wachstumsverhaltens des Tumors [131].

Mittels dieses Verhältnisses lassen sich verschiedene Parameter einschätzen. Der so definierte Differenzierungsgrad beschreibt, dass ein höherer Anteil an verhorntem Gewebe mit einer

besseren Differenzierung und einem geringeren Aggressivitätsgrad des Tumors einhergeht. Die Tumoraggressivität lässt sich beschreiben durch einen geringeren Anteil an verhorntem Gewebe, was auf einen aggressiveren Tumor hindeuten kann, der schneller wächst und Metastasen bildet.

Das Verhältnis ist ein entscheidendes Instrument für die Einstufung von Tumoren in eine der vier Grading-Stufen der Ordinalskala (G1 bis G4), wobei G1 gut differenziert und G4 undifferenziert bedeutet [131]. Die Prognose wird beschrieben durch einen höheren Anteil an verhorntem Gewebe, was in der Regel mit einer besseren Prognose assoziiert ist, da gut differenzierte Tumoren tendenziell ein langsames Wachstum aufweisen. Zudem kann die Information der Therapieplanung zugutekommen. Die Kenntnis dieser Faktoren kann bei der Entscheidung über die Intensität der Behandlung von entscheidender Bedeutung sein, da die Behandlung aggressiverer Tumoren oft eine intensivere Therapie erfordert [131], [132].

Zur Bestimmung des Verhältnisses werden hochauflösende μ CT-Datensätze verwendet, die eine detaillierte Analyse der Tumorstruktur ermöglichen. Der Prozess der Berechnung erfolgt in mehreren methodischen Schritten: Zunächst wird der Tumor im μ CT-Datensatz segmentiert, um dessen Gesamtfläche oder Gesamtvolumen zu bestimmen. In einem zweiten Schritt erfolgt die Klassifizierung des Tumorgewebes, wobei durch Annotationen zwischen verhornten und nicht-verhornten Tumoranteilen differenziert wird. Anschließend werden die Volumina in ein Verhältnis zueinander gesetzt. Abschließend wird dieses Verhältnis als Quotient aus den segmentierten Daten bestimmt. Dieser Wert liefert wichtige Informationen über das invasive Potenzial eines Tumors und kann im klinischen Kontext dazu beitragen, die Aggressivität der Erkrankung zu bewerten und Therapieentscheidungen zu unterstützen [133].

$$\text{Verhältnis Tumorgewebearten} = \frac{\text{Volumen des nicht – verhorntem Tumors}}{\text{Gesamtvolumen des Tumors}}$$

Das Verhältnis wurde ebenfalls auf Signifikanz geprüft mittels einer Spearman-Korrelation.

1.7.2. Statistische Auswertung mit RStudio

RStudio ist eine integrierte Entwicklungsumgebung (IDE) für die Programmiersprache R und wird vor allem für statistische Analysen und Datenvisualisierungen eingesetzt [134] [135].

Die Oberfläche gliedert sich in verschiedene Fenster: Im Skriptbereich werden R-Skripte geschrieben, die Konsole zeigt Ausgaben, während das Umgebungsfenster Variablen und Datenrahmen anzeigt. Weitere Fenster bieten Zugriff auf Grafiken, Dateien, Pakete und Hilfsfunktionen [135], [136].

RStudio ermöglicht statistische Modellierungen, Hypothesentests, Datenbereinigung und visuelle Darstellung von Daten. Im vorliegenden Projekt wurden Annotationsdaten in RStudio quantifiziert und statistisch ausgewertet, um KI- und manuelle Annotationen zu vergleichen.

1.7.2.1. Interquartilsbereich-Methode

Die IQR-Methode dient der Identifikation von Ausreißern [137]. Sie basiert auf dem Interquartilsabstand, der die mittleren 50 % der Daten umfasst (Q3–Q1). Werte außerhalb definierter Grenzen gelten als Ausreißer. Die Methode ist robust gegenüber Verteilungen und eignet sich gut zur Datenbereinigung [137].

1.7.2.2. Spearman-Korrelation

Spearman's Rho ist ein nicht-parametrisches Maß für monotone Zusammenhänge zwischen Rangdaten [138]. Die Stärke und Richtung einer monotonen Beziehung, unabhängig davon, ob diese linear ist oder nicht, wird durch dieses Maß ermittelt. Im Gegensatz zur Pearson-Korrelation,

welche die Normalverteilung der Daten erfordert, ist die Spearman-Korrelation robuster gegenüber Ausreißern [138].

Im Gegensatz zur Pearson-Korrelation ist sie unempfindlich gegenüber Ausreißern und setzt keine Normalverteilung voraus. Die Berechnung erfolgt über Rangdifferenzen. Die Korrelation liegt zwischen -1 und $+1$, wobei Signifikanztests über den p-Wert Aufschluss über die Relevanz des Zusammenhangs geben [138].

1.7.2.3. Lineare Regression

Die lineare Regression beschreibt den Zusammenhang zwischen abhängigen und unabhängigen Variablen mittels einer linearen Funktion [139], [140]. In der einfachen Form wird ein Zusammenhang zwischen zwei Variablen modelliert, in der multiplen Regression mehrere Einflussfaktoren berücksichtigt. Die Parameter werden über die Methode der kleinsten Quadrate geschätzt. Zur Modellbewertung dienen Kennzahlen wie das Bestimmtheitsmaß R^2 und p-Werte. Die Methode ist vielseitig einsetzbar – z. B. in der Medizin oder Naturwissenschaft – zur Vorhersage oder Analyse von Einflussfaktoren [139], [140].

2. Material und Methoden

2.1. Material

Die verwendeten Proben wurden aus Patient:innen in der Klinik für Hals-Nasen-Ohren Heilkunde entnommen und uns zur Verfügung gestellt. Die für dieses Projekt verwendeten Proben, wurden erst nach der abgeschlossenen Diagnostik verwendet. Die Patientendaten wurden verblindet, sodass keine Rückschlüsse auf Einzelpersonen gezogen werden können.

2.1.1. Proben der verwendeten Kohorte

Die folgend tabellarisch aufgelisteten Proben wurden für das Projekt verwendet. Aufgelistet sind die Gewebeart und der Probenname. Die Proben durften verwendet werden, dank des Antrags an die Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Medizinische Fakultät mit dem positiv beschiedenen Antrag Nr. 2020-943 vom 3. Juni 2020. Die Tonsillen- und Kopf-Hals-Tumorproben wurde dankenswerterweise von Prof. Dr. Kathrin Scheckenbach aus dem Kopf-Hals-Tumorzentrum und Prof. Dr. Irene Esposito aus dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Düsseldorf zur Verwendung für das Projekt zur Verfügung gestellt.

Tabelle 1: Namen und Gewebearten der Proben, die für das Projekt in den verwendeten Methoden benutzt wurden.

Gewebeart	Probenname
Tonsille	2022_2
Tonsille	2022_3
Tonsille	2022_4
Tonsille	2022_5
Tonsille	2022_6
Tonsille	2022_7
Tonsille	2022_26
Tonsille	2022_47
Tonsille	2022_49
Tonsille	2022_56
Tonsille	2022_75
Tonsille	2022_76
Kopf-Hals Tumor	2023_01_01
Lymphknotenmetastase	2023_01_02
Kopf-Hals Tumor	2023_02_01
Lymphknotenmetastase	2023_02_02
Kopf-Hals Tumor	2023_03_01
Lymphknotenmetastase	2023_03_02
Kopf-Hals Tumor	2023_04_01
Lymphknotenmetastase	2023_04_02
Kopf-Hals Tumor	2023_05_01
Lymphknotenmetastase	2023_05_02
Kopf-Hals Tumor	2023_06_01
Lymphknotenmetastase	2023_06_02
Kopf-Hals Tumor	2023_07_01
Lymphknotenmetastase	2023_07_02
Kopf-Hals Tumor	2023_08_01
Lymphknotenmetastase	2023_08_02
Kopf-Hals Tumor	2023_09_01

Lymphknotenmetastase	2023_09_02
Kopf-Hals Tumor	2023_10_01
Lymphknotenmetastase	2023_10_02
Kopf-Hals Tumor	2023_11_01
Lymphknotenmetastase	2023_11_02
Kopf-Hals Tumor	2023_12_01
Lymphknotenmetastase	2023_12_02
Kopf-Hals Tumor	2023_13_01
Lymphknotenmetastase	2023_13_02
Kopf-Hals Tumor	2023_14_01
Lymphknotenmetastase	2023_14_02
Kopf-Hals Tumor	2023_15_01
Lymphknotenmetastase	2023_15_02

2.1.2. Humane Gewebeproben

Die folgend aufgelisteten Materialien und Gerätschaften wurden für die Fixierung und Einbettung des verwendeten Gewebes verwendet:

Tabelle 2: Verwendete Materialien für die Fixierung und Einbettung des Gewebes. Aufgelistet sind das Material, der Verwendungszweck, der Hersteller, die Katalognummer und die verwendeten Verdünnungen (wenn vorhanden).

Material	Verwendung	Hersteller	Katalognummer	Verwendete Verdünnungen
Formaldehyd 4%, phosphatgepuffert	Fixierung von Gewebe	neoFroxx (Einhausen, Deutschland)	LC-6470.5	4%
Becher	Fixierung und Lagerung von Gewebe	Sarsted (Nümbrecht, Deutschland)	75.9922.711	/
Ethanol	Entwässerung von Gewebe	VWR (Radnor, USA), Fischar (Saarbrücken, Deutschland)	85651.360 (VWR), 715 4102, 701 4064 (Fischar)	100%, 96%, 70%
Xylol	Entwässerung von Gewebe	VWR (Radnor, USA)	28973.363	100%
Paraffin	Paraffinierung des Gewebes, Einbettung	Vogel (Fernwald-Annerod, Deutschland)	1587697	100%
Kassetten	Halterung für eingebettetes Gewebe	Langenbrinck (Emmendingen, Deutschland)	09-0815	/

Tabelle 3: Verwendete Gerätschaften für Fixierung und Einbettung des Gewebes. Aufgelistet sind das Material, der Verwendungszweck, der Hersteller und die Katalognummer.

Gerät	Verwendung	Hersteller	Bezeichnung
Einbettautomat	Entwässerung und Paraffinierung von Gewebe	SLEE (Mainz, Deutschland)	MPS CK, MPS P

Paraffinschmelze	Schmelzen des Paraffins	SLEE (Mainz, Deutschland)	MPS W
Metallkassetten	Form für geschmolzenes Paraffin	Sakura Finetek (Torrance, CA, USA)	Tissue-Tek Paraform
Beschriftungsautomat	Beschriftung der Plastikkassetten	Vogel (Fernwald-Annerod, Deutschland)	Surgipath SCP-2008

2.1.3. Erstellung der histologischen Schnittpräparate

In den untenstehenden Tabellen sind die Materialien und Gerätschaften aufgelistet, welche für die Erstellung der Schnittpräparate von den verwendeten FFPE-Blöcken verwendet wurden. Die histologischen Schnittpräparate wurden angefertigt von Eva Schorn, Paula Straszydlo und Anja Harbecke, die während des Projektes als technische Assistenzen für HORUS angestellt waren.

Tabelle 4: Verwendete Materialien für die Erstellung der histologischen Schnittpräparate. Aufgelistet sind das Material, der Verwendungszweck, der Hersteller, die Katalognummer und die verwendeten Verdünnungen, sowie Inkubationszeit (wenn vorhanden).

Material	Verwendung	Hersteller	Katalognummer	Verwendete Verdünnungen	Inkubationszeit
Glas-Objektträger	Aufziehen der erstellten Schnitte	KliniPath (Amsterdam, Niederlande)	PR-001	/	/
Deckgläser	Abdeckung des Gewebes auf dem OT	VWR (Radnor, USA)	631-0121	/	/
Hämatoxylin	Färbung des Gewebes, Zellkernfärbung	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)	517-28-2	100%	30 Sekunden
Eosin Y	Färbung des Gewebes	Thermo Scientific (Runcorn, UK)	409430250	100%	10 Minuten
Eukitt	Eindeckmedium	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)	<u>25608-33-7</u>	/	/
Prolong Diamond	Eindeckmedium	Thermo Scientific (Runcorn, UK)	P36970	/	/
Fluoromount	Eindeckmedium	Thermo Scientific (Runcorn, UK)	00-4958-02	/	/

Tabelle 5: Verwendete Gerätschaften für die Erstellung der histologischen Schnittpräparate. Aufgelistet sind das Material, der Verwendungszweck, der Hersteller und die Katalognummer.

Gerät	Verwendung	Hersteller	Bezeichnung
Rotationsmikrotom	Anfertigung histologischer Schnitte	SLEE (Mainz, Deutschland)	CUT 5062
Wasserbad	Streckung und Aufziehen der histologischen Schnitte	Lauda (Lauda-Königshofen, Deutschland)	GFL 1083
Ofen	Fixation der histologischen Schnitte auf dem OT	Thermo Scientific (Schwerte, Deutschland)	Heracell 240i
Kühlplatte	Kühlen des FFPE-Blockes vor dem Schneiden	medite	Tissue Cool Plate COP 20
Färbeautomat	Automatisierte HE-Färbung von Schnitten	Sakura Finetek (Torrance, CA, USA)	Tissue-Tek Prisma Plus

Im Rahmen des Projekts wurden histologische Schnittpräparate von 1,5 µm Dicke verwendet.

2.1.4. Erstellung der Multiplex-Schnittpräparate und Multiplex-Färbungen

Die Multiplex-Schnittpräparate wurden genau wie die histologischen Schnittpräparate angefertigt bis zur abgeschlossenen Entparaffinierung durch Xylol. Danach erfolgten die Multiplex-Färbungen bei den Kooperationspartnern von Miltenyi Biotec. Die verwendeten Antikörper und Geräte sind in den nachfolgenden Tabellen gelistet. Die Multiplex-Färbungen wurden von Eva Schorn und Aylin Saßor unter der Aufsicht von José Villacorta Hidalgo bei der Firma Miltenyi Biotec GmbH durchgeführt.

Zusätzlich wurde TEC-Puffer zur Antigen-Demaskierung verwendet, wobei die 1 Liter 10-fache Stammlösung mit einem pH-Wert von 9 aus folgenden Chemikalien hergestellt wurde:

- 2,5 g Trizma-Base (1,25 g / 500 ml)
- 5 g EDTA (Ethylenediaminetetraacetic; 2,5 g / 500 ml)
- 3,2 g tri-Na-Citrat Dihydrat (1,6 g / 500 ml)
- Gelöst in 1000 ml VE-Wasser

Die Analyse der aufgenommenen Bilddaten erfolgte mit der Software MACS® iQ View – Spatial Biology von Miltenyi Biotec.

Tabelle 6: Verwendete Verbrauchsmaterialien, Puffer und Chemikalien für die Multiplex-Färbungen der Tonsillen- und Tumorproben.

Material	Hersteller	Katalognummer
REApIex Immuno-oncology Core Kit, human, FFPE	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)	# 130-136-302

MACSwell™ One, Two Imaging Frames	Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, Deutschland)	# 130-124-673, # 130-124-675
MACSwell HighRes Slide	Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, Deutschland)	# 130-126-799
MACSwell Deepwell Plates	Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, Deutschland)	# 130-126-865
MACSima Running Buffer	Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, Deutschland)	# 130-121-565
MACSwell Sealing Foils	Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, Deutschland)	# 130-126-866

Tabelle 7: Verwendete Gerätschaften für die Multiplex-Färbungen der Tonsillen- und Tumorproben.

Gerät	Verwendung	Hersteller	Bezeichnung
MACSima System	Multiplex-Färbungen und Aufnahme der Bilddaten	Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, Deutschland)	MACSima System 130-121-164

Tabelle 8: Verwendete Antikörper für die Multiplex-Färbungen der Tonsillen- und Tumorproben.

Antikörper	Hersteller	Klon	Verwendete Verdünnungen
CD4	Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, Deutschland)	REA1307	1:50
CD8a	Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, Deutschland)	REA1024	1:50
CD3	Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, Deutschland)	REAL1097	1:50
PD1 / CD279	Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, Deutschland)	REA1165	1:50
CD20	Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, Deutschland)	REAL1069	1:50
CD79a	Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, Deutschland)	REA1142	1:50
PD-L1 / CD274	Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, Deutschland)	REA1308	1:50
CD68	Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, Deutschland)	REA1306	1:50
FoxP3	Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, Deutschland)	REA1253	1:50
T-bet	Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, Deutschland)	REA102	1:50
CD163	Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, Deutschland)	REA1309	1:50
CD138	Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, Deutschland)	REA929	1:50
CD31	Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, Deutschland)	REA1312	1:50

CD34	Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, Deutschland)	REAL487	1:50
CKAE1/3 / Pan-Cytokeratin	Bio-Techne Ltd. (Abingdon, Vereinigtes Königreich)	NBP2-33200PE	1:50
LAG-3 / CD223	Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, Deutschland)	REA351	1:50
TIM-3 / CD366	Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, Deutschland)	REAL818	1:50

2.1.5. Färbung der FFPE-Blockschnittfläche

Die verwendeten Materialien und Gerätschaften für die FFPE-Blockschnittflächenfärbung sind in der untenstehenden Tabelle aufgelistet.

Tabelle 9: Verwendete Materialien für die FFPE-Blockschnittflächenfärbung. Aufgelistet sind das Material, der Verwendungszweck, der Hersteller, die Katalognummer, die verwendeten Verdünnungen und die Inkubationszeit.

Material	Verwendung	Hersteller	Katalognummer	Verwendete Verdünnung	Inkubationszeit
Aceton	Ablösen der Paraffinschuppen auf dem FFPE-Block	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)	1000142511	100%	2 Minuten
Ethidiumbromid	Zellkern-Färbung des Gewebes	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)	2218	1 µg/ml	10 Minuten
CFSE	Strukturfärbung des Gewebes	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)	21888	20 µM	10 Minuten
DAPI	Färbung der Zellkerne	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)	#D9542	1:1000	10 Minuten
SYTOX Deep Red	Färbung der Zellkerne	Thermo Scientific (Schwerte, Deutschland)	S11380, P36987	1:1000	10 Minuten

2.1.6. Bildaufnahmen der histologischen Schnittpräparate

Die erstellten Schnittpräparate wurden digital aufgenommen mit einem Slidescanner der Firma Leica Biosystems (Nussloch, Deutschland). Es handelte sich um das Modell Aperio AT2. Für alle Aufnahmen wurde das 40x Objektiv des Slidescanners verwendet. Die Dateien wurden im svs-Dateiformat mit einer Originalauflösung von 3,954 px/µm gespeichert.

2.1.7. Bildaufnahmen der fluoreszent gefärbten FFPE-Blockschnittfläche

Die fluoreszent gefärbten FFPE-Blockschnittflächen wurden in dem konfokalen Fluoreszenzmikroskop FluoView 3000 der Firma Evident (Tokyo, Japan) aufgenommen. Die Aufnahmen wurden mit einem 60x Objektiv (UPLSAPO 60) mit Wasser als Immersionsflüssigkeit angefertigt. Die numerische Apertur des Objektivs betrug 1,2. Der refraktive Index des Objektivs betrug 1,334. Die Arbeitsdistanz des Objektivs betrug 0,28.

Es wurden mehrere Einzelbilder einer Gesamtprobe angefertigt und anschließend mithilfe der Mikroskop-eigenen Olympus-Software zu einem Bild vereint. Die Lochblendengröße betrug 260 μm .

Das konfokale Fluoreszenzmikroskop gehört zur Einrichtung des an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf ansässigen „Center for Advanced Imaging“ (CAi) und wurde für das Projekt zeitweise gebucht. Die Aufnahmen wurden im oir-Dateiformat (Olympus-eigenes Dateiformat für Bilddaten) mit einer originalen Auflösung von 2,4136 px/ μm gespeichert und später als tiff-Dateien exportiert.

Die verwendeten Einstellungen der genutzten Fluoreszenzkanäle sind in der untenstehenden Tabelle gelistet.

Tabelle 10: Genutzte Fluoreszenzkanäle mit Angabe der Kanalnummer, der Wellenlänge, dem genutzten Fluorophor, der Laserpower und der Detektorspannung für die in der Arbeit verwendeten Bilder.

Kanal	Wellenlänge	Genutztes Fluorophor	Laserpower	Detektorspannung
CH1	405 nm	DAPI	1%	450 V
CH2	488 nm	CFSE	1%	400 V
CH3	561 nm	Ethidiumbromid	2-3%	600 V
CH4	650 nm	SYTOX Deep Red	1%	650 V

2.1.8. Oberflächenscans der FFPE-Blockoberflächen

Die FFPE-Blöcke der Tonsillen-Proben wurden zusätzlich im Fraunhofer EMI mittels des 3D-Laserscanmikroskops VK-X3000 der Firma Keyence (Osaka, Japan) untersucht. Die Auflösung lag bei etwa 0,5 μm . Zur Auswertung der Messdaten wurde die mikroskopeigene Software der Firma Keyence verwendet. Diese Aufnahmen wurden dankenswerterweise von Dr. Sebastian Hess von Fraunhofer EMI durchgeführt.

2.1.9. Aufnahmen der Proben im μCT

Die Tonsillen-Proben und einige der Tumorproben wurden in den μCT -Anlagen Phoenix V|tome|x M von Baker Hughes (Houston, Texas, USA) des Fraunhofer EMI, einem Absorptions- μCT ZEISS Xradia 500 Versa (Oberkochen, Deutschland) der Firma MITOS (München, Deutschland) [141] und einer Phasenkontrast-Röntgenquelle der Firma Exciscope (Kista, Schweden) [142] aufgenommen. In der folgenden Tabelle sind die verwendeten Parameter für die Erstellung der μCT -Aufnahmen. Die genauen Spezifikationen der Geräte bzw. der Messungen sind im Anhang zu finden. Für die Bildrekonstruktion der Absorptions- μCT -Aufnahmen wurde die Software Phoenix Datos|x von Baker Hughes (Houston, Texas, USA) verwendet. Im Fraunhofer EMI wurden zehn Tonsillen-Proben und zwei Tumorproben aufgenommen.

Tabelle 11: Verwendete Parameter für μ CT-Aufnahmen im Fraunhofer EMI.

Gerät	Auflösung bzw. Voxelgröße	Aufnahmezeit	Detektorspannung	Stärke
Phoenix V tome x M	4,9 μ m	10 – 12 Stunden	40 – 50 V	~350 A

Die Aufnahmen der Firma Exciscope dauerten pro FFPE-Block ca. 2 bis 3 Stunden bei einer Spannung von 70 kV und einer Stärke von 187 W der verwendeten Röntgenquelle. Die Aufnahmen wurden mit einer 5x Vergrößerung und einer Voxelgröße von 2,6 μ m angefertigt. Die Bildrekonstruktion erfolgte mit einem Feldkamp-Davis-Kess (FDK)-Algorithmus. Mithilfe des Phasenkontrast wurden vier Tonsillen-Proben aufgenommen.

Absorptions- μ CTs von MITOS wurden mit einem ZEISS Xradia 500 Versa aufgenommen, das mit einer 160-kV-Transmissionsröhre und einem indirekten Detektionssystem aus einem Szintillator mit einer Auflösung von 4 μ m ausgestattet ist. Die Proben wurden 3 Stunden lang in einem μ CT-Gerät gemessen. Die tomografische Rekonstruktion der gewonnenen Daten wurde mit der Software X-AID (MITOS GmbH, Deutschland) durchgeführt. Hier wurden drei Tonsillen-Proben gemessen. Alle μ CT-Aufnahmen wurden unter Auftrag des Fraunhofer EMI von Ralph Langkemper, Mahesh Thalwathethe Gedara und Dr. Stefan Moser durchgeführt.

2.1.10. Aufnahmen der Proben im Synchrotron

Alle für das Projekt verwendeten Tumorproben und die korrespondierenden Metastasen wurden in die Schweiz zum Paul-Scherrer-Institut (PSI) [143] versendet und von der Firma ANAXAM im Synchrotron gemessen. In der folgenden Tabelle sind die verwendeten Parameter für die Erstellung der Synchrotron-Aufnahmen. Für die Bildrekonstruktion wurden die Algorithmen des Propagations-basierten Phasen-Kontrast [144] und der Gridrec Algorithmus [145] verwendet.

Tabelle 12: Verwendete Parameter für Synchrotron-Aufnahmen im PSI und DESY.

Strahlengang	Auflösung bzw. Voxelgröße	Aufnahmezeit	Bildrekonstruktion
TOMCAT SLS	0,325 – 1,625 μ m	30 – 200 ms pro Projektion	Propagation-based phase contrast [144], gridrec algorithm [145]
DESY 2D-Talbot-Array	2,5 μ m	15 bis 20 Min. pro Probe	X-AID Software und Paganin-Phasenerkennung

Weiterhin wurden Synchrotronmessungen im DESY durchgeführt [146]. Die DESY-Aufnahmen wurden mit einer Phasenkontrast- μ CT-Anlage unter Verwendung von 2D-Talbot-Array-Beleuchtungen mit einer Auflösung von 2,5 μ m aufgenommen. Die Messzeit betrug für jede Probe 15 bis 20 Minuten. Die Bilder wurden mit der X-AID-Software rekonstruiert (nach Paganin-Phasenerkennung). In dieser Einrichtung wurden 4 Tonsillen-Proben gemessen.

2.1.11. Annotation der histologischen Schnittpräparate und fluoreszent gefärbten FFPE-Blockoberflächen in QuPath

Nach der Digitalisierung der HE-gefärbten Schnittpräparate und der fluoreszent gefärbten FFPE-Blockoberflächen, wurden diese mit der Software QuPath annotiert [116]. Die Softwareversion

0.5.1 wurde verwendet. Die Annotationen der H&E-Schnitte und der fluoreszent gefärbten Blockschnittflächen wurde dankenswerterweise von Muhannad Al Kallaa durchgeführt.

2.1.12. Annotation der μ CT- und Synchrotron-Aufnahmen in ImFusion Labels

Nach der durch die Kooperationspartner Fraunhofer EMI, ImFusion und ANAXAM durchgeführten Bildrekonstruktion, wurden in der Software ImFusion Labels [147] einzelne ROIs annotiert. Dafür wurde die Softwareversion ImFusion SDK 3.5.0 verwendet.

2.1.13. Statistische Auswertung der Patientendaten mit R

Die Patientendaten der Kohorte der Kopf-Hals-Tumore mit den korrespondierenden Lymphknotenmetastasen wurden auf Geschlecht, Alter, Lebensstatus, HPV-Status, Immuntherapie-Status ausgewertet mit der Software R-Studio. Verwendet wurde die Softwareversion Build 394 2024.09.1.

2.2. Methoden

2.2.1. Präparationsvorgang von Proben in der Pathologie

Das Tonsillengewebe, sowie das Tumorgewebe wurde mindestens über Nacht in 4 % Formaldehyd inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Gewebe dreimal je 5 Minuten in DPBS gewaschen und in aufsteigende Alkoholreihen überführt. Zunächst wurde das Gewebe in 70%igem Ethanol für 45 Minuten inkubiert. Danach wurde das Gewebe für 1 Stunde und 45 Minuten in 96 %igem Ethanol inkubiert. Anschließend wurde das Gewebe 2 Stunden und 45 Minuten lang in 100 %igem Alkohol inkubiert. Der letzte Schritt der Dehydratisierung wird durch eine 2-stündige Inkubation in Xylol eingeleitet. Nachdem das Gewebe dehydriert war, wurde es in Paraffin eingebettet.

2.2.2. Erstellung der histologischen Schnittpräparate

Das in Paraffin eingebettete Gewebe wurde mit dem Rotationsmikrotom CUT 5062 (Slee) geschnitten. Dazu wurden 1,5 μ m dicke Schnitte geschnitten. Anschließend wurden die Schnitte in ein Wasserbad mit einer Temperatur von 46°C überführt. Wenn die Schnitte glatt waren, wurden sie auf KP Silan Druckerobjektträger von Klinipath übertragen. Für den letzten Schritt wurden die Objektträger bei Raumtemperatur über Nacht getrocknet.

2.2.3. HE-Färbung der histologischen Schnittpräparate

Nachdem die Schnitte über Nacht getrocknet wurden, wurden sie im Ofen an die Glasobjektträger angebacken bei einer Temperatur von 65 °C über eine Stunde. Anschließend erfolgt die Entparaffinierung und die Rehydration des Gewebes, gefolgt von den Färbeschritten und dem Eindeckeln. In der folgenden Tabelle ist das Protokoll der HE-Färbung detailliert dargestellt.

Tabelle 13: Arbeitsschritte, benutztes Material und Inkubationszeit der einzelnen Schritte für die HE-Färbung.

Arbeitsschritt	Material	Inkubationszeit
1. Anbacken bei 65 °C	Ofen	1 Stunde
2. Entparaffinierung	Xylol	20 Minuten
3. Rehydrierende absteigende Alkoholreihe	Ethanol (100%, 96%, 70%)	Jeweils 5 Minuten
4. Rehydration	Destilliertes Wasser	2 Minuten

5. Eosinfärbung	Eosin Y	10 Minuten
6. Waschen	Leitungswasser	1 Minute
7. Kerngegenfärbung	Hämatoxylin	30 Sekunden
8. Waschen	Leitungswasser	Ca. 2 Minuten
9. Dehydrierende aufsteigende Alkoholreihe	Ethanol (70%, 96%, 100%)	Je eine Minute
10. Dehydration	Xylol	2 Minuten
11. Eindeckeln mit Deckgläschen	Eukitt, Deckgläschen	/

Die mit H&E gefärbten, histologischen Schnittpräparate wurden dankenswerterweise von der technischen Assistenz Eva Schorn angefertigt.

2.2.4. Multiplex-Färbungen der Tonsillen- und Tumorproben mit MACSima

Bereits abgenommene Schnittpräparate der Proben wurden bei der Firma Miltenyi Biotech mithilfe des MACSima Gerätes Multiplex gefärbt. Dazu wurden die Schnitte vor Ort entparaffiniert, genau wie die histologischen Schnittpräparate und anschließend in das MACSima Gerät gegeben. Das Gerät führte dann über mehrere Tage folgende Schritte (s. Tabelle 14) in einem iterativen Prozess durch, bis alle Antikörper gefärbt wurden. Die Bildaufnahmen erfolgten ebenfalls direkt im Gerät. Anschließend wurde mittels der Software MACS® iQ View – Spatial Biology von Miltenyi Biotech die Bildanalyse durchgeführt. Das detaillierte Durchführungsprotokoll findet sich im Anhang.

Tabelle 14: Arbeitsschritte zur Aufnahme der Multiplex-Färbung der Schnittpräparate.

Arbeitsschritt	Material	Inkubationszeit
1. Entparaffinierung der Schnitte	s. Tabelle 13, Schritte 2 bis 4	~30 Minuten
2. Antigen-Demaskierung	PT-Modul, TEC-Puffer	40 Minuten
3. Proben in MACSWell Imaging Frames überführen	MACSWell Imaging Frames, AutoMACS Puffer	5 Minuten
4. Permeabilisieren der Proben mit 2% BSA	2% BSA in 1x PBS	30 Minuten
5. Waschen der Proben	AutoMACS Puffer	5 Minuten
6. DAPI-Färbung	DAPI, AutoMACS	10 Minuten
7. Waschen der Proben	AutoMACS Puffer	5 Minuten
8. Vorpipettierte Antikörper und Proben in MACSima geben	MACSima Running Buffer, MACSwell Sealing Foils, MACSwell Deepwell Plates, MACSima	30 Minuten
9. Antikörperfärbung der Proben	Jeweiliger Antikörper (s. Tabelle 8) in MACSwell Deepwell Plate	Iterativer Prozess über 3 bis 5 Tage , bis alle Antikörper gefärbt und aufgenommen wurden.
10. Bleichen der Antikörper	Lichtquelle des MACSima	

2.2.5. Fluoreszente Färbung der FFPE-Blockschnittfläche

Nach der Abnahme der Schnittpräparate, die die HE-Färbung durchliefen, wurde die FFPE-Blockoberfläche bearbeitet. Dazu wurde der FFPE-Block zunächst in Aceton inkubiert, um restliche Paraffinschuppen von der Oberfläche zu entfernen und eine Zellschicht freizulegen, damit diese hydrophilisiert wird. Danach folgen Waschschrte und die einzelnen Färbeschritte. Ggf. wird der FFPE-Block anschließend eingedeckelt. In der folgenden Tabelle ist das Protokoll der fluoreszenten FFPE-Blockoberflächenfärbung detailliert dargestellt.

Tabelle 15: Arbeitsschritte, benutztes Material ggf. mit Konzentration und Inkubationszeit der einzelnen Schritte für die fluoreszenten FFPE-Blockoberflächenfärbung.

Arbeitsschritt	Material	Inkubationszeit
1. Inkubation in Aceton	Gefäß	Min. 1 Minute
2. Waschen	Destilliertes Wasser	30 Sekunden
3. Trocknen der Oberfläche		Ca. 2 Minuten
4. Fluoreszente Zellkernfärbung mit EtBr, SYTOX Deep Red oder DAPI	Ethidiumbromid (150 µl mit Konzentration von 1 µg/ml), SYTOX Deep Red (150 µl, 1:1000 Verdünnung), DAPI (150 µl, 1:1000 Verdünnung)	10 Minuten
5. Abpipettieren der Flüssigkeit, Waschen und Trocknen	Destilliertes Wasser	30 Sekunden
6. Fluoreszente Färbung mit CFSE für Hintergrundstrukturen	CFSE (150 µl mit Konzentration von 20 µM)	10 Minuten
7. Abpipettieren der Flüssigkeit, Waschen und Trocknen	Destilliertes Wasser	30 Sekunden
8. Ggf. Eindeckeln	ProLong Diamond, Fluoromount, Deckgläschen	/

2.2.6. Bildaufnahmen der histologischen HE-gefärbten Schnittpräparate

Die HE-gefärbten Schnittpräparate wurden nach den Färbeschritten an einem Slide Scanner des Typs Aperio AT2 aufgenommen. Die Schnitte wurden eingelegt und automatisiert gescannt, nachdem sie benannt wurden und der zu scannende Bereich manuell pro Schnitt eingestellt wurde. Alle Scans wurden mit einer 40x Vergrößerung aufgenommen und die Dateien wurden anschließend im svs-Dateiformat mit einer Auflösung von 3,954 px/µm gespeichert. Anschließend wurden die Scans auf die arbeitsgruppeneigene Festplatte Expansion (Seagate; Fremont, CA, USA) gespeichert. Die Betrachtung und initiale Vermessung erfolgte mit der proprietären Software des Slide Scanners (Aperio ImageScope).

2.2.7. Oberflächenscans der FFPE-Blockoberflächen

Zur Untersuchung der Tonsillen-Proben wurden als Messmethoden ein konfokaler Laser, die Fokusvariation und Weißlichtinterferometrie verwendet. Erhoben wurden Daten zur

Oberflächenbeschaffenheit und zum Oberflächenprofil. Dazu wurde die FFPE-Probe auf den Probentisch des Mikroskops abgelegt, die jeweilige Messmethode ausgewählt und durch den Laser unter einem Objektiv abgetastet. In der Software wurden eine Heatmap, welche die Höhe der Probe angibt, und daraus ein Oberflächenprofil erstellt.

2.2.8. Bildaufnahmen der fluoreszent gefärbten FFPE-Blockschnittflächen

Die fluoreszent gefärbten FFPE-Blockschnittflächen wurden nach der Färbung mit einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop der Firma Evident aufgenommen. Die Proben wurden mit dem Deckglas in Richtung des Objektivs auf den motorisierten Probentisch gelegt. Nach der Adjustierung und Fokuseinstellung, wurde in der Software der zu scannende Bereich mit einer polygonalen Fläche eingegrenzt. Auf der so entstandenen Karte der Probe, wurden drei Felder mit Voreinstellung des Fokus ausgewählt, um den Fokus bei der nicht geraden Oberfläche des FFPE-Blockes zu halten. Danach wurde der Scan gestartet und es wurden alle einzelnen Felder in dem zuvor definierten Bereich gescannt. Zwischen den einzelnen Feldern war immer eine minimale Überlappung (ca. 2 μm) angelegt, damit das Bild sich am Ende zusammenfügen lässt. Für die ausgewählten Marker wurden die Kanäle der Wellenlängen 488 nm und 561 nm verwendet. Die einzeln aufgenommenen Felder wurden nach der Aufnahme von der mikroskopeigenen Software zusammengefügt. Das Gesamtbild wurde zusätzlich zu allen einzelnen Bildern im oir-Dateiformat mit einer Auflösung von 2,4136 px/ μm gespeichert. Die Aufnahmen wurden auf dem Serversystem der Heinrich-Heine-Universität sowie des CAi gespeichert und anschließend auf die arbeitsgruppeneigene Festplatte Expansion zur Weiterverarbeitung überführt.

2.2.9. Aufnahmen der μCT -Daten

Die für das Projekt HORUS verwendeten μCT -Aufnahmen wurden vom Fraunhofer Ernst-Mach-Institut (EMI) durchgeführt. Die FFPE-Blöcke wurden vom Universitätsklinikum Düsseldorf (UKD) postalisch zunächst an das Fraunhofer EMI versendet. Nach der Ankunft wurden die FFPE-Blöcke in das μCT -Gerät Phoenix V|tome|x M einzeln überführt. Die Proben wurden auf einem stabartigem Probenhalter drapiert und für etwa 8 bis 10 Stunden aufgenommen. Gemessen wurde dabei die Absorption der Röntgenstrahlen der Probe, welche anschließend in der Software Phoenix Datos|x zu Bilddaten rekonstruiert wurden.



Abbildung 9: μ CT-Gerät „Phoenix V|tome|x M“ im Fraunhofer EMI. Hinter dem mittleren Fenster ist ein Blick in die Messkammer zu werfen. Rechts steht die dazugehörige PC-Einheit, für die Messeinstellungen.

Einige der Tonsillen-Proben wurden der Firma Exciscope (Schweden) übersandt. Die dortigen Aufnahmen wurden mit einem Phasenkontrast- μ CT aufgenommen. Dort wurden die Proben ebenfalls auf einem stabartigen Probenhalter befestigt und über 2 bis 3 Stunden gemessen. Gemessen wurden die Absorption der Probe, sowie die Phasenveränderung der Röntgenstrahlen. Zur Rekonstruktion der Bilddaten wurde ein FDK-Algorithmus verwendet.

Bei der Firma MITOS (Deutschland) wurden die Proben mit einem weiteren Absorptions- μ CT mit einer 160 kV Transmissionsröhre und einem indirekten Detektorsystem aufgenommen. Die Messung einer Probe nahm etwa 3 Stunden in Anspruch. Die Daten wurden mittels der X-Aid Software (MITOS, Deutschland) rekonstruiert.

2.2.10. Aufnahmen der Synchrotron-Daten

Die Synchrotron-Aufnahmen der Tumorproben erfolgten beim Paul-Scherrer-Institut (PSI) in Villigen, Schweiz. Durchgeführt wurden die Messungen von der Firma ANAXAM. Dabei wurden die Proben ähnlich zur μ CT-Messung auf einem stabartigen Probenhalter befestigt und im Strahlengang TOMCAT des Synchrotrons SLS gemessen. Die Messungen mit der niedrigen Auflösung (1,625 μ m Voxelgröße) wurden mit 2001 bis 3001 Projektionen pro Probe und einer Aufnahmezeit von 30 ms pro Projektion durchgeführt. Die Messungen mit der hohen Auflösung (0,325 μ m Voxelgröße) wurden mit 2001 Projektionen pro Probe und einer Aufnahmezeit von 200 ms pro Projektion aufgenommen.

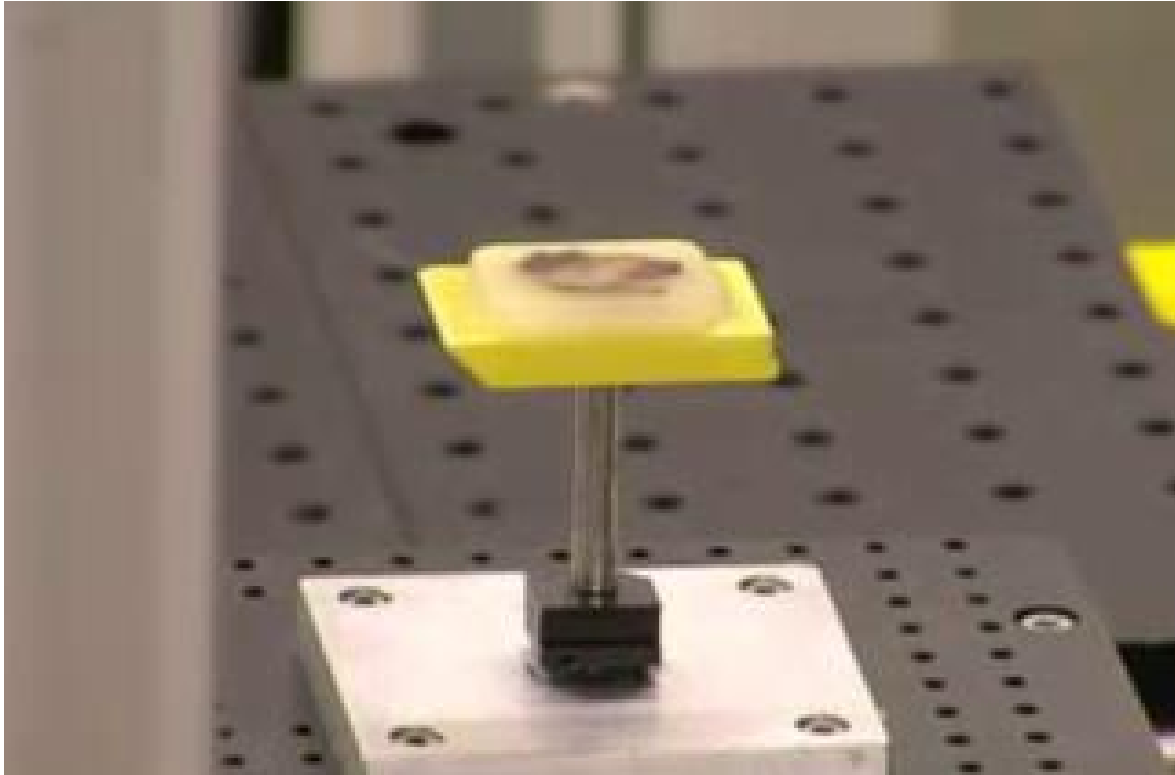


Abbildung 10: FFPE-Block auf dem Probenhalter in der Vorbereitung für die Synchrotron-Messung von ANAXAM im PSI.

Anschließend wurden die Daten mit der „Propagation-based phase contrast“-Methode [144] und dem Gridrec Algorithmus [145] rekonstruiert und auf eine Festplatte der Firma Seagate zur Übergabe gespeichert. Die Daten wurden an die Kooperationspartner von ImFusion übergeben, damit eine Anpassung des Dateiformats auf die Annotationssoftware ImFusion-Labels erfolgen konnte und zusätzlich Region of Interests (ROI) der einzelnen Datensätze zur Annotation erstellt werden konnten.

Zusätzlich wurden Synchrotron-Aufnahmen im DESY von der Firma MITOS durchgeführt. Die Proben wurden erneut auf einem stabartigen Probenhalter befestigt und in einem Phasenkontrast-Setting mit 2D-Talbot-Array-Beleuchtungen [148] im Strahlengang P05 gemessen. Die Messungen dauerten für eine Probe 15 bis 20 Minuten. Die Daten wurden mithilfe der X-AID Software der Firma MITOS rekonstruiert.

2.2.11. Annotation der Bildaufnahmen der histologischen Schnittpräparate

Die svs-Dateien der histologischen Schnittpräparate wurden in die Software „QuPath“ geladen. Dort wurden alle Bildaufnahmen einem QuPath-Projekt zugeordnet und die verschiedenen Gewebestrukturen als Annotationsklassen voreingestellt. Anschließend wurden die Schnittpräparate einzeln annotiert. Die Strukturen der jeweiligen Klassen wurden mit dem Pinsel-Tool markiert und der jeweiligen Gewebestruktur zugeordnet. Anschließend wurden die Daten, welche in den einzelnen Annotationsfeldern gespeichert waren, als Text-Dateien exportiert. Für Übertragungen von Annotationen von H&E-Schnitten auf μ CT-Datensätze wurden annotierte Bilddatensätze verwendet, welche im Rahmen der medizinischen Doktorarbeit von Muhannad Al Kallaa gewonnen wurden.

2.2.12. Annotation der μ CT- und Synchrotron-Daten und Training des KI-Modells

Die als imf-Dateien gespeicherten dreidimensionalen μ CT- bzw. Synchrotron-Daten wurden entweder als gesamte Datei, welche vorher einem Downsampling mit einem Faktor von 4 unterliefen oder als ROI ohne Downsampling in die Software „ImFusion Labels“ geladen.

In der Software wurden ebenfalls Projektdateien mit mehreren Datensätzen erstellt. Die annotierten Daten wurden zur weiteren Verwendung als imf-Dateien gespeichert. Die gleichen Gewebestrukturen, die für die 2D-H&E-Schnitte verwendet wurden, wurden in den 3D-Daten annotiert, soweit möglich. Die Strukturen, die annotiert wurden, waren die folgenden: Keimzentren, lymphatisches Gewebe, Muskeln, Bindegewebe, Plattenepithel, Fettgewebe, Drüsengewebe, arterielle und venöse Gefäße. Bei den Tumorproben wurden zusätzlich der Tumorbereich und das Stroma annotiert.

Aufgrund der Größe der μ CT-Daten wurden die Daten in kleinere Subvolumina unterteilt, die dann einzeln annotiert wurden. Die individuell annotierten Subvolumina wurden auch dazu verwendet, die Bilddaten künstlich zu vergrößern, was für das Training des Modells unerlässlich ist, da nur eine begrenzte Anzahl von μ CT-Scans zur Verfügung steht.

Für das Training des KI-Modells wurden nur die Annotationen des Tumorgewebes und der Gefäße verwendet und alle anderen Gewebe als Hintergrund definiert. Die Annotation wurde mit Hilfe der graphbasierten Segmentierung durchgeführt. Mit diesen Daten wurde das KI-Modell trainiert, um die histologischen Strukturen in neuen Bilddatensätzen vollautomatisch zu segmentieren.

Für das KI-Modell wurden die Modelle U-Net und DiceLoss verwendet. Diese sind Standard-Modelle für das Training von KI-Modellen zur Bildsegmentierung. Dazu wurden die zuvor manuell angefertigten Annotationen als Grund-Wahrheitswerte definiert, welche es zu erreichen gilt. Das Modell wurde auf die einzelnen Proben trainiert. Somit wurden 60% der Daten einer jeden Probe als Trainingsdaten verwendet, 20% einer jeden Probe wurden als Validierungsdaten und 20% einer jeden Probe wurden als Testdaten verwendet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene U-Net- und DiceLoss-Modelle trainiert. Für die Tonsillen-Proben wurden insgesamt 9 Marker, welche zuvor manuell annotiert wurden, vom Modell erkannt. Für die Tumor-Proben wurde sich auf ROIs beschränkt. Basierend auf dem bereits vorhandenen Modell konnte eine verbesserte Erkennung von Tumor zu Nicht-Tumor-Gewebe vorhergesagt werden. Aus diesem Grund wurden lediglich zwei Marker und Hintergrund für das Training des Modells verwendet.

Die mit Exciscope erfassten Phasenkontrast- μ CT-Volumina wurden zum Training des Segmentierungsmodells herangezogen. Die Extraktion der 2D- μ CT-Schichten erfolgt aus den annotierten 3D- μ CT-Volumina, um ein 2D-Segmentierungsmodell zu trainieren. Die Trainingsmenge des ersten Versuchs umfasst 708 Ebenen, während die Validierungs- und Testmenge 94 bzw. 101 Ebenen beinhaltet.

Im Rahmen der Datenvorverarbeitung erfolgt zunächst die Normalisierung der Eingabebilder auf einen Bereich von (0, 1). Anschließend werden die Bilder einer Neuabtastrung mit einem Abstand von 10,4 μ m unterzogen, was einem vierfachen Downsampling entspricht. Die Extraktion zufälliger ROIs mit einer Größe von 256 * 256 Pixeln erfolgt im Rahmen der Sampling-Strategie. Als kombinierter Verlust wird ein Würfelverlust in Kombination mit einem Kreuzentropieverlust verwendet, wobei der Würfelverlust mit einer Gewichtung von 0,2 und der Kreuzentropieverlust mit einer Gewichtung von 1,0 berücksichtigt wird. Die vorhergesagten 2D-Annotationskarten

werden zu einem späteren Zeitpunkt gestapelt, um ein 3D-Annotationskartenvolumen für die weitere Verwendung zu generieren.

2.2.13. Statistische Auswertung der Patientendaten der Kohorte mit R

Die statistische Auswertung der Patientendaten der verwendeten Kohorte wurde mit dem Statistikprogramm R durchgeführt. Dazu wurden die Daten, welche sich zuvor in einer Excel-Tabelle befanden, in das Statistik-Programm geladen und sortiert. Anschließend wurden die notwendigen Daten ausgewählt und graphisch dargestellt.

Es wurde eine deskriptive Statistik angefertigt, in der die Annotationswerte der Volumendaten, sowie den Oberflächendaten der Annotationsvolumina der einzelnen Proben einander gegenübergestellt werden. Weiterhin wurde eine Berechnung des Vergleichs von manueller Annotation zu KI-Annotation durchgeführt. Außerdem konnte das Verhältnis der verschiedenen Gewebearten des Tumors errechnet und graphisch dargestellt werden.

2.2.14. Berechnung der Kreisähnlichkeit von Keimzentren in Tonsillen

Die Berechnung der Kreisähnlichkeit von Keimzentren wurde ebenfalls in der Statistiksoftware R durchgeführt. Zunächst wurden drei Keimzentren im μ CT-Datensatz ausgewählt. Dann wurden drei Ebenen extrahiert. In den Ebenen wurden Fläche und Umfang der Annotation mit diesen Formeln berechnet:

$$\text{Fläche} = A = \pi \cdot r^2$$

$$\text{Umfang} = U = 2 \cdot \pi \cdot r$$

Diese Formeln wurden nach Lustig et al., 2019 [149] anschließend, wie folgt beschrieben umgeformt. Es wurden beide Formeln nach r umgeformt:

$$r_A = \sqrt{\frac{A}{\pi}}$$

$$r_U = \frac{U}{2\pi}$$

Anschließend wurde die Kreisähnlichkeit berechnet, welche mit folgender Formel beschrieben wird:

$$\frac{r_A}{r_U}$$

Ausformuliert sieht die Formel folgendermaßen aus:

$$\frac{\sqrt{\frac{A}{\pi}}}{\frac{U}{2\pi}} \Leftrightarrow \left(\frac{\sqrt{\frac{A}{\pi}}}{\frac{U}{2\pi}} \right)^2 \Leftrightarrow \frac{\frac{A}{\pi}}{\frac{U^2}{4\pi^2}} \Leftrightarrow \frac{A}{\frac{U^2}{4\pi}} \Leftrightarrow \frac{4 \cdot \pi \cdot A}{U^2}$$

Diese Formel wurde anschließend zur Berechnung der Kreisähnlichkeit verwendet:

$$\frac{4 \cdot \pi \cdot A}{U^2}$$

3. Ergebnisse

3.1. Klinische Kohorte der Kopf-Hals-Tumorproben und korrespondierenden Lymphknotenmetastasen

Für HORUS wurde, zusätzlich zu einigen Tonsillen-Proben, eine Kohorte aus Kopf-Hals-Tumorproben und dazugehörigen Lymphknotenmetastasen erhoben, die bereits einer histopathologischen Diagnostik unterzogen wurden. Somit sind bereits klinische Daten vorhanden, welche durch die Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde des Universitätsklinikums Düsseldorf dokumentiert wurden. Diese klinischen Daten wurden von Prof. Kathrin Scheckenbach vom Kopf-Hals-Tumorzentrum des Universitätsklinikums Düsseldorf gesammelt, dokumentiert und für dieses Projekt zur Verfügung gestellt.



Abbildung 11: FFPE-Blöcke der Tumorproben und derer korrespondierenden Lymphknotenmetastasen der erhobenen Kohorte für das Projekt.

In der nachfolgenden Tabelle 16 werden die für das vorliegende Projekt relevanten klinischen Daten aufgeführt. Im Rahmen der Datenerhebung wurden zudem das Geschlecht, der HPV-Status, der Lebensstatus, die Tumorgrading sowie der Immuntherapiestatus der Patient:innen erfasst.

Tabelle 16: Klinische Daten zu den Tumorproben, die für das Projekt verwendet wurden. Gelistet sind die pathologische Fallnummer, Haupttumor, Lymphknotenmetastase, Geschlecht, HPV-Status, Lebensstatus, Immuntherapie und das Tumorgrading.

Haupttumor	Lymphknotenmetastase	Geschlecht	HPV-Status	Lebensstatus	Immuntherapie	Grading

2023_02_01	2023_02_02	Männlich	Positiv	Tot	Nivolumab	G3
2023_04_01	2023_04_02	Weiblich	Negativ	Tot		G2
2023_14_01	2023_14_02	Männlich	Negativ	Tot		G2
2023_12_01	2023_12_02	Weiblich	Negativ	Tot		G2
2023_13_01	2023_13_02	Weiblich	Negativ	Tot		G2
2023_01_01	2023_01_02	Männlich	Positiv	Tot		G3
2023_15_01	2023_15_02	Männlich	Positiv	Lebend		G3
2023_10_01	2023_10_02	Weiblich	Negativ	Tot	Nivolumab	G2
2023_08_01	2023_08_02	Männlich	Negativ	Tot		G2
2023_07_01	2023_07_02	Weiblich	Unbekannt	Lebend		G2
2023_09_01	2023_09_02	Männlich	Positiv	Unbekannt	Nivolumab	G3
2023_06_01	2023_06_02	Weiblich	Negativ	Lebend		G2
2023_05_01	2023_05_02	Männlich	Negativ	Lebend		G2
2023_03_01	2023_03_02	Männlich	Negativ	Lebend		G3
2023_11_01	2023_11_02	Weiblich	Negativ	Tot		G2

3.2. Erfolgreiche Entparaffinierung und oberflächenmikroskopische Aufnahmen der FFPE-Blockoberfläche zur Hydrophilisierung und anschließenden Färbung

Zu Beginn des Projektes wurde die Methode der verzerrungsfreien oberflächlichen Aufnahmen der FFPE-Blöcke etabliert. Der Prozess begann mit der Entparaffinierung der FFPE-Blockoberfläche

und der anschließenden oberflächlichen Färbung des FFPE-Blocks, um diese zugänglich für histopathologische und fluoreszente Färbungen zu machen.

3.2.1. Entparaffinierung mit Aceton und Färbung der FFPE-Blockoberfläche legt eine Zellschicht frei und stellt ebenfalls histopathologisch relevante Strukturen bis 0,4 µm dar

In einem ersten Schritt wurden Vorversuche zur Auflösung von Paraffin zunächst in Analogie zur Entparaffinierung an histologischen Schnittpräparaten durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde Paraffin in 10 ml Gefäße mit Messskala abgefüllt und mit Xylol bedeckt. Das Xylol konnte das Paraffin bis zu einem Sättigungsgrad von 100% lösen. Nachdem dieser erreicht war, löste sich kein weiteres Paraffin mehr, entsprechend war anhand der Messskala keine Änderung des Paraffinspiegels mehr feststellbar. Es wurden nun Glasobjektträger mit dem Überstand betropft, luftgetrocknet und unter dem Mikroskop untersucht (s. Abbildung 12a). Zu sehen sind Ausfällungspräzipitate, welche fest am Objektträger haften und mit 100% Ethanol nicht abspülbar waren. Weiterhin führte auch der unmittelbare Spülversuch des Paraffin-gesättigten Tropfens auf dem OT mit 100% Ethanol zur sofortigen Ausfällung feiner, nadelförmiger Paraffinkristalle, welche fest am OT hafteten (s. Abbildung 12b). Mit Aceton hingegen ließen sich schollige Paraffinstücke vom OT ablösen.

Auf dem FFPE-Block mit Tonsillengewebe führte die Inkubation mit Xylol zur Freilegung mehrerer Gewebsschichten. Um eine Freilegung weniger Zellschichten zu erlangen, wurden verschiedene Alkoholtypen ausprobiert, mit denen zunächst Paraffin ohne Gewebe und anschließend FFPE-Blöcke mit Tonsillengewebe inkubiert wurden. Letztendlich etablierte sich Aceton als geeignete Option im Gegensatz zu Ethanol und Methanol, da dies nur die ganz oberflächliche Paraffinschicht auf der angeschnittenen Blockoberfläche entfernte, ohne weitere Zellschichten freizulegen. Analog dazu führte die Übersichtung von Paraffin im 10 ml Probengefäß mit Aceton zu keiner Änderung des Paraffinspiegels anhand der Messskala (s. Abbildung 13a).

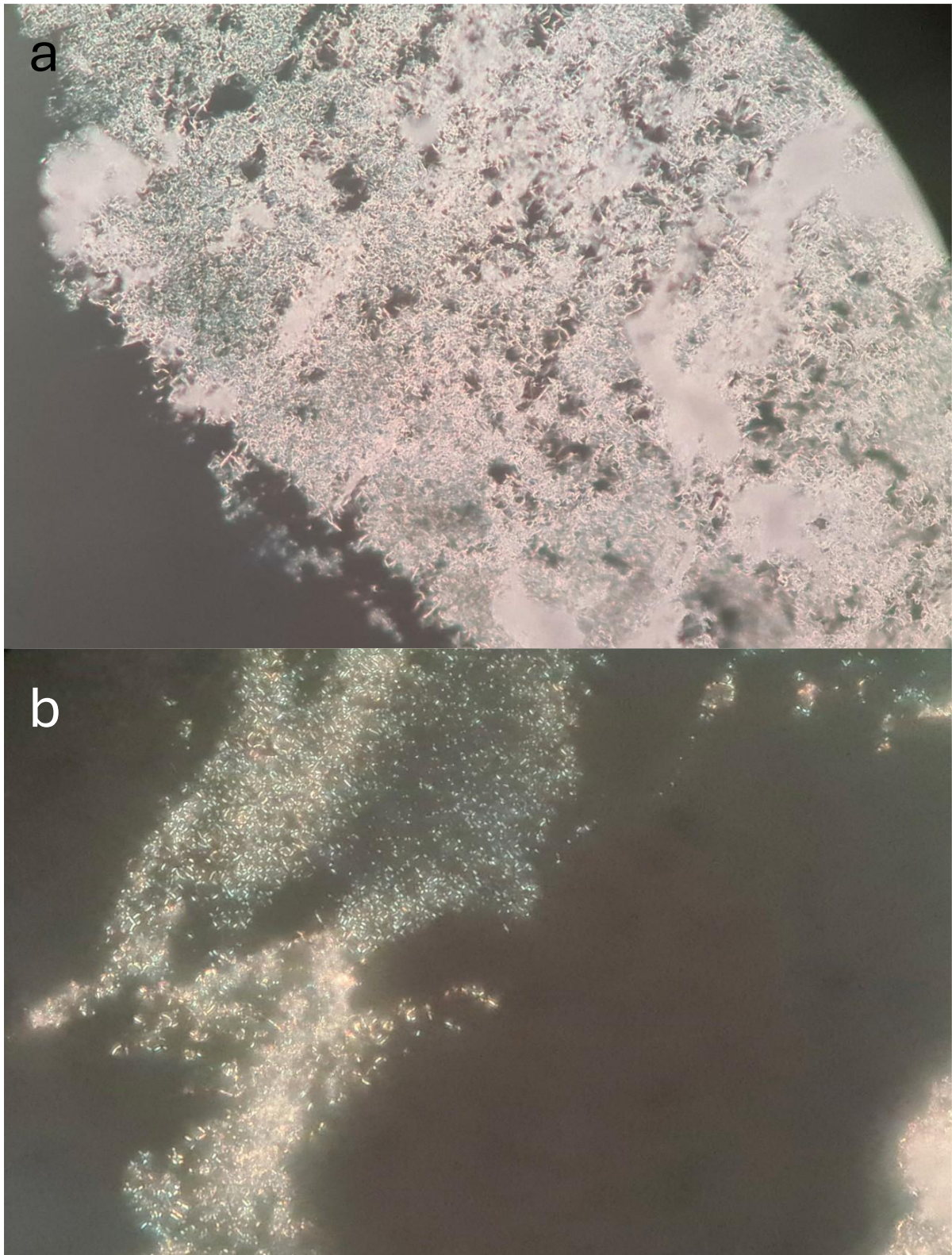


Abbildung 12: Doppelbrechende Paraffinausfällungen auf dem OT. a) Nach Lufttrocknung eines Paraffin-gesättigten Xyloltropfens. b) Xylol wurde mit Paraffin gesättigt, ein Tröpfchen dieser Lösung wurde auf eine Objektivplatte pipettiert, direkt gefolgt von einer Spülung mit 100%igem Ethanol, was zu einer direkten Ausfällung von kleinen doppelbrechenden Paraffin- „Kristallen“ führte. Weitere Spülung mit Ethanol löste die Ausfällungen nicht. 20x Originalvergrößerung für a und b. Die Ergebnisse wurden bereits veröffentlicht [1].

Im Anschluss wurde die Methode an FFPE-Blöcken mit Tonsillengewebe evaluiert. Es konnte beobachtet werden, dass die oberflächlichen Paraffinschuppen nach zwei Minuten in Aceton

abgelöst wurden und die oberste Gewebeschicht mit einer Zellschicht freigelegt wurde, wodurch sie für Färbemethoden empfänglich wurde.

Der erste Färberversuch, der mit Aceton entparaffinierten Oberfläche, wurde mit Hämatoxylin durchgeführt, um die Empfänglichkeit der entparaffinierten Oberfläche für Färbungen im hydrophilen Milieu zu testen. Es konnte nachgewiesen werden, dass das Färbemittel von der entparaffinierten Oberfläche aufgenommen werden kann. Im Rahmen der mikroskopischen Untersuchung konnten Keimzentren identifiziert werden.

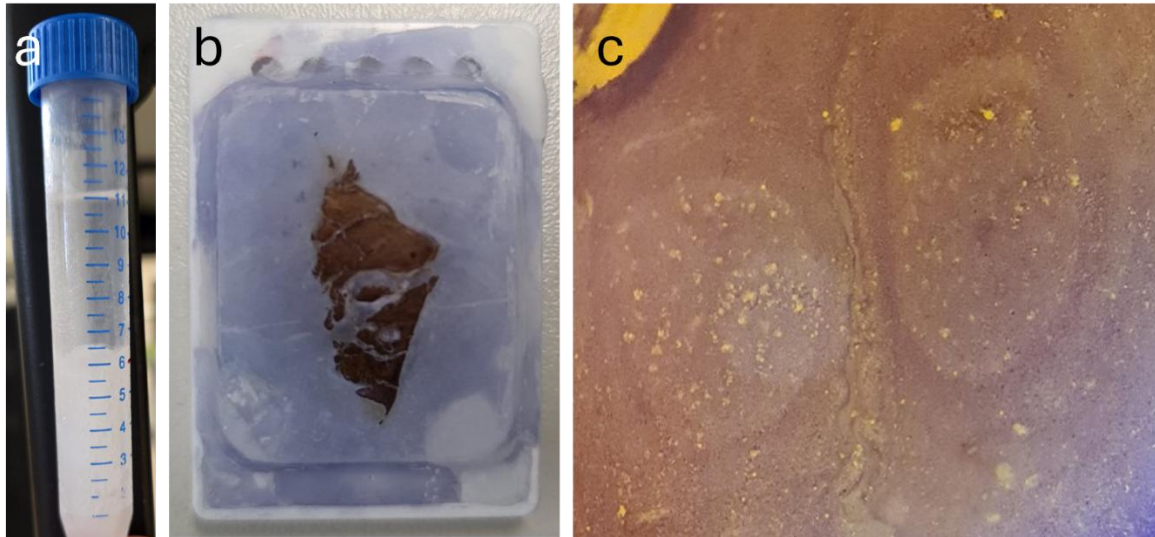


Abbildung 13: (a) Abgefülltes Paraffin bei einer Füllhöhe von etwa 6 ml im Gefäß. Darauf wurde Aceton gegeben, welches über mehrere Tage hinweg inkubiert wurde. Die Füllhöhe des Paraffins hat sich nicht verändert. (b) Erste oberflächliche Färbung eines FFPE-Blockes mit Tonsillengewebe nach Entparaffinierung mit Aceton. Übersichtsaufnahme des gefärbten Blockes. (c) Okularaufnahme mit einem 10x Objektiv der gefärbten Oberfläche. Zu sehen sind Keimzentren innerhalb des lymphatisch aktiven Gewebes.

Nach der erfolgreichen Wiederherstellung der Hydrophilität der entparaffinierten FFPE-Blockoberfläche wurden Ethidiumbromid zur Zellkernfärbung und CFSE zur Strukturfärbung als Marker ausgewählt.

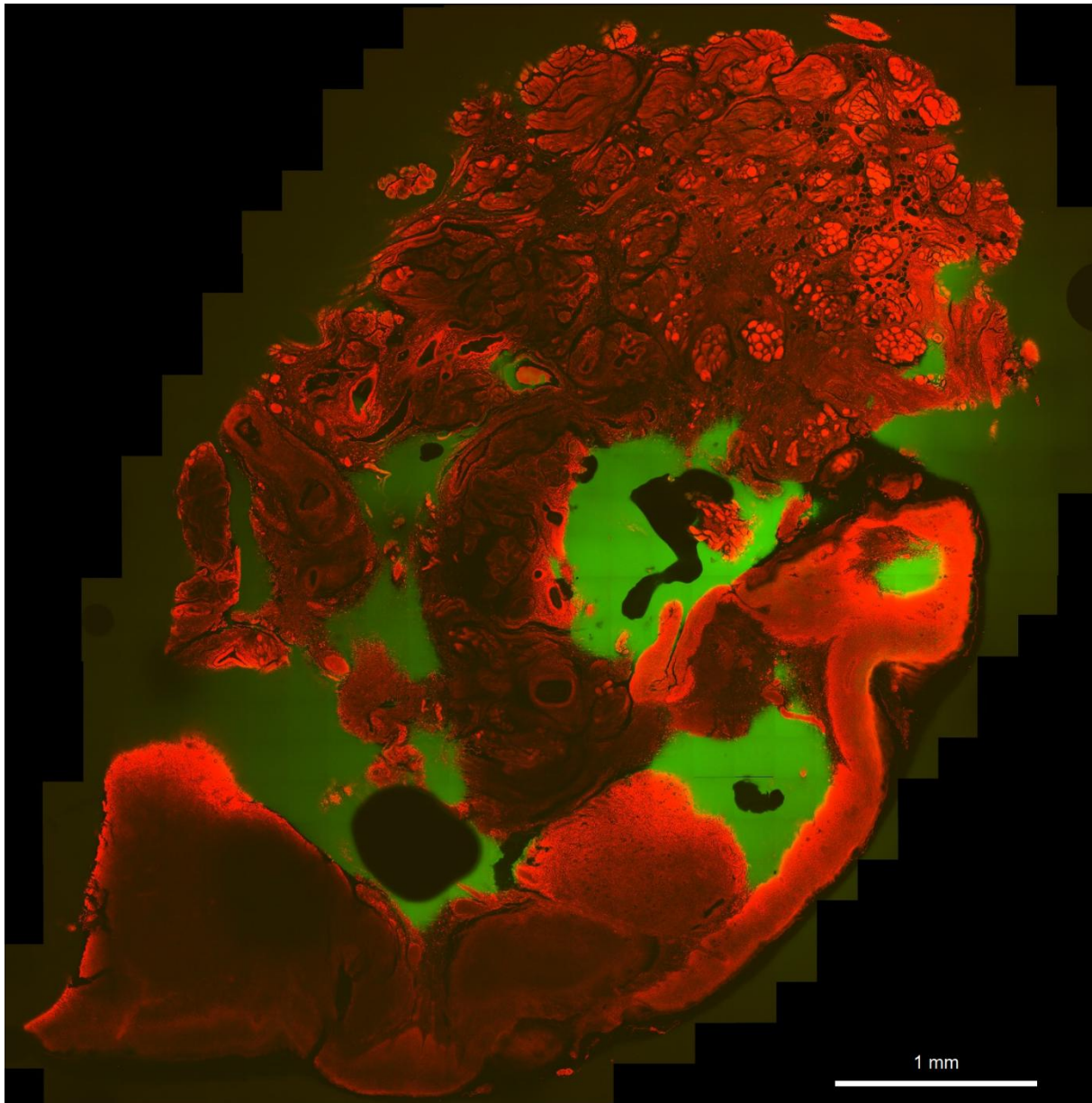


Abbildung 14: Konfokale Fluoreszenzaufnahme einer FFPE-Blockoberfläche (Block Nr. 2022_26), welche entparaffiniert und mit Ethidiumbromid (rot) und CFSE (grün) gefärbt wurde. Die Aufnahme besteht aus mehreren zusammengeführten Einzelbildern, welche mit einem 60x Objektiv mit Wasserimmersion und den Lasern der Wellenlängen 488 nm und 561 nm aufgenommen wurden.

Die mit dem konfokalen Fluoreszenzmikroskop durchgeführten Aufnahmen ermöglichen eine unverzerrte Darstellung der gefärbten Blockoberflächen mit einer vergleichbaren Auflösung wie bei der histologischen Diagnostik. Da nur eine bis maximal zwei Zellschichten bei der Entparaffinierung freigelegt werden, können einzelne Zellen und weitere histopathologisch relevante Strukturen unverzerrt direkt auf der FFPE-Blockoberfläche identifiziert werden.

In der Abbildung 15 sind Abmessungen verschiedener histopathologisch relevanter Strukturen mit denen aus dem konventionellen H&E-Schnitt verglichen. Hierbei ist zu erkennen, dass die gleichen Strukturen im H&E-Schnitt größer erscheinen und gemessen werden, als auf der korrespondierenden FFPE-Blockoberfläche, was für eine Streckung spricht. Dazu konnten mithilfe der fluoreszent-gefärbten Blockschnittfläche und den dazu korrespondierenden HE-Schnitten Messungen verschiedener Strukturen in QuPath gemacht werden, um den Größenunterschied graphisch darzustellen.

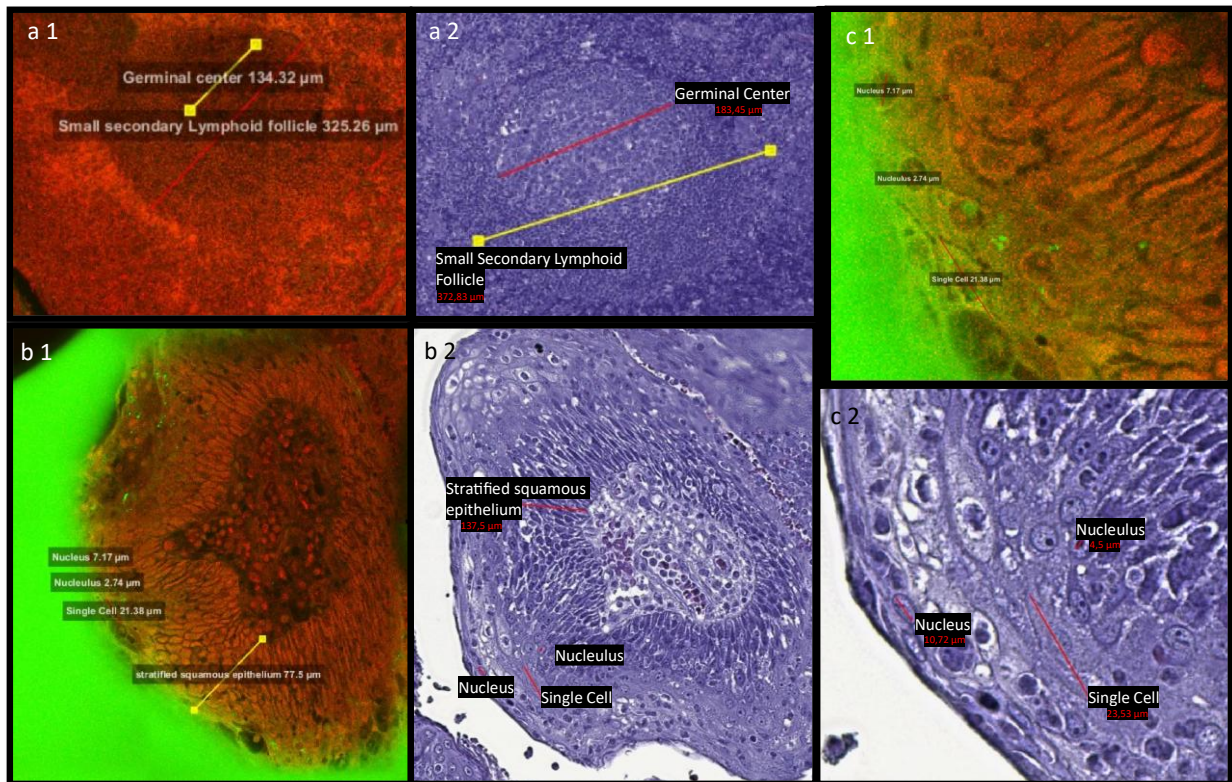


Abbildung 15: Direkter Vergleich der histologisch relevanten Strukturen von der fluoreszent gefärbten Blockschnittfläche zum korrespondierenden H&E-Schnitt. (a) Vergleich eines Keimzentrumsdurchmessers mit dem Durchmesser des gesamten sekundären Lymphfollikels. (b) Vergleich einer Randstruktur mit Plattenepithel. (c) Vergleich einer Struktur von einzelner Zelle, Zellkern und Kernkörperchen.

3.3. Deskriptive Statistik der Annotationsdaten von Tonsillen- und Tumorproben

Auf den folgend dargestellten Annotationsdaten basieren alle weiteren in HORUSkop durchgeführten Untersuchungen. Insgesamt wurden 708 Annotationsebenen in drei Tonsillen und 5100 Annotationsebenen in 17 Tumor-ROIs manuell annotiert. Für eine weitere Analyse wurden fünf ROIs aus den Tumorproben ausgewählt, die über das Tumorgewebe hinaus weitere Gewebe enthielten. Es resultiert eine Stichprobenmenge von 1500 annotierten Ebenen in fünf Tumor-ROIs.

In den Tonsillen-Proben weisen die einzelnen Ebenen einen Abstand von 10,4 µm zueinander auf. Bei den Tonsillen-Proben wurden alle (100%) der für die statistischen Aussagen verwendeten Proben (n = 3) annotiert.

In den Tumor-Proben weisen die einzelnen Ebenen einen Abstand von 6,5 µm zueinander auf. Es handelt sich um ROIs, pro Probe (n = 5) wurden etwa 5% des gesamten Probenvolumens annotiert.

3.3.1. Tonsillen zeigen immunologische Strukturen im Phasenkontrast-µCT-Datensatz

Die Volumendaten zeigen Bindegewebe, Muskelgewebe und lymphatisches Gewebe in den verwendeten Tonsillen (s. Abbildung 16).

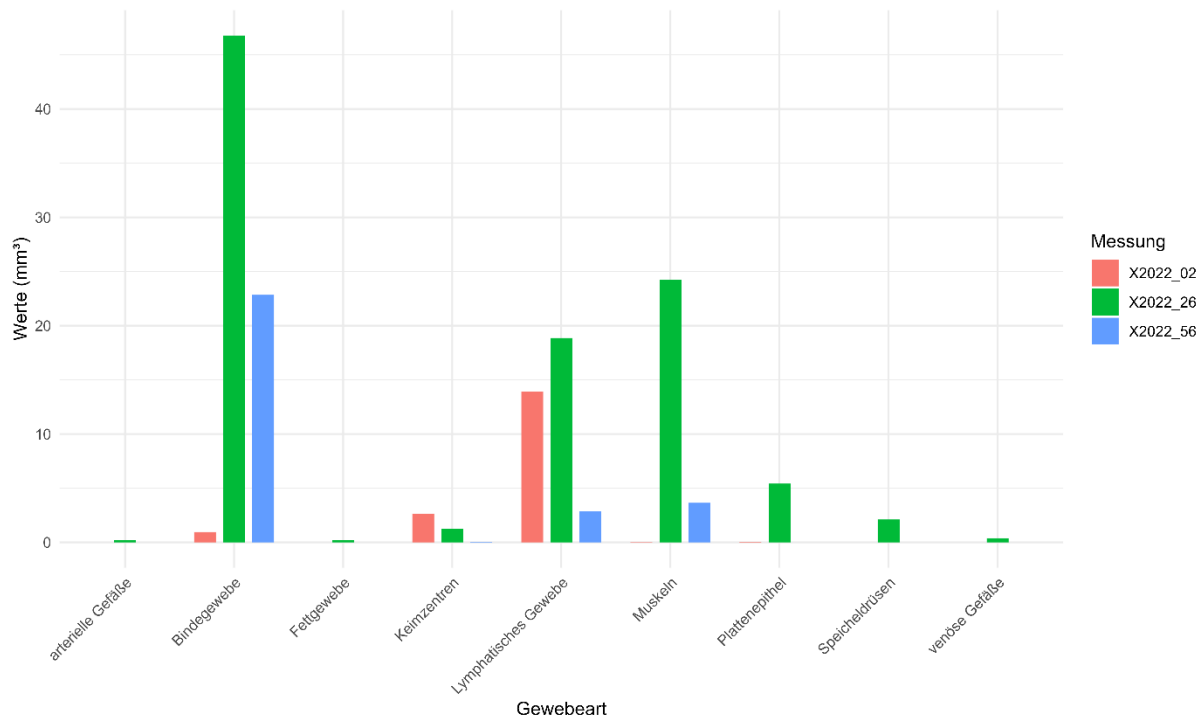


Abbildung 16: Darstellung der Summe der Volumendaten der einzeln annotierten Marker in den drei ($n = 3$) 100% annotierten Tonsillen-Proben. Es wurden insgesamt 708 Ebenen annotiert. Auf der y-Achse sind die Annotationswerte in mm^3 angegeben, auf der x-Achse ist die jeweils annotierte Gewebeart angegeben. Aufgrund der hohen Heterogenität der Proben sind nicht alle Gewebearten in jeder Probe enthalten.

In der nachfolgenden Tabelle sind die Volumenwerte der einzelnen Marker für die Tonsillen-Proben aufgeführt. Aufgrund der Probenheterogenität sind nicht alle Marker in jeder Probe enthalten.

Tabelle 17: Manuell annotierte Volumendaten in mm^3 der Marker in den FFPE-Tonsillen-Proben 2022_26, 2022_56 und 2022_02. Summe aus 708 Annotationsebenen.

Marker/Probe	2022_26	2022_56	2022_02
Hintergrund (Paraffin)	194,63	72,85	86,44
Keimzentren	1,23	0,056	2,65
Lymphatisches Gewebe	18,86	2,88	13,92
Muskeln	24,22	3,64	0,01
Bindegewebe	46,78	22,84	0,96
Plattenepithel	5,41	0	0,06
Fettgewebe	0,19	0	0
Speicheldrüsen	2,11	0	0
arterielle Gefäße	0,18	0	0
venöse Gefäße	0,39	0	0

In Abbildung 16 ist die Summe der Volumina der annotierten Strukturen pro Probe angegeben. Es handelt sich um die in Tabelle 17 aufgelisteten Daten in graphischer Darstellung. Keimzentren sind aufgrund ihrer mikroanatomischen Struktur gut abgrenzbar, wurden in den Annotationen als eigenes Gewebe ohne Schnittmenge mit dem lymphatischen Gewebe behandelt und sind extra annotiert worden.

Probe 2022_26 wurde vollständig annotiert. Das Gesamtvolumen der Annotationen, welches dem Gesamtvolumen der Probe entspricht, betrug 99,38 mm³. Das Bindegewebe nimmt einen Anteil von 47,07 %, die Muskeln einen Anteil von 24,37 % und das lymphatische Gewebe einen Anteil von 18,98 % am Gesamtvolumen ein. Einen geringeren Anteil nehmen Plattenepithel (5,45 %), Speicheldrüsen (2,12 %), Keimzentren (1,24 %), venöse Gefäße (0,39 %), Fettgewebe (0,19 %) und arterielle Gefäße (0,19 %) am Gesamtvolumen von Probe 2022_26 ein.

Probe 2022_02 wurde ebenfalls vollständig annotiert und hatte ein Gesamtvolumen von 17,6 mm³. Den höchsten Anteil am Gesamtvolumen hat lymphatisches Gewebe mit 79,09 %. Es folgen Keimzentren (15,06 %), Bindegewebe (5,46 %), Plattenepithel (0,34 %) und Muskeln (0,06 %).

Probe 2022_56 hatte ein Gesamtvolumen von 29,42 mm³ und wurde vollständig annotiert. Den größten Anteil an dem Gesamtvolumen hatte das Bindegewebe mit 77,63 %. Es folgen Muskeln mit 12,38 %, lymphatisches Gewebe mit 9,79 % und Keimzentren mit 0,19 %.

Die Oberflächen der Annotationsvolumina zeigen ähnliche Ergebnisse zu den Volumendaten, wobei eine leichte Verschiebung der Verhältnisse stattfindet (s. Abbildung 17, Tabelle 18). Keimzentren wurden auch hier als eigenes Gewebe annotiert.

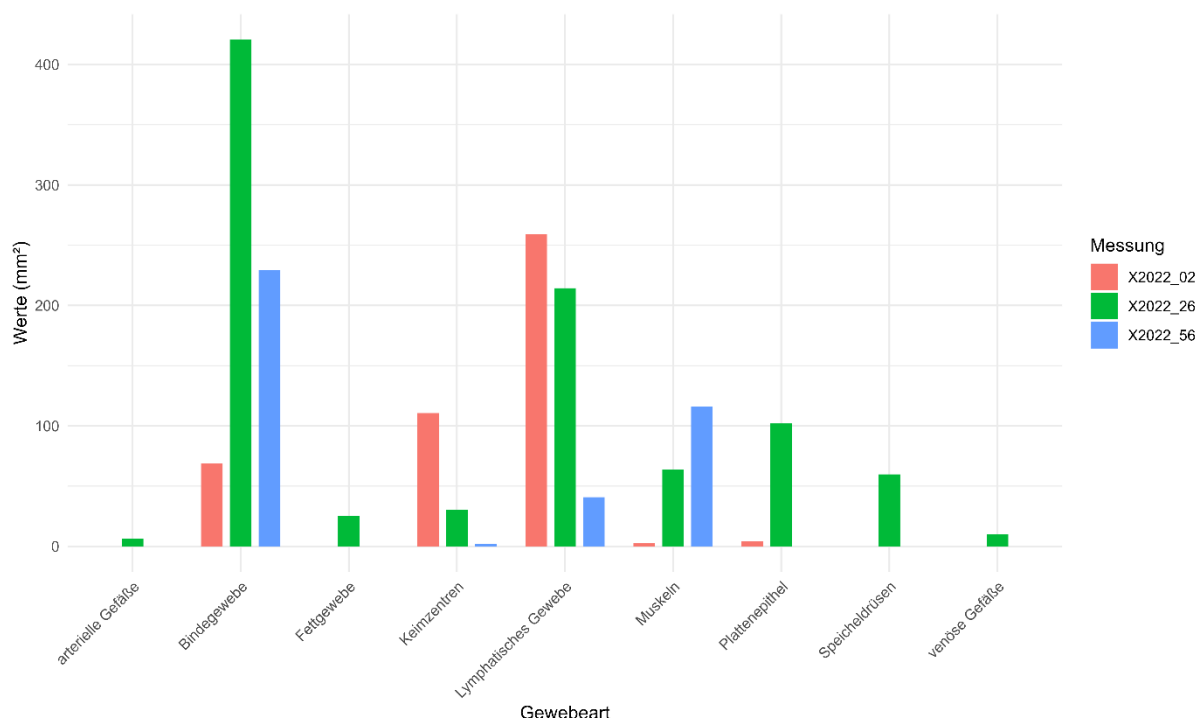


Abbildung 17: Darstellung der Oberflächendaten der Annotationsvolumina der einzelnen Strukturen in den drei (n = 3) vollständig annotierten Tonsillen-Proben als Balkendiagramm. Es wurden insgesamt 708 Ebenen annotiert. Auf der y-Achse sind die Flächenwerte in mm² angegeben, auf der x-Achse ist die jeweils annotierte Gewebeart angegeben. Aufgrund der hohen Heterogenität der Proben sind nicht alle Gewebearten in jeder Probe enthalten.

Tabelle 18: Oberflächendaten der Marker in mm² in den FFPE-Tonsillen-Proben 2022_26, 2022_56 und 2022_02 nach der manuellen Annotation. Summe aus 708 Annotationsebenen.

Marker/Probe	2022_26	2022_56	2022_02
Keimzentren	30,21	1,93	110,62
Lymphatisches Gewebe	214,38	40,83	259,14
Muskeln	63,74	115,92	2,48
Bindegewebe	420,72	229,11	68,68
Plattenepithel	102,01	0	4,38
Fettgewebe	25,39	0	0
Speicheldrüsen	59,72	0	0
arterielle Gefäße	6,63	0	0
venöse Gefäße	10,14	0	0

Die Probe 2022_26 zeigt vor allem Bindegewebe mit 420,72 mm² als größte Oberfläche des annotierten Volumens, gefolgt von lymphatischem Gewebe mit 214,38 mm² und Plattenepithel mit 102,01 mm². In geringerem Maße sind in dieser Probe außerdem Muskeln (63,73 mm²), Speicheldrüsen (59,72 mm²), Keimzentren (30,21 mm²), Fettgewebe (25,39 mm²), venöse Gefäße (10,14 mm²) und arterielle Gefäße (6,63 mm²) vertreten.

In Probe 2022_02 ist das lymphatische Gewebe mit einer Oberfläche von 259,14 mm² das vorherrschende Gewebe. Danach folgen Keimzentren mit 110,62 mm² und Bindegewebe mit 68,68 mm² Oberfläche. Kleinere Oberflächen von zusammenhängenden Annotationsvolumina sind außerdem Plattenepithel (4,38 mm²) und Muskeln (2,48 mm²).

Probe 2022_56 zeigt als größte Annotationsoberfläche ebenfalls das Bindegewebe mit 229,11 mm². Danach folgen Muskelgewebe mit 115,92 mm² und lymphatisches Gewebe mit 40,82 mm² und Keimzentren (1,92 mm²).

3.3.2. Die Tumorproben sind heterogen hinsichtlich des Tumorgehalts und nicht-tumoröser Anteile

Für das Tumorgewebe wurde ebenfalls eine deskriptive Statistik angefertigt, die die in den ROIs angefertigten Annotationen miteinander vergleicht und gegeneinander aufstellt (s. Abbildung 18, Abbildung 19).

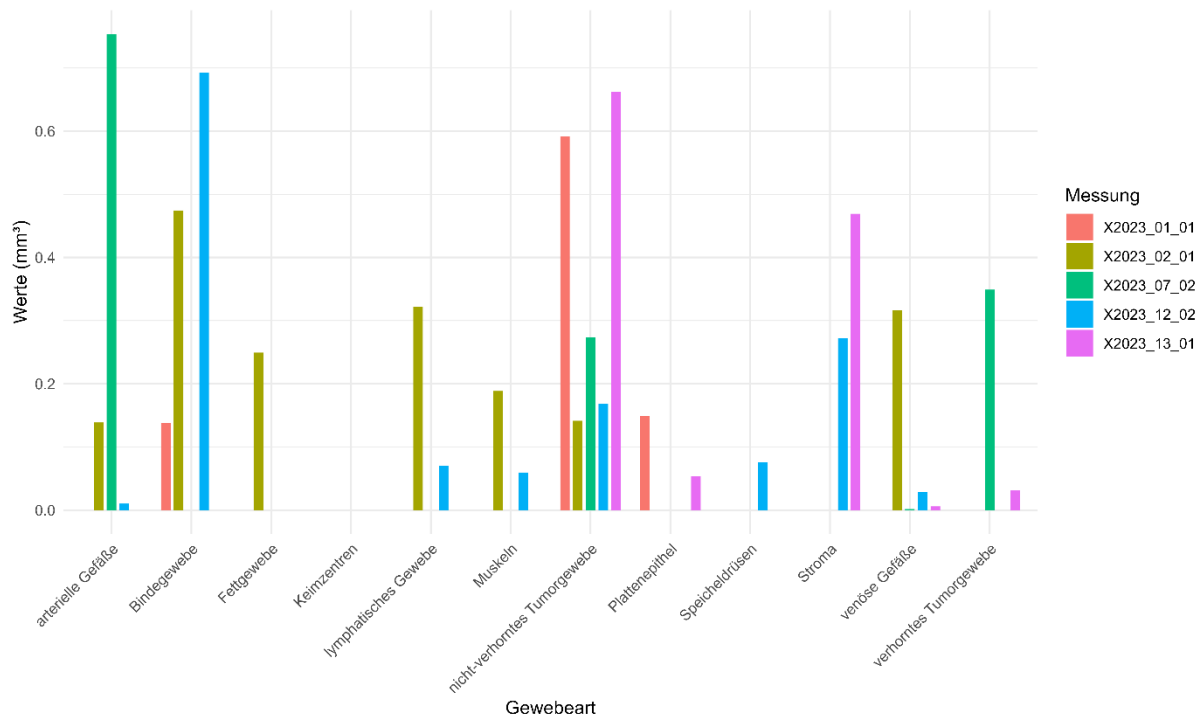


Abbildung 18: Darstellung der Summe der Volumendaten der einzeln annotierten Marker in den fünf ($n = 5$) annotierten ROIs der Kopf-Hals-Tumorproben als Balkendiagramm. Es wurden insgesamt 1500 Annotationsebenen angefertigt. Auf der y-Achse sind die Volumenwerte der Annotationen in mm^3 angegeben, auf der x-Achse ist die jeweils annotierte Gewebeart angegeben.

Die in Abbildung 18 dargestellten Daten beziehen sich auf die in Tabelle 19 gelisteten Daten.

Tabelle 19: Manuell annotierte Volumendaten in mm^3 der Marker in den ausgewählten FFPE-Tumorproben 2023_02_01, 2023_12_02, 2023_07_02, 2023_01_01 und 2023_13_01. Die hier gelisteten Daten beziehen sich auf manuell annotierte ROIs der einzelnen Proben. Summe aus 1500 Annotationsebenen.

Marker/Probe	2023_02_01	2023_12_02	2023_07_02	2023_01_01	2023_13_01
Keimzentren	0	0	0	0	0
Lymphatisches Gewebe	0,32	0,07	0	0	0
Muskeln	0,19	0,06	0	0	0
Bindegewebe	0,48	0,69	0	0,14	0
Plattenepithel	0	0	0	0,15	0,05
Fettgewebe	0,25	0	0	0	0
Speicheldrüsen	0	0,07	0	0	0
Arterielle Gefäße	0,14	0,01	0,75	0	0
Venöse Gefäße	0,32	0,03	0,0017	0	0,006
Verhorntes Tumorgewebe	0	0	0,35	0	0,03
Nicht-verhorntes Tumorgewebe	0,14	0,17	0,27	0,59	0,67
Stroma	0	0,27	0	0	0,47

Weiterhin wurde die Oberfläche, welche der Tumor in der Probe nach Annotation einnimmt, quantifiziert. Keimzentren wurden auch hier als eigenes Gewebe annotiert.

Die ROIs wurden als virtuelle Stanze gefertigt, welche sich auf der z-Achse durch den gesamten Block zieht, allerdings in x- und y-Richtung nur je 2 mm groß ist. In den ROIs wurden alle präsenten Gewebearten annotiert. Da sich in einigen Proben Hintergrund befand, der kein Gewebe enthielt und daher nicht annotiert wurde, besitzen die ROIs nicht immer ein Gesamtannotationsvolumen von 100 %. Alle Gewebearten, die in den ROIs vorgekommen sind, wurden annotiert.

Die Probe 2023_13_01 (s. Abbildung 18, lila) hatte in der ROI ein Gesamtvolumen von 1,22 mm³. Davon annotiert wurden 61,63 %. Davon hat den größten prozentualen Anteil am Volumen der ROI der Probe das nicht-verhornte Tumorgewebe mit 54,19 %. Davon haben des Weiteren Stroma (38,37 %), Plattenepithel (4,39 %), verhorntes Tumorgewebe (2,55 %) und venöse Gefäße (0,49 %) prozentuale Anteile am Annotationsvolumen der ROI.

Die Probe 2023_12_02 (s. Abbildung 18, blau) hatte in der ROI ein Gesamtvolumen von 1,38 mm³. Davon annotiert wurden 80,24 %. Davon hatte den höchsten prozentualen Anteil am Volumen der ROI das Bindegewebe mit 50,29 %. Es folgen Stroma mit 19,76 % und nicht-verhorntes Tumorgewebe mit 12,2 % und zu kleineren Anteilen Speicheldrüsen (5,48 %), lymphatisches Gewebe (5,12 %), Muskeln (4,33 %), venöse Gefäße (2,08 %) und arterielle Gefäße (0,75 %).

Probe 2023_01_01 (s. Abbildung 18, rot) hatte ein Gesamtvolumen von 0,88 mm³ in der ROI. Davon annotiert wurden 100 %. Den größten prozentualen Anteil hat nicht-verhorntes Tumorgewebe mit 67,31 %. Außerdem konnten Plattenepithel mit 16,96 % und Bindegewebe mit 15,74 %.

Probe 2023_07_02 (s. Abbildung 18, grün) weist ein Gesamtvolumen von 1,47 mm³ in der ROI auf. Davon wurden 93,62 % annotiert. Den größten prozentualen Anteil annotierten Volumens an der ROI haben arterielle Gefäße mit 51,22 %. Weiterhin verhorntes Tumorgewebe mit 23,72 % und nicht-verhorntes Tumorgewebe mit 18,57 %. Zu einem geringen prozentualen Anteil kamen venöse Gefäße vor (0,12 %).

Probe 2023_02_01 (s. Abbildung 18, grün-gelb) hatte ein Gesamtvolumen von 1,83 mm³. Davon annotiert wurden 100 %. Davon hatte den höchsten prozentualen Anteil Bindegewebe mit 25,91 %. Lymphatisches Gewebe hatte einen prozentualen Anteil von 17,59 %, venöse Gefäße 17,28 %, Fettgewebe 13,62 % und Muskeln 10,29 %. Zu einem geringeren prozentualen Anteil kamen nicht-verhorntes Tumorgewebe (7,73 %) und arterielle Gefäße (7,58 %) vor.

Die Oberflächen der Annotationsvolumina der jeweilig annotierten Strukturen in den ROIs der Tumorproben (s. Abbildung 19) zeigen ähnliche Ergebnisse. Hier ist ebenfalls eine leichte Verschiebung der Anteile innerhalb der einzelnen Proben zu beobachten.

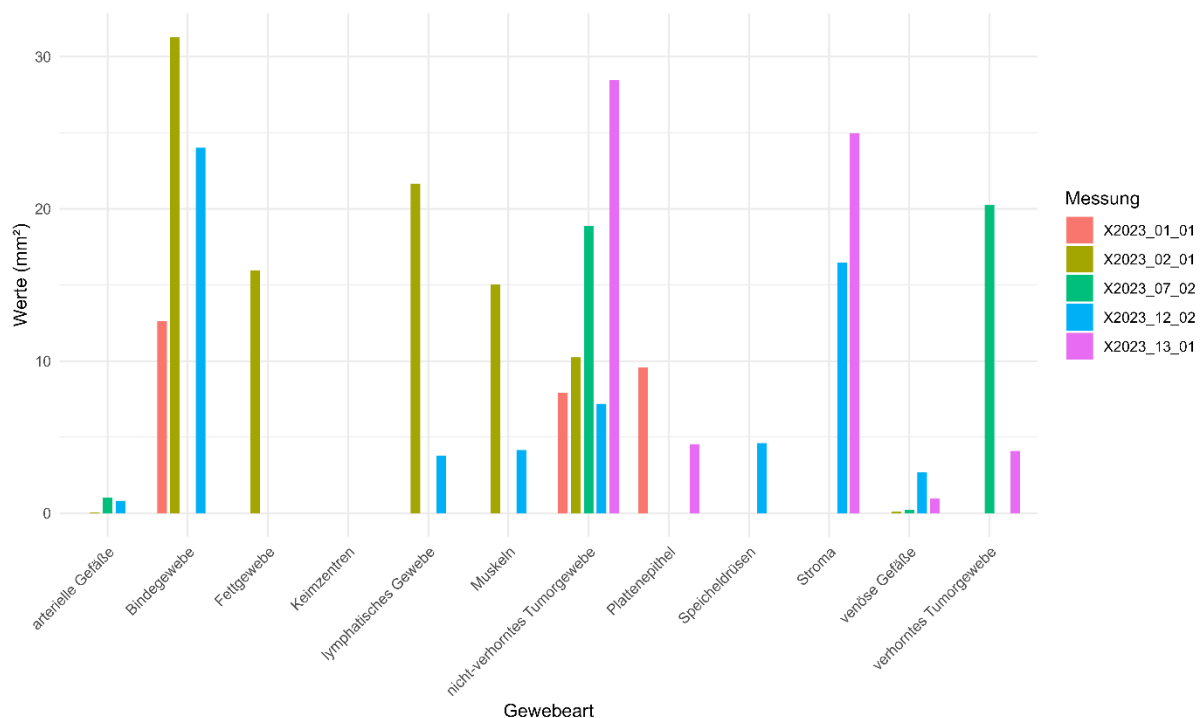


Abbildung 19: Darstellung der Oberflächendaten der Annotationsvolumina der einzelnen Strukturen in den fünf ($n = 5$) annotierten ROIs der Kopf-Hals-Tumorproben als Balkendiagramm. Es wurden insgesamt 1500 Annotationsebenen angefertigt. Auf der y-Achse sind die Flächenwerte der Annotationen in mm^2 angegeben, auf der x-Achse ist die jeweils annotierte Gewebeart angegeben.

Die in Tabelle 20 gelisteten Daten sind in Abbildung 19 graphisch dargestellt.

Tabelle 20: Oberflächendaten der Marker in den FFPE-Tumorproben 2023_02_01, 2023_12_02, 2023_07_02, 2023_01_01 und 2023_13_01 in mm^2 . Die hier gelisteten Daten beziehen sich auf manuell annotierte ROIs der einzelnen Proben und auf 1500 annotierte Ebenen.

Marker/Probe	2023_02_01	2023_12_02	2023_07_02	2023_01_01	2023_13_01
Keimzentren	0	0	0	0	0
Lymphatisches Gewebe	21,66	3,78	0	0	0
Muskeln	15,05	4,15	0	0	0
Bindegewebe	31,29	24,02	0	12,62	0
Plattenepithel	0	0	0	9,58	4,51
Fettgewebe	15,95	0	0	0	0
Speicheldrüsen	0	4,61	0	0	0
Arterielle Gefäße	0,049	0,81	1,04	0	0
Venöse Gefäße	0,1	2,69	0,21	0	0,96
Verhorntes Tumorgewebe	0	0	20,28	0	4,09
Nicht-verhorntes Tumorgewebe	10,24	7,19	18,86	7,9	28,46
Stroma	0	16,48	0	0	24,98

Die ROIs wurden als virtuelle Stanze gefertigt, welche sich auf der z-Achse durch den gesamten Block zieht, allerdings in x- und y-Richtung nur je 2 mm groß ist. In den ROIs wurden alle präsenten

Gewebearten annotiert. Da sich in einigen Proben Hintergrund befand, der kein Gewebe enthielt und daher nicht annotiert wurde, besitzen die ROIs nicht immer ein Gesamtannotationsvolumen von 100 %. Alle Gewebearten, die in den ROIs vorgekommen sind, wurden annotiert.

Die Probe 2023_13_01 (s. Abbildung 19, lila) zeigt das nicht-verhornte Tumorgewebe mit einer Oberfläche von 28,46 mm² als größte Oberfläche der ROI. Es folgen das Plattenepithel mit 4,51 mm², das verhornte Tumorgewebe mit 4,09 mm² und venöse Gefäße mit 0,96 mm².

Probe 2023_12_02 (s. Abbildung 19, blau) hat den höchsten Oberflächenanteil annotierten Volumens im Bindegewebe mit einer Oberfläche von 24,02 mm². Darauf folgen Stroma (16,48 mm²), nicht-verhorntes Tumorgewebe (7,19 mm²), Speicheldrüsen (4,61 mm²), lymphatisches Gewebe (3,78 mm²), Muskeln (4,15 mm²), venöse Gefäße (2,69 mm²) und arterielle Gefäße (0,81 mm²).

In der Probe 2023_01_01 (s. Abbildung 19, rot) ist der höchste Anteil das Bindegewebe mit einer Oberfläche von 12,62 mm², gefolgt von Plattenepithel mit 9,58 mm² und das nicht-verhornte Tumorgewebe mit 7,9 mm².

Probe 2023_07_02 (s. Abbildung 19, grün) weist den höchsten Oberflächenanteil annotierten Volumens im verhornten Tumorgewebe auf mit einer Oberfläche von 20,28 mm². Darauf folgen nicht-verhorntes Tumorgewebe (18,87 mm²), arterielle Gefäße (1,04 mm²) und venöse Gefäße (0,21 mm²).

In Probe 2023_02_01 (s. Abbildung 19, gelb) kommt vor allem das Bindegewebe mit einer Oberfläche von 31,19 mm² als größte Oberfläche vor. Es folgen lymphatisches Gewebe mit einer Oberfläche von 21,66 mm², Fettgewebe mit 15,95 mm², Muskeln mit 15,05 mm², nicht-verhorntes Tumorgewebe mit 10,24 mm², venöse Gefäße mit 0,1 mm² und arterielle Gefäße mit 0,05 mm².

3.4. Vergleich verschiedener Ebenen in den annotierten μ CT-Daten zeigt den Vorteil der räumlichen Komponente zur Erkennung von histopathologisch relevanten Gewebestrukturen

3.4.1. Der Ebenenvergleich der Tonsillen zeigt optische Unterschiede in den abgebildeten Strukturen, und der Vergleich der einzelnen Ebenen miteinander zeigt signifikante Unterschiede in der Verteilung einzelner Strukturen

Anhand der μ CT-Datensätze konnten einzelne Ebenen extrahiert und in Vergleich zueinander gesetzt werden. Die jeweils in den Ebenen annotierten Strukturen wurden quantifiziert und miteinander verglichen. Beispielhaft ist in Abbildung 20 eine Tonsillen-Probe dargestellt in verschiedenen Ebenen. Der Abstand der Ebenen zueinander betrug 208 μ m. Zu beobachten ist, dass die Tonsille je nach Ebene eine heterogene Gewebestruktur aufweist.

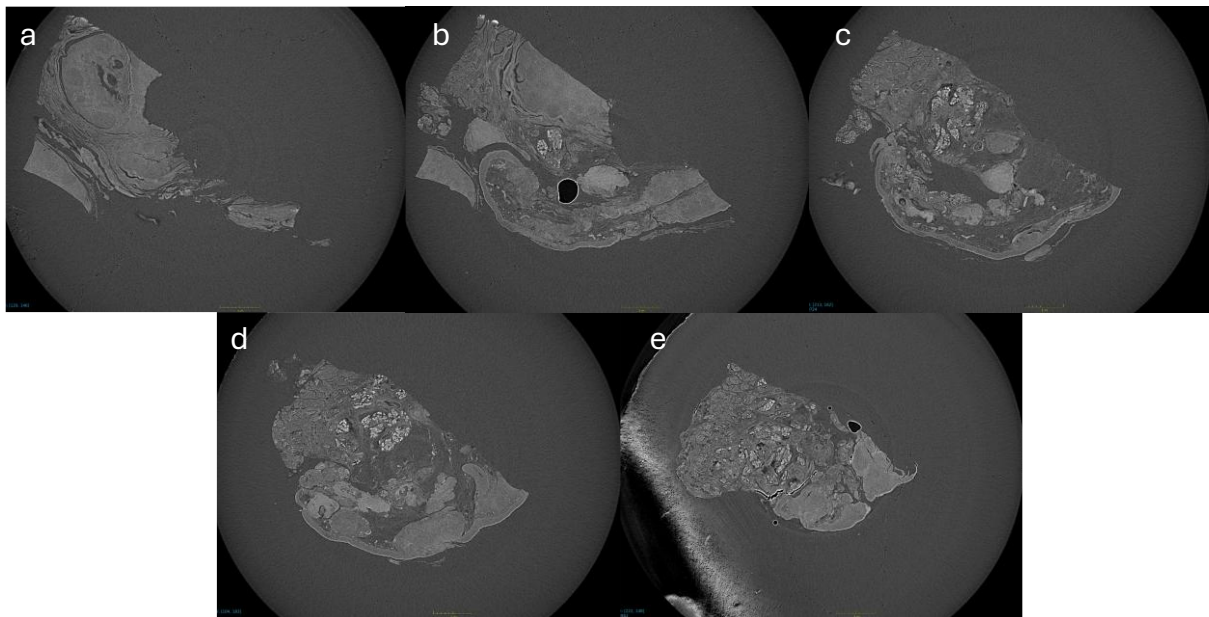


Abbildung 20: Ebenenvergleich verschiedener Ebenen in einem μ CT-Datensatz einer Tonsillen-Probe (von a nach e). Der Abstand zwischen den Bildern zueinander betrug 208 μ m. Zu beobachten ist, dass durch die räumliche Komponente unterschiedliche Strukturen je nach vorgedrungener Tiefe zu erkennen sind.

In Tabelle 21 sind die Werte für alle Tonsillen-Proben dargestellt. Zu sehen ist, dass sich die Strukturen zwischen den Ebenen deutlich unterscheiden. Die Abstände der Ebenen zueinander betrugen für Probe 2022_02 260 μ m, für Probe 2022_26 208 μ m und für Probe 2022_56 189,8 μ m.

Tabelle 21: Werte der Annotationen im Ebenenvergleich von 5 verschiedenen Ebenen innerhalb der μ CT-Datensätze der Tonsillen-Proben 2022_02, 2022_26 und 2022_56. Die annotierten Flächen der verschiedenen Strukturen sind angegeben in mm^2 .

Ebene 1 (Blockschnittfläche des FFPE-Blockes)			
Marker/Probe	2022_26	2022_56	2022_02
Keimzentren	0,1	0	2,86
Lymphatisches Gewebe	2,28	0,99	14,69
Muskeln	0,89	0,34	0
Bindegewebe	9,03	0,57	0,48
Plattenepithel	0,88	0	0,01
Fettgewebe	0,92	0	0
Speicheldrüsen	1,25	0	0
arterielle Gefäße	0	0	0
venöse Gefäße	2,47	0	0
Ebene 2			
Marker/Probe	2022_26	2022_56	2022_02
Keimzentren	0	0,8	2,87
Lymphatisches Gewebe	4,75	1,24	12,98
Muskeln	1,05	0,18	0,01
Bindegewebe	11,15	9,41	1,18
Plattenepithel	1,79	0	0,17
Fettgewebe	4,91	0	0
Speicheldrüsen	1,65	0	0

arterielle Gefäße	3,84	0	0
venöse Gefäße	0,13	0	0
Ebene 3			
Marker/Probe	2022_26	2022_56	2022_02
Keimzentren	1,87	5,41	2,11
Lymphatisches Gewebe	2,38	1,06	10,29
Muskeln	0,77	1,47	0,02
Bindegewebe	17,53	7,88	1,33
Plattenepithel	1,86	0	0
Fettgewebe	3,13	0	0
Speicheldrüsen	1,01	0	0
arterielle Gefäße	0,49	0	0
venöse Gefäße	0,01	0	0
Ebene 4			
Marker/Probe	2022_26	2022_56	2022_02
Keimzentren	0,68	0,82	0,9
Lymphatisches Gewebe	6,41	0,45	8,51
Muskeln	0,34	2,06	0,03
Bindegewebe	12,99	7,51	0,33
Plattenepithel	1,52	0	0
Fettgewebe	0,86	0	0
Speicheldrüsen	0,49	0	0
arterielle Gefäße	5,79	0	0
venöse Gefäße	0	0	0
Ebene 5			
Marker/Probe	2022_26	2022_56	2022_02
Keimzentren	0,81	0	0,86
Lymphatisches Gewebe	6,75	0	4,52
Muskeln	0	0,98	0
Bindegewebe	5,65	1,61	0,04
Plattenepithel	0,39	0	0
Fettgewebe	0,89	0	0
Speicheldrüsen	0	0	0
arterielle Gefäße	0	0	0
venöse Gefäße	0	0	0

Folgend sind die Ebenen miteinander verglichen und gegeneinander aufgestellt worden. Angegeben sind die Streudiagramme mit einer Änderungsgeraden, deren Steigung die angenäherte Änderungsrate der einzelnen Strukturen von Ebene zu Ebene angibt (s. Abbildung 21). Mittels der IQR-Methode wurden sogenannte Ausreißer bzw. stark abweichende Werte erkannt und gingen nicht in die Berechnung ein. Von 135 Datenpunkten wurden 115 zur Berechnung der folgenden Werte verwendet.

Anhand der morphologischen Daten einer Ebene sind keine zuverlässigen Vorhersagen über die morphologischen Daten der um 260 – 189,8 µm tiefer liegenden Ebene möglich.

Die vorliegenden Punktdiagramme (s. Abbildung 21) veranschaulichen die Verteilung der Annotationen nach Gewebetyp und Ebene (n = 5) für die Tonsillen-Proben (n = 3) inkl. linearer Regression. Jeder Plot repräsentiert eine spezifische Gewebeart. Die einzelnen Patient:in-Proben sind farblich dargestellt.

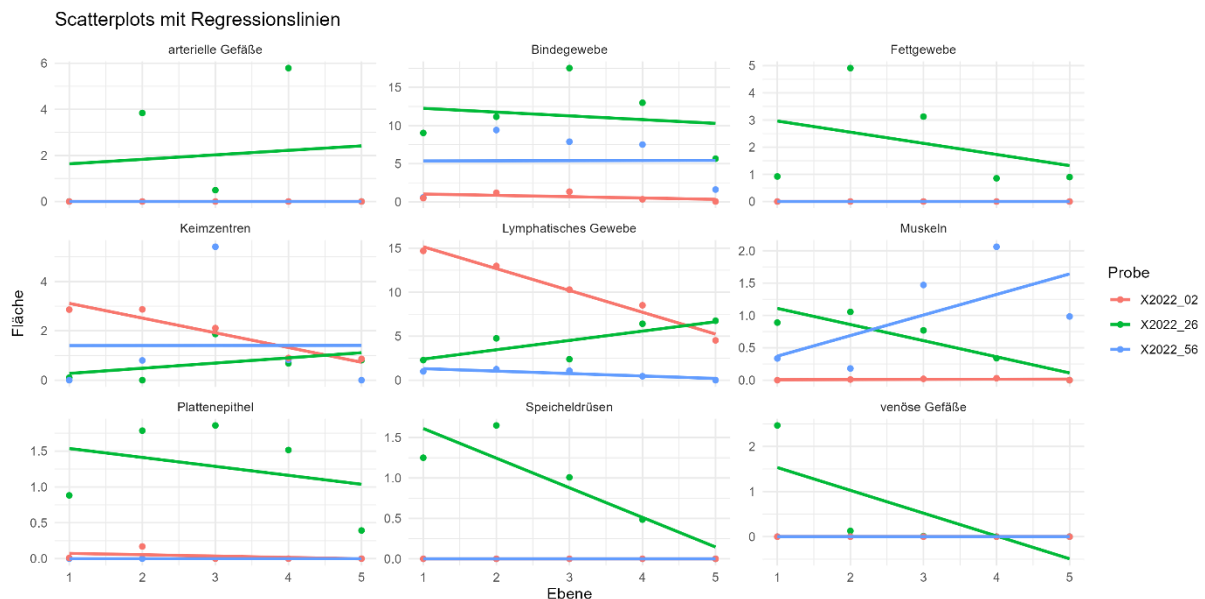


Abbildung 21: Punktdiagramme zur Verteilung der Annotationsflächenwerte nach Gewebetyp und Ebene (n = 5) für die Tonsillen-Proben (n = 3), inkl. linearer Regressionslinien. Proben unterschiedlich farblich dargestellt (s. Legende). Auf der y-Achse sind die Flächenwerte in mm² angegeben, auf der x-Achse sind die Ebenen nummeriert von 1 (Blockschnittfläche) bis 5 (Plastikkassette) angegeben. Zu den Datenpunkten wurde je eine Regressionsgerade angegeben, deren Steigung die angenäherte Änderungsrate zwischen den einzelnen Ebenen zeigt.

Der statistische Vergleich der einzelnen Ebenen der Tonsillen-Proben miteinander durch die lineare Regression zeigte Unterschiede in p-Werten und r²-Werten der verglichenen Strukturen (s. Abbildung 22). In Abbildung 22 werden die Strukturen in den einzelnen Ebenen (n = 5) miteinander in den Tonsillen-Proben (n = 3) verglichen. Die Ergebnisse linearer Regressionsanalysen zur Untersuchung spezifischer Gewebeflächen auf Ebenen zunehmender Schichttiefe in Tonsillen-Proben unterschiedlicher Patient:innen werden in Form von Heatmaps visualisiert. Positive Werte weisen auf einen Anstieg der Gewebefläche mit zunehmender Schichttiefe hin, während negative Werte eine Abnahme anzeigen. Die Farbe gibt die Steigung der Regressionsgeraden aus Abbildung 21 an: Blau steht für negative Steigungen, während Rot positive Steigungen repräsentiert. Die zweite Heatmap zeigt die zugehörigen p-Werte, welche die statistische Signifikanz der geschätzten Regressionskoeffizienten widerspiegeln. Grün zeigt p-Werte unter 0,5 an, wohingegen Rot p-Werte über 0,5 anzeigt. Die dritte Heatmap visualisiert die Bestimmtheitsmaße (r-squared), welche den Anteil der Varianz in der Gewebefläche erklären, der durch das lineare Modell mit der Schichttiefe vorhergesagt wird. Graue Felder weisen auf fehlende Daten oder nicht signifikante Ergebnisse (p ≥ 0,05) hin, während rote Werte über 0,5 und grüne Werte unter 0,5 anzeigen.

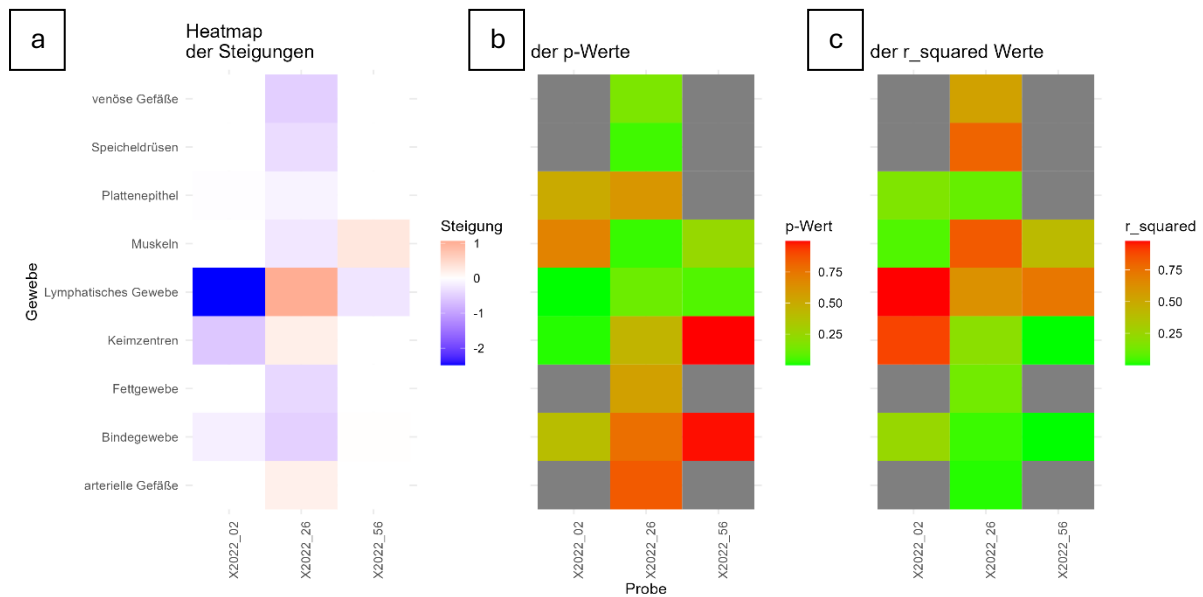


Abbildung 22: Anhand der morphologischen Daten einer Ebene sind keine zuverlässigen Vorhersagen über die morphologischen Daten der um 260 - 189,8 μm tiefer liegenden Ebene/des Volumens möglich.

In der folgenden Tabelle 22 sind die exakten Zahlenwerte der Steigungen der Regressionsgeraden, der p-Werte und der r^2 -Werte aufgelistet.

Tabelle 22: p-Werte, R^2 -Werte und Werte der Steigung der Regressionsgeraden für den Vergleich der Ebenen ($n = 5$) zueinander von den Tonsillen ($n = 3$). Die Werte sind in Abbildung 21 und Abbildung 22 graphisch dargestellt.

Probe	Marker	p-Wert	R^2 -Wert	Steigung der Regressionsgeraden
2022_02	Arterielle Gefäße	Nicht berechenbar	Nicht berechenbar	0
	Bindegewebe	0,4	0,24053268	-0,17
	Fettgewebe	Nicht berechenbar	Nicht berechenbar	0
	Keimzentren	0,01511767	0,89410717	-0,597
	Lymphatisches Gewebe	0,00150958	0,97680761	-2,481
	Muskeln	0,69424885	0,05882353	0,002
	Plattenepithel	0,50419137	0,16030195	-0,019
	Speicheldrüsen	Nicht berechenbar	Nicht berechenbar	0
2022_26	Arterielle Gefäße	Nicht berechenbar	Nicht berechenbar	0
	Bindegewebe	0,4	0,24053268	-0,17
	Fettgewebe	Nicht berechenbar	Nicht berechenbar	0
	Keimzentren	0,01511767	0,89410717	-0,597
	Lymphatisches Gewebe	0,00150958	0,97680761	-2,481
	Muskeln	0,69424885	0,05882353	0,002
	Plattenepithel	0,50419137	0,16030195	-0,019
	Speicheldrüsen	Nicht berechenbar	Nicht berechenbar	0
2022_56	Arterielle Gefäße	Nicht berechenbar	Nicht berechenbar	0
	Bindegewebe	0,4	0,24053268	-0,17
	Fettgewebe	Nicht berechenbar	Nicht berechenbar	0
	Keimzentren	0,01511767	0,89410717	-0,597
	Lymphatisches Gewebe	0,00150958	0,97680761	-2,481
	Muskeln	0,69424885	0,05882353	0,002
	Plattenepithel	0,50419137	0,16030195	-0,019
	Speicheldrüsen	Nicht berechenbar	Nicht berechenbar	0

	Venöse Gefäße	0,85217755	0,01354026	0,19469
2022_56	Arterielle Gefäße	Nicht berechenbar	Nicht berechenbar	0
	Bindegewebe	0,99148168	4,48	0,01698
	Fettgewebe	Nicht berechenbar	Nicht berechenbar	0
	Keimzentren	0,99808744	2,26	0,00216
	Lymphatisches Gewebe	0,06426438	0,7324657	-0,27811
	Muskeln	0,24430978	0,4102478	0,31756
	Plattenepithel	Nicht berechenbar	Nicht berechenbar	0
	Speicheldrüsen	Nicht berechenbar	Nicht berechenbar	0
	Venöse Gefäße	Nicht berechenbar	Nicht berechenbar	0

Manche Gewebearten zeigen konsistente Trends über die einzelnen Ebenen hinweg. Das gilt für Keimzentren und lymphatisches Gewebe in Probe 2022_02, sowie Muskeln und Speicheldrüsen in Probe 2022_26. Jedoch zeigen die meisten Gewebestrukturen keine Signifikanz (s. Abbildung 22) und hohe Variabilität in den Daten (s. Abbildung 21). Dies bedeutet, dass sich von den morphologischen Daten einer Ebene nicht konsistent auf das Gewebe der nächsten schließen lässt.

3.4.2. Der Ebenenvergleich der Tumoren zeigt optische Unterschiede in den abgebildeten Strukturen und der Vergleich der einzelnen Ebenen miteinander zeigt signifikante Unterschiede in der Verteilung einzelner Strukturen

Anhand der μ CT-Datensätze konnten einzelne Ebenen extrahiert und in Vergleich zueinander gesetzt werden. Die jeweils in den Ebenen annotierten Strukturen wurden quantifiziert und miteinander verglichen. In Abbildung 23 sind exemplarisch fünf verschiedene Ebenen eines μ CT-Datensatzes ausgewählt worden, um die Heterogenität der Ebenen zu verdeutlichen.

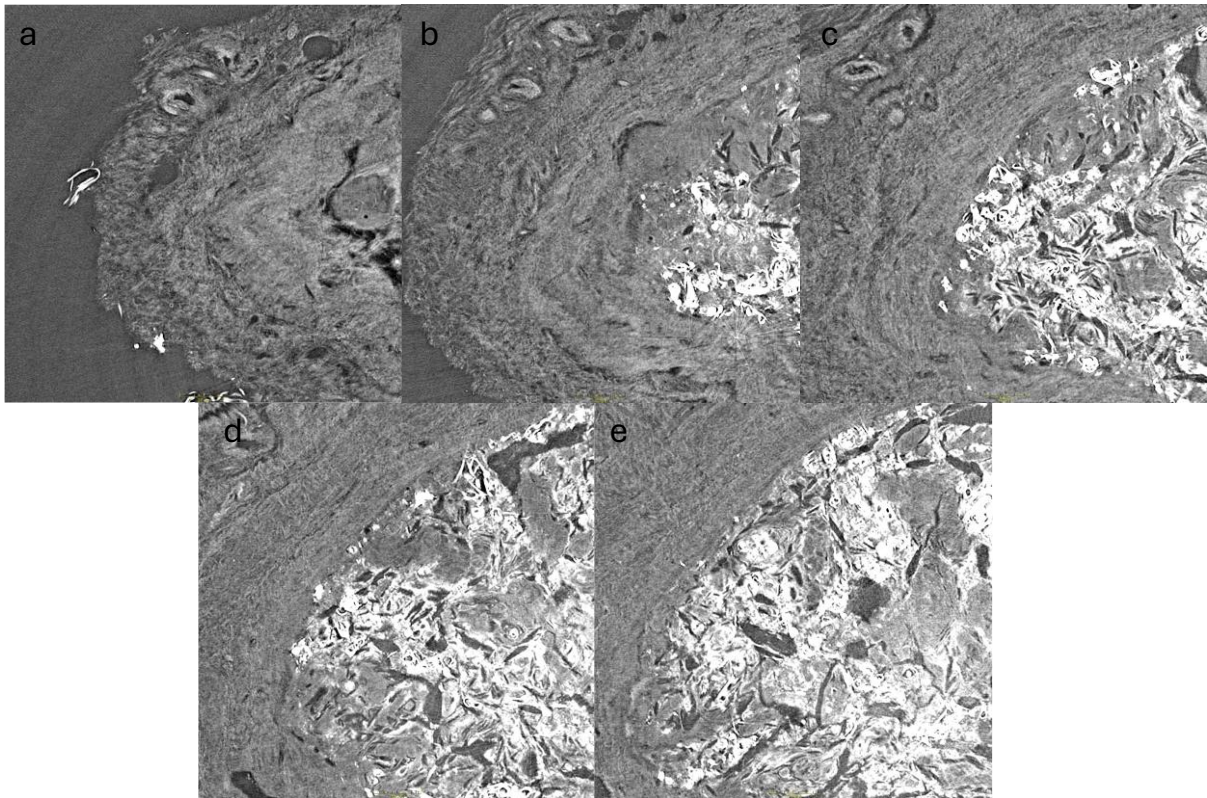


Abbildung 23: Ebenenvergleich verschiedener Ebenen in einem μ CT-Datensatz einer Tumorphobe (von a nach e). Der Abstand zwischen den Bildern zueinander betrug $487,5 \mu\text{m}$. Bei den weißen Strukturen handelt es sich um verhorntes Tumorgewebe. Zu beobachten ist, dass durch die räumliche Komponente unterschiedliche Strukturen je nach vorgedrungener Tiefe zu erkennen sind.

In Tabelle 23 sind die Werte der Annotationen der einzelnen Ebenen angegeben. Es ist zu beobachten, dass unterschiedliche Anzahlen an Gewebestrukturen in den jeweiligen Ebenen vertreten sind. Die Abstände der Ebenen zueinander betrugen für die Proben 2023_02_01, 2023_12_02, 2023_07_02 und 2023_13_01 je $121,875 \mu\text{m}$. Für Probe 2023_01_01 betrug der Abstand zwischen den Ebenen $162,5 \mu\text{m}$.

Tabelle 23: Werte der Annotationen im Ebenenvergleich von 5 verschiedenen Ebenen innerhalb der ROIS der μ CT-Datensätze der Tumorphoben 2023_01_01, 2023_12_02, 2023_07_02, 2023_01_01 und 2023_13_01. Die annotierten Flächen der verschiedenen Strukturen sind angegeben in mm^2 .

Ebene 1 (Blockschnittfläche)					
Marker/Probe	2023_02_0 1	2023_12_0 2	2023_07_0 2	2023_01_0 1	2023_13_0 1
Keimzentren	0	0	0	0	0
lymphatisches Gewebe	0,64	0,16	0	0	0
Muskeln	0,42	0,14	0	0	0
Bindegewebe	0,83	1,47	0	0,14	0
Plattenepithel	0	0	0	0,33	0,12
Fettgewebe	0,61	0	0	0	0
Speicheldrüsen	0	0,32	0	0	0
arterielle Gefäße	0	0	0,02	0	0
venöse Gefäße	0	0,11	0,02	0	0,02
verhorntes Tumorgewebe	0	0	1,83	0	0,06
nicht-verhorntes Tumorgewebe	0,32	0,22	0,37	1,16	1,32

Stroma	0	0,41	0	0	1,06
Ebene 2					
Marker/Probe	2023_02_0 1	2023_12_0 2	2023_07_0 2	2023_01_0 1	2023_13_0 1
Keimzentren	0	0	0	0	0
lymphatisches Gewebe	0,67	0,13	0	0	0
Muskeln	0,36	0,12	0	0	0
Bindegewebe	0,95	1,55	0	0,22	0
Plattenepithel	0	0	0	0,13	0,13
Fettgewebe	0,56	0	0	0	0
Speicheldrüsen	0	0,22	0	0	0
arterielle Gefäße	0	0,26	0,03	0	0
venöse Gefäße	0	0,13	0,01	0	0,02
verhorntes Tumorgewebe	0	0	1,22	0	0,07
nicht-verhorntes Tumorgewebe	0,28	0,23	0,49	1,25	1,32
Stroma	0	0,46	0	0	0,98
Ebene 3					
Marker/Probe	2023_02_0 1	2023_12_0 2	2023_07_0 2	2023_01_0 1	2023_13_0 1
Keimzentren	0	0	0	0	0
lymphatisches Gewebe	0,58	0,22	0	0	0
Muskeln	0,23	0,12	0	0	0
Bindegewebe	1,26	1,23	0	0,18	0
Plattenepithel	0	0	0	0,16	457,57
Fettgewebe	0,44	0	0	0	0
Speicheldrüsen	0,09	0,14	0	0	0
arterielle Gefäße	3,49	0,04	0,03	0	0
venöse Gefäße	6,52	0,02	0,0002	0	0,003
verhorntes Tumorgewebe	0	0	0,62	0	0,06
nicht-verhorntes Tumorgewebe	0,32	0,35	0,59	1,04	1,16
Stroma	0	0,59	0	0	1,19
Ebene 4					
Marker/Probe	2023_02_0 1	2023_12_0 2	2023_07_0 2	2023_01_0 1	2023_13_0 1
Keimzentren	0	0	0	0	0
lymphatisches Gewebe	0,42	0,13	0	0	0
Muskeln	0,51	0,13	0	0	0
Bindegewebe	0,86	1,42	0	0,24	0
Plattenepithel	0	0	0	0,17	0,1
Fettgewebe	0,45	0	0	0	0
Speicheldrüsen	0	0,04	0	0	0
arterielle Gefäße	0,14	0,03	0,03	0	0
venöse Gefäße	0,39	0,04	0,00008	0	0,003
verhorntes Tumorgewebe	0	0	0,16	0	0,05
nicht-verhorntes Tumorgewebe	0,28	0,40	0,65	0,57	1,41

Stroma	0	0,65	0	0	0,92
Ebene 5					
Marker/Probe	2023_02_0 1	2023_12_0 2	2023_07_0 2	2023_01_0 1	2023_13_0 1
Keimzentren	0	0	0	0	0
lymphatisches Gewebe	0,99	0,11	0	0	0
Muskeln	0,4	0,08	0	0	0
Bindegewebe	0,6	1,27	0	0,09	0
Plattenepithel	0	0	0	0,21	0,12
Fettgewebe	0,61	0	0	0	0
Speicheldrüsen	0	0,06	0	0	0
arterielle Gefäße	0	0,04	0,04	0	0
venöse Gefäße	0	0,04	0,009	0	0
verhorntes Tumorgewebe	0	0	0,15	0	0,09
nicht-verhorntes Tumorgewebe	0,22	0,56	0,77	0,24	1,37
Stroma	0	0,69	0	0	0,89

Die Werte aus Tabelle 23 sind folgend miteinander verglichen und gegeneinander aufgestellt worden. Mittels der IQR-Methode wurden sogenannte Ausreißer bzw. stark abweichende Werte erkannt und aus der Berechnung ausgeschlossen. Von 300 Datenpunkten wurden 254 zur Berechnung der folgenden Werte verwendet. Die vorliegenden Punktdiagramme (s. Abbildung 24) veranschaulichen die Verteilung der Annotationen hinsichtlich des Gewebetyps und der Ebene (n = 5) für die Tumor-Proben (n = 5). Jeder Plot repräsentiert eine spezifische Gewebeart. Die einzelnen Patient:in-Proben sind farblich darstellt. Jeder Plot repräsentiert eine spezifische Gewebeart, wobei jede farbige Regressionslinie die Beziehung für eine einzelne Patient:in-Probe darstellt. Die Steigung jeder Regressionslinie entspricht dem geschätzten Regressionskoeffizienten für diese Gewebe-Patient:in-Kombination. Zu den Datenpunkten wurde jeweils eine Regressionsgerade angegeben, deren Steigung die angenäherte Änderungsrate angibt.

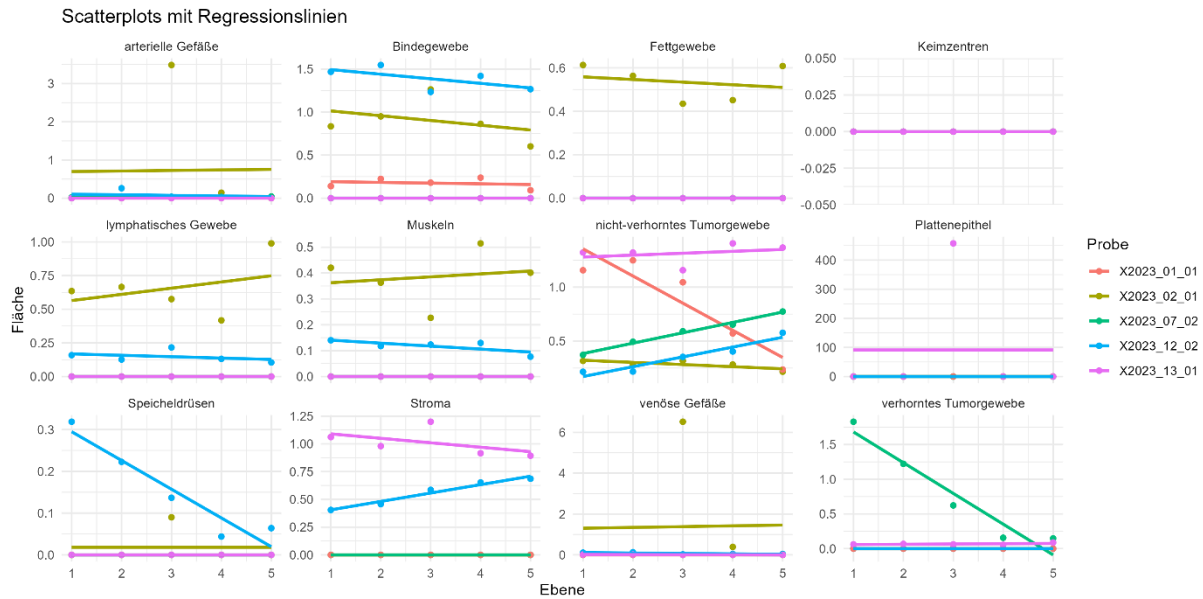


Abbildung 24: Punktdiagramme zur Verteilung der Annotationsflächendaten nach Gewebetyp und Ebene ($n = 5$) für die Tumor-Proben ($n = 5$), inkl. linearer Regressionslinien. Proben unterschiedlich farblich dargestellt (s. Legende). Auf der y-Achse sind die Flächenwerte in mm^2 angegeben, auf der x-Achse sind die Ebenen nummeriert von 1 (Blockschnittfläche) bis 5 (Plastikkassette) angegeben. Zu den Datenpunkten wurde je eine Regressionsgerade angegeben, deren Steigung die angenäherte Änderungsrate zwischen den einzelnen Ebenen zeigt.

Anhand der morphologischen Daten einer Ebene sind keine zuverlässigen Vorhersagen über die morphologischen Daten der um $181,875 - 162,8 \mu\text{m}$ tiefer liegenden Ebene möglich.

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wurde ein Vergleich der Strukturen in den einzelnen Ebenen ($n = 5$) in den Tumor-Proben ($n = 5$) durchgeführt. Die Ergebnisse linearer Regressionsanalysen zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der Schichttiefe (Ebene) und der Fläche spezifischer Gewebearten in Tonsillen-Proben unterschiedlicher Patient:innen wurden mithilfe von Heatmaps visualisiert (s. Abbildung 25), die analog zu Abbildung 22 erstellt wurden.

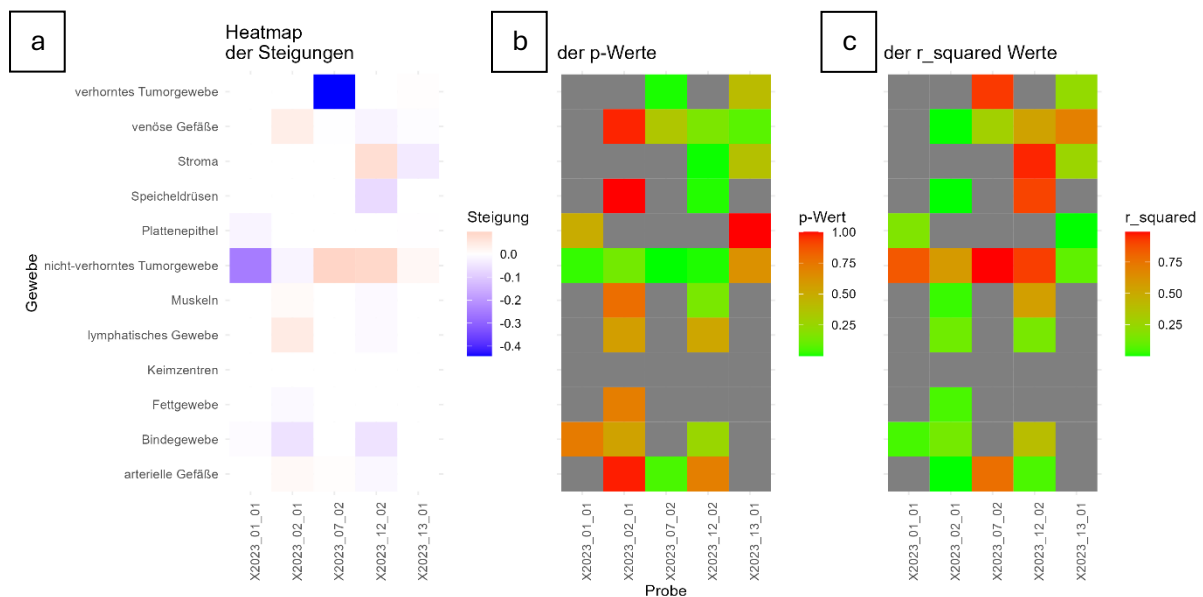


Abbildung 25: Anhand der morphologischen Daten einer Ebene sind keine zuverlässigen Vorhersagen über die morphologischen Daten der um $181,875 - 162,5 \mu\text{m}$ tiefer liegenden Ebene möglich.

In der folgenden Tabelle 24 sind die exakten Zahlenwerte der Steigungen der Regressionsgeraden, der p-Werte und der r^2 -Werte aufgelistet.

Tabelle 24: p-Werte, R^2 -Werte und Werte der Steigung der Regressionsgeraden für den Vergleich der Ebenen ($n = 5$) zueinander von den Tonsillen ($n = 3$). Die Werte sind in Abbildung 24 und Abbildung 25 graphisch dargestellt.

Probe	Marker	p-Wert	R^2 -Wert	Steigung der Regressionsgeraden
2023_01_01	Arterielle Gefäße	Nicht berechenbar	Nicht berechenbar	0
	Bindegewebe	0,72993873	0,04568672	-0,0081574
	Fettgewebe	Nicht berechenbar	Nicht berechenbar	0
	Keimzentren	Nicht berechenbar	Nicht berechenbar	0
	Lymphatisches Gewebe	Nicht berechenbar	Nicht berechenbar	0
	Muskeln	Nicht berechenbar	Nicht berechenbar	0
	Nicht-verhorntes Tumorgewebe	0,02568209	0,85068332	-0,25159
	Plattenepithel	0,16681642	0,49481223	-0,02028
	Speicheldrüsen	Nicht berechenbar	Nicht berechenbar	0
	Stroma	Nicht berechenbar	Nicht berechenbar	0
	Venöse Gefäße	Nicht berechenbar	Nicht berechenbar	0
	Verhorntes Tumorgewebe	Nicht berechenbar	Nicht berechenbar	0
2023_02_01	Arterielle Gefäße	0,98134299	0,00021473	0,01431
	Bindegewebe	0,54545662	0,13343858	-0,05527
	Fettgewebe	0,71738182	0,05010955	-0,01212
	Keimzentren	Nicht berechenbar	Nicht berechenbar	0
	Lymphatisches Gewebe	0,56592831	0,12116088	0,04605
	Muskeln	0,78330326	0,02925151	0,01132
	Nicht-verhorntes Tumorgewebe	0,13332114	0,58244333	-0,01982
	Plattenepithel	Nicht berechenbar	Nicht berechenbar	0
	Speicheldrüsen	1	1,145427918907	1,645703188395
	Stroma	Nicht berechenbar	Nicht berechenbar	0
	Venöse Gefäße	0,97279428	0,00045663	0,0389

	Verhorntes Tumorgewebe	Nicht berechenbar	Nicht berechenbar	0
2023_07_02	Arterielle Gefäße	0,05044243	0,77020556	0,0047885
	Bindegewebe	Nicht berechenbar	Nicht berechenbar	0
	Fettgewebe	Nicht berechenbar	Nicht berechenbar	0
	Keimzentren	Nicht berechenbar	Nicht berechenbar	0
	Lymphatisches Gewebe	Nicht berechenbar	Nicht berechenbar	0
	Muskeln	Nicht berechenbar	Nicht berechenbar	0
	Nicht-verhorntes Tumorgewebe	0,00043702	0,98982368	0,09618
	Plattenepithel	Nicht berechenbar	Nicht berechenbar	0
	Speicheldrüsen	Nicht berechenbar	Nicht berechenbar	0
	Stroma	Nicht berechenbar	Nicht berechenbar	0
	Venöse Gefäße	0,35126795	0,28782538	-0,002312
	Verhorntes Tumorgewebe	0,00798031	0,9302951	-0,44275
2023_12_02	Arterielle Gefäße	0,71239106	0,05192717	-0,0152488
	Bindegewebe	0,25519311	0,39619619	-0,05309
	Fettgewebe	Nicht berechenbar	Nicht berechenbar	0
	Keimzentren	Nicht berechenbar	Nicht berechenbar	0
	Lymphatisches Gewebe	0,52901417	0,14379751	-0,01031
	Muskeln	0,14770725	0,55645713	-0,0114864
	Nicht-verhorntes Tumorgewebe	0,01009152	0,91868883	0,09095
	Plattenepithel	Nicht berechenbar	Nicht berechenbar	0
	Speicheldrüsen	0,01276561	0,90516984	-0,0688185
	Stroma	0,00323328	0,9615837	0,0757
	Venöse Gefäße	0,15698472	0,5403977	-0,0213149
	Verhorntes Tumorgewebe	Nicht berechenbar	Nicht berechenbar	0
2023_13_01	Arterielle Gefäße	Nicht berechenbar	Nicht berechenbar	0
	Bindegewebe	Nicht berechenbar	Nicht berechenbar	0
	Fettgewebe	Nicht berechenbar	Nicht berechenbar	0

	Keimzentren	Nicht berechenbar	Nicht berechenbar	0
	Lymphatisches Gewebe	Nicht berechenbar	Nicht berechenbar	0
	Muskeln	Nicht berechenbar	Nicht berechenbar	0
	Nicht-verhorntes Tumorgewebe	0,63210854	0,08596505	0,01758
	Plattenepithel	0,99998573	1,255889949094	-0,00145
	Speicheldrüsen	Nicht berechenbar	Nicht berechenbar	0
	Stroma	0,38133973	0,25886611	-0,04004
	Venöse Gefäße	0,0753706	0,70459287	-0,0051178
	Verhorntes Tumorgewebe	0,41391047	0,22978974	0,0039173

Einige der Gewebearten zeigen konsistente Trends über die einzelnen Ebenen hinweg. Dies bedeutet, dass von den morphologischen Daten einer Ebene sich nicht konsistent auf das Gewebe der nächsten schließen lässt. Das gilt für nicht-verhorntes Tumorgewebe und venöse Gefäße. Jedoch zeigen viele Gewebestrukturen keine Signifikanz (s. Abbildung 25) und hohe Variabilität in den Daten bzw. fehlende Daten (s. Abbildung 24).

3.5. Verschiedene μ CT-Messarten mit unterschiedlichen Auflösungen zur bestmöglichen Darstellung von histopathologisch relevanten Strukturen mit Phasenkontrast- μ CT und Synchrotron-Aufnahmen

Es wurden ausgewählte FFPE-Blöcke mit Tonsillengewebe (s. Tabelle 1) zu den Kooperationspartnern des Fraunhofer EMI nach Efringen-Kirchen versendet, damit μ CT-Aufnahmen angefertigt werden konnten. Im Rahmen der Vorarbeiten wurden zunächst verschiedene μ CT-Geräte mit unterschiedlichen Aufnahmeverfahren getestet. Im Rahmen der Untersuchungen wurden die Verfahren der Phasenkontrast- μ CT, der Absorptions- μ CT und verschiedener Synchrotron-Messungen analysiert.

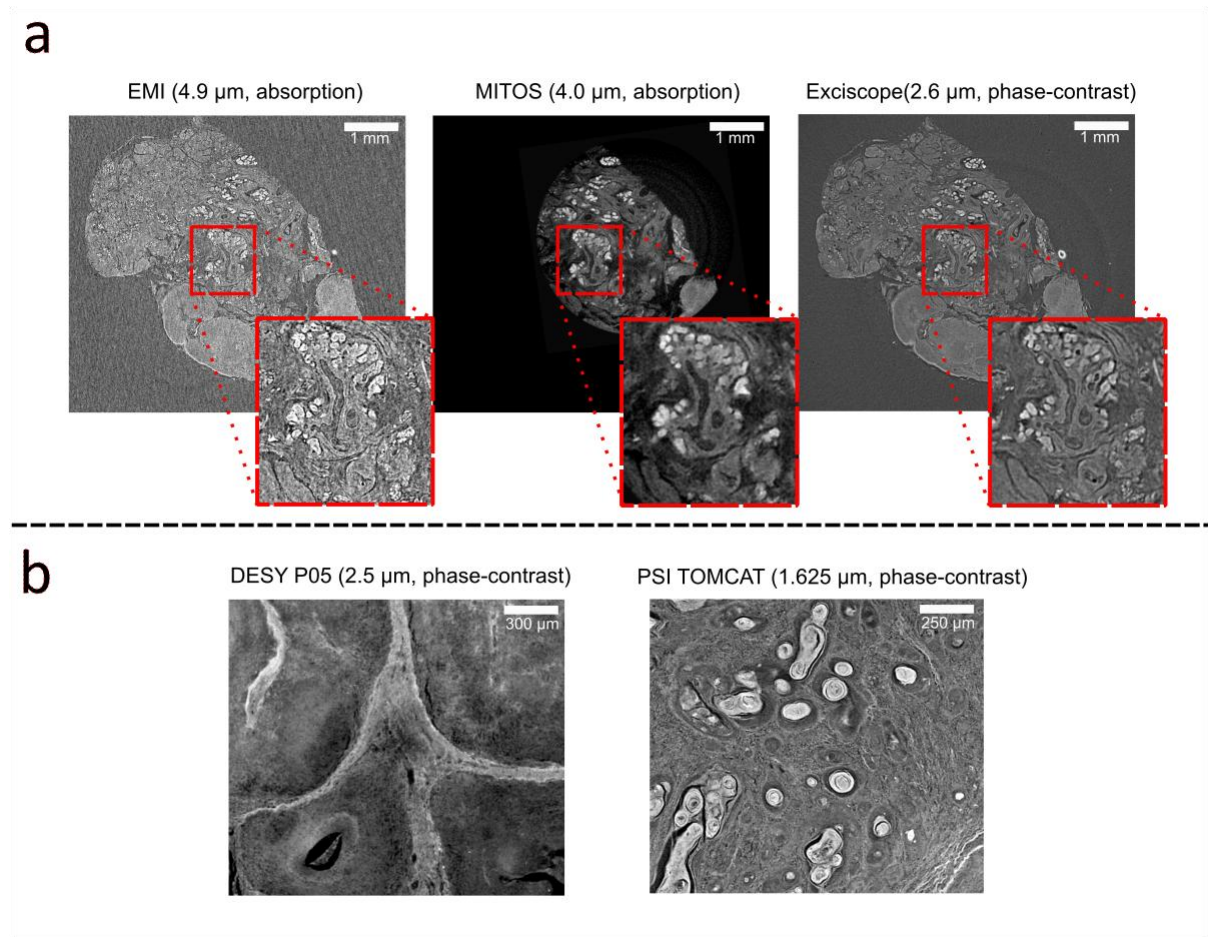


Abbildung 26: Darstellung der verschiedenen μCT -Messungen innerhalb des Projektes. a, von links nach rechts: Absorption- μCT Aufnahmen des Fraunhofer EMI mit einer Auflösung von 4,9 μm . Absorptions- μCT -Aufnahmen der Firma MITOS mit einer Auflösung von 4,0 μm . Phasenkontrast- μCT -Aufnahmen der Firma Exciscopie mit einer Auflösung von 2,6 μm . b, von links nach rechts: Synchrotron-Aufnahme im Phasenkontrast des DESY P05 mit einer Auflösung von 2,5 μm . Synchrotron-Aufnahme im Phasenkontrast des PSI TOMCAT mit einer Auflösung von 1,625 μm .

Für die Evaluation der einzelnen μCT -Messungen wurden zuvor auf H&E-Färbungen histopathologisch relevante Strukturen festgelegt, welche es zu erkennen galt. Diese Tabelle wurde im Lastenheft des Projektes und in der Doktorarbeit von Herrn Muhannad Al Kallaa festgehalten.

In den Phasenkontrast-Aufnahmen des μCT konnten anhand der zuvor definierten Strukturen folgende histopathologisch relevanten Strukturen erkannt werden: Fettgewebe, kleine und größere Blutgefäße, Drüsengewebe, Muskelgewebe, Plattenepithel, lymphatisches Gewebe, Keimzentren und Bindegewebe.

Für die Aufnahmen des Absorptions- μCT konnten deutlich weniger histopathologisch relevante Strukturen erkannt werden: Drüsengewebe, Bindegewebe, lymphatisches Gewebe.

In den Synchrotron-Aufnahmen des PSI TOMCAT konnten anhand der zuvor definierten Strukturen folgende histopathologisch relevanten Strukturen erkannt werden: Zellkerne, einzelne Zellen, Fettgewebe, kleine und größere Blutgefäße, Drüsengewebe, Muskelgewebe, Plattenepithel, lymphatisches Gewebe, Keimzentren und Bindegewebe.

In den Synchrotron-Aufnahmen des DESY konnten einzelne Zellen, Fettgewebe, kleine und größere Blutgefäße, Drüsengewebe, Muskelgewebe, Plattenepithel, lymphatisches Gewebe, Keimzentren und Bindegewebe als histopathologisch relevante Strukturen erkannt werden.

Die im PSI durchgeführten Synchrotron-Aufnahmen wiesen eine hohe Auflösung sowie Übersichts- und ROI-Aufnahmen in unterschiedlichen Auflösungen auf. Des Weiteren wurden die Aufnahmen mit den im Lastenheft definierten histopathologischen Strukturen verglichen, woraufhin entschieden wurde, die Aufnahmen aus dem Synchrotron fortwährend zur Annotation der Tumorproben und damit zum Training des Machine-Learning-Modells zu verwenden.

Nach einem direkten Vergleich mit den zuvor in einem Lastenheft festgehaltenen histopathologisch relevanten Strukturen konnte festgestellt werden, dass die Phasenkontrast- μ CT von Exciscope mit einer Auflösung von 2,6 μ m die geeignetste Methode ist, um in der diagnostischen Pathologie eingesetzt zu werden. Diese bietet die höchste Auflösung für die einfachste Einbindungsmöglichkeit. Die beste Auflösung insgesamt bieten die Synchrotron-Aufnahmen des PSI TOMCAT mit 1,625 μ m.

3.6. Oberflächenmessungen der FFPE-Blöcke zeigen ungerade Oberfläche im Profil

Zusätzlich zu den μ CT-Scans, wurden Oberflächenscans durchgeführt. Die vorliegende Probe wird als exemplarisches Beispiel gezeigt. In der Heatmap (s. Abbildung 27a) ist in der Farbskala links oben der Höhenunterschied farblich angegeben. In Rot sind die höchsten Regionen (ca. 160 μ m) angegeben, während in blau die niedrigsten Areale der Proben gezeigt werden. Zu sehen ist, dass die entparaffinierte Probe im Bereich des Gewebes deutlich erhoben ist. Der Paraffinbereich, welcher sich umliegend um das Gewebe befindet, ist nahe den 0 μ m.

Im Oberflächenprofil (s. Abbildung 27b) ist sichtbar, dass die Höhe der Probe zu einer Seite etwas abfällt. Der Höhenunterschied der gesamten Probe bewegt sich in einem Bereich von 0 bis 162,5 μ m.

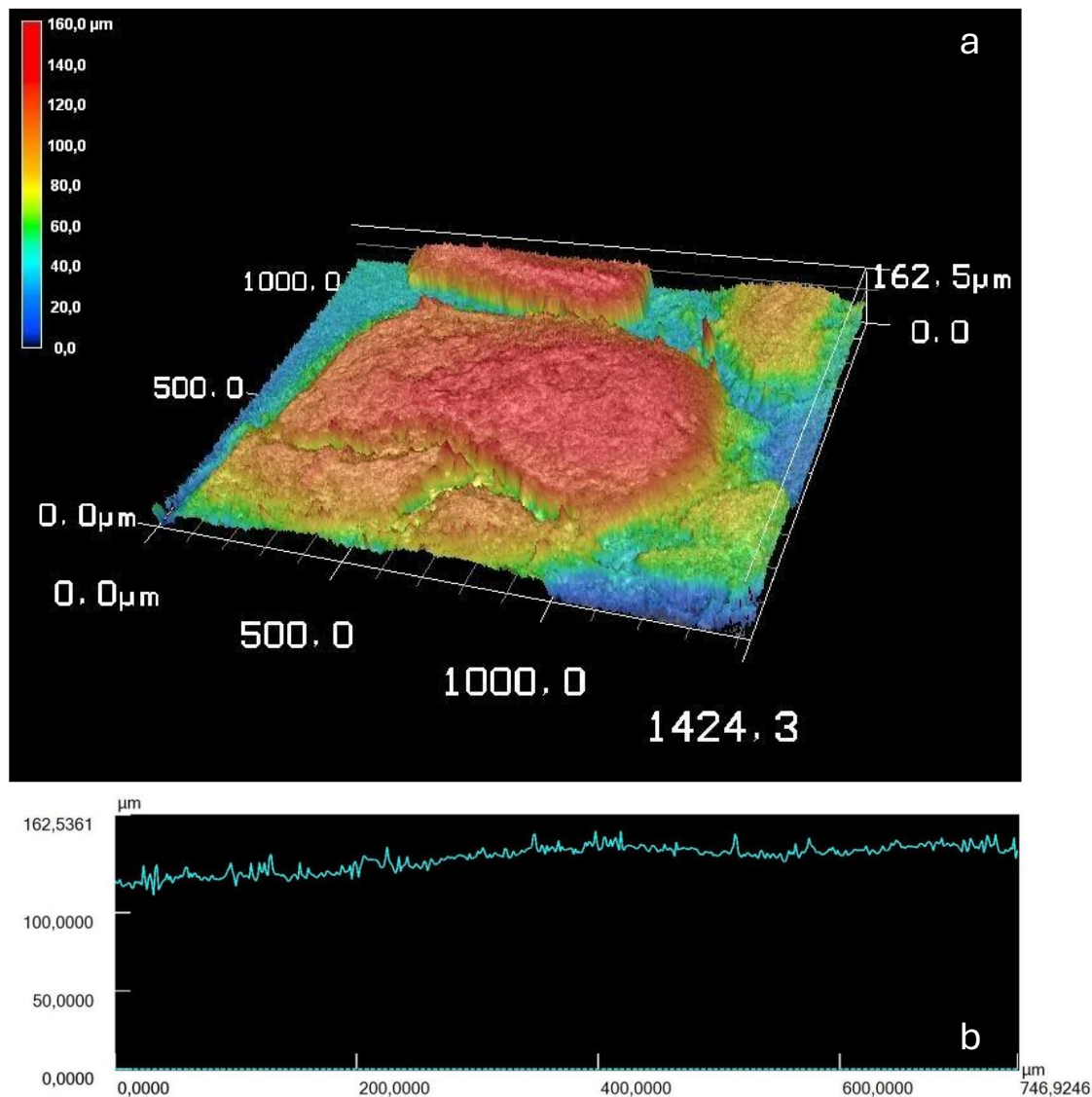


Abbildung 27: Oberflächenmikroskopischer Scan mittels eines 3D-Laserscanningmikroskops einer oberflächlich entparaffinierten Probe von Tonsillengewebe im FFPE-Block. (a) Heatmap, welche zeigt, dass das Gewebe aus dem Paraffin hervorsticht und einen gesamten Höhenunterschied von 162,5 µm über die gesamte Oberfläche aufweist. (b) Oberflächenprofil in µm, welches die Beschaffenheit der Probe angibt.

3.7. Die annotierten Keimzentren zeigen eine Kreisähnlichkeit zwischen 0,8 und 1,1

Innerhalb von der Tonsillen-Probe 2022_26 sind zudem Keimzentren vorhanden. Von den vorhandenen Keimzentren wurden exemplarisch drei ausgewählt, um die Kreisähnlichkeit der Keimzentren zu bestimmen. Diese ist unter anderem ein Maß für pathologische Veränderungen.

In der folgenden Tabelle 25 sind die Daten zu den einzelnen Keimzentren dargestellt, mit denen anschließend die Kreisähnlichkeit berechnet wurde.

Tabelle 25: Keimzentren ($n = 3$) aus Probe 2022_26 mit je 3 extrahierten Ebenen. Angabe des Volumens und der Oberfläche der Keimzentren in 3D aus dem annotierten µCT-Datensatz. Innerhalb in den je 3 extrahierten Ebenen (2D) wurden der Kreisumfang, die Fläche und anschließend die Kreisähnlichkeit der Annotationen der Keimzentren errechnet.

Keimzentrum	Volumen (mm ³)	Oberfläche(mm ²)	Ebene	Umfang (mm)	2D- Fläche (mm ²)	Kreisähnlichkeit ($4 * \pi * \text{Fläche}$) / (Umfang ²)
-------------	-------------------------------	------------------------------	-------	----------------	-------------------------------------	---

Keimzentrum 1	7,39	0,2	1	0,65	0,03	0,88
Keimzentrum 1	NA	NA	2	0,78	0,05	0,95
Keimzentrum 1	NA	NA	3	0,59	0,03	0,89
Keimzentrum 2	7,68	0,21	1	0,67	0,04	1,01
Keimzentrum 2	NA	NA	2	0,8	0,05	0,98
Keimzentrum 2	NA	NA	3	0,54	0,02	0,95
Keimzentrum 3	1,24	0,29	1	0,87	0,05	0,9
Keimzentrum 3	NA	NA	2	0,89	0,06	0,89
Keimzentrum 3	NA	NA	3	0,6	0,03	0,87

In Abbildung 28 sind die Werte für die Kreisähnlichkeit graphisch dargestellt. Dabei zeigt sich, dass Keimzentrum 2 mit seinen Werten der Kreisähnlichkeit in jeder Ebene dem Wert 1, welcher einen perfekten Kreis beschreibt [149], am nächsten.

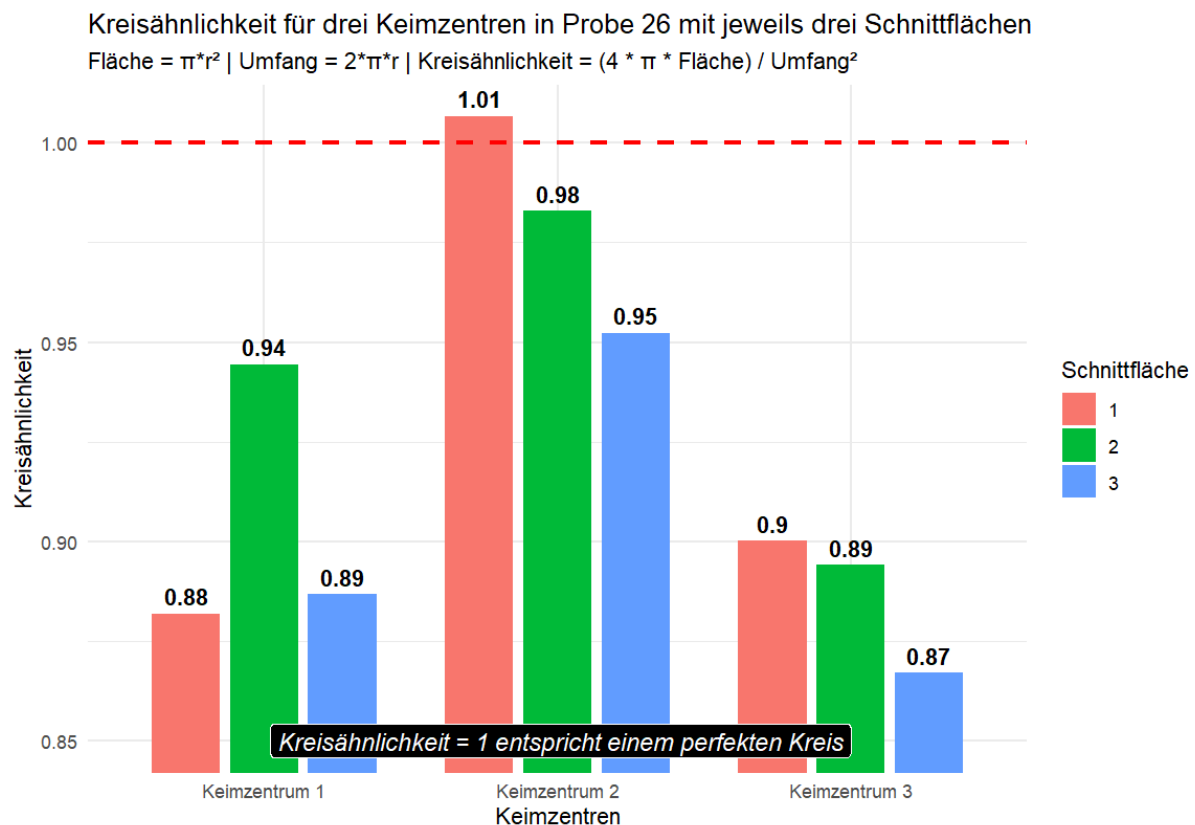


Abbildung 28: Graphische Darstellung der errechneten Kreisähnlichkeit der Keimzentren ($n = 3$). Auf der y-Achse ist der Wert der Kreisähnlichkeit aufgetragen. Auf der x-Achse sind die drei verschiedenen Keimzentren aufgetragen. In der Legende sind die einzelnen Schnittflächen farblich codiert.

3.8. Anhand der Annotationsdaten konnte ein Algorithmus für Ebenenfindung erstellt werden, der das automatisierte Wiederfinden der histologischen Schnittpräparate im μ CT-Datensatz ermöglicht

Im Anschluss an die μ CT-Aufnahmen wurden von den Proben histologische Schnittpräparate angefertigt. Im Anschluss wurden die Präparate gescannt und diese Scans wurden den Projektpartnern von ImFusion zur Verfügung gestellt. In Kooperation mit den Projektpartnern von ImFusion wurde ein Algorithmus entwickelt, der in der Lage ist, den histologischen Schnitt der jeweiligen Probe im μ CT-Datensatz zu identifizieren. Dieser Algorithmus wurde auf Grundlage der in dieser Arbeit verwendeten Daten (histologische Schnittpräparate, μ CT-Datensätze der Kohorte und Annotationen dieser Daten) erstellt und trainiert.

Im Rahmen des HORUS-Projekts wurde in Kooperation mit ImFusion ein Bildregistrierungsverfahren entwickelt, das in zwei aufeinanderfolgende Optimierungsschritte unterteilt ist: Zunächst wird eine 2D-3D-Registrierung durchgeführt, bei der eine LC2-basierte Ähnlichkeitsmetrik zum Einsatz kommt. Ein dafür trainiertes Convolutional Neural Network (CNN) approximiert den Punktproduktvergleich der Merkmalskarten zweier Eingabebilder und ermöglicht so eine schnelle und weitreichende Optimierung, die die anfängliche Position der histologischen Schnittebene bestimmt. Aufbauend auf der initialen Schätzung wird die Schnittebene mittels eines analytischen Ansatzes verfeinert. Ein Freiformdeformationsmodell (FFD) berücksichtigt dabei Verformungen außerhalb der Ebene, während die lokale normalisierte Kreuzkorrelation (LNCC) als Gütefunktion für die gleichzeitige Optimierung der Ebenenposition und der Deformationsparameter dient. Die optimierten Lage- und Deformationsparameter werden anschließend genutzt, um eine 2D- μ CT-Schicht aus dem CT-Volumen zu extrahieren, die in der folgenden 2D-2D-Registrierung weiterverarbeitet wird (s. Abbildung 29).

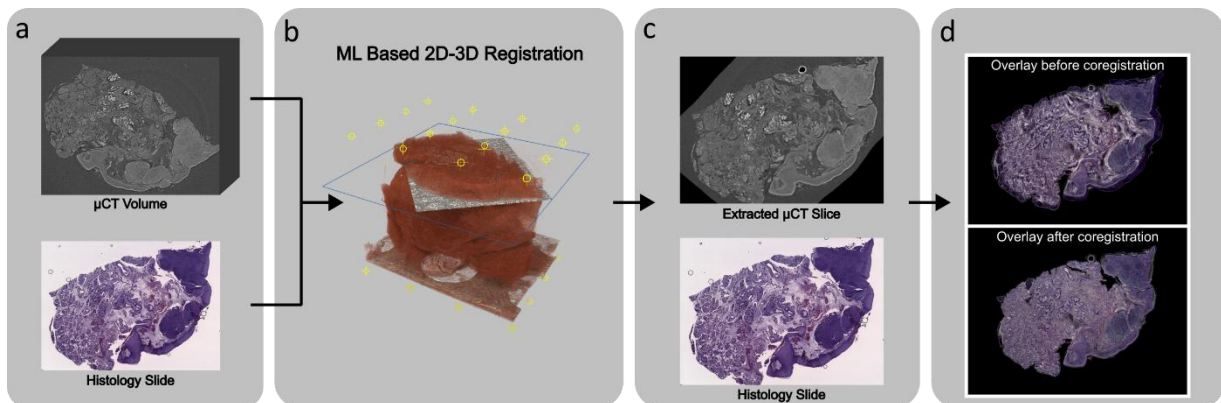


Abbildung 29: Registrierte Histologie-Objekträger und die μ CT-Schicht unter Verwendung der ML-basierten 2D-3D-Registrierungsmethode. Die Bilder wurden teilweise in [2] veröffentlicht. Wiederverwendung mit Genehmigung. (a) Das eingegebene μ CT-Volumen und das histologische Präparat eines Tonsillengewebes. (b) Eine Visualisierung der 2D-3D-Registrierung. Die gelben Markierungen über und unter dem Volumen sind FFD-Kontrollpunkte, die das Profil der Schnittebene definieren. (c) Die ausgegebene μ CT-Schicht und der Histologie-OT nach der 2D-3D-Registrierung. (d) Überlagerung zwischen der μ CT und dem Histologiebild nach einem Workflow zur Verfeinerung der 2D-2D-Registrierung.

Zu sehen ist, dass die Ebene mithilfe des zweistufigen Algorithmus im μ CT-Datensatz mit einer Genauigkeit von $\pm 20 \mu\text{m}$ [2] reidentifiziert werden kann.

Der zweistufige Algorithmus wurde weiterhin dazu verwendet, die angefertigten Multiplex-Färbungen näherungsweise im jeweiligen μ CT-Datensatz zu relokalisieren.

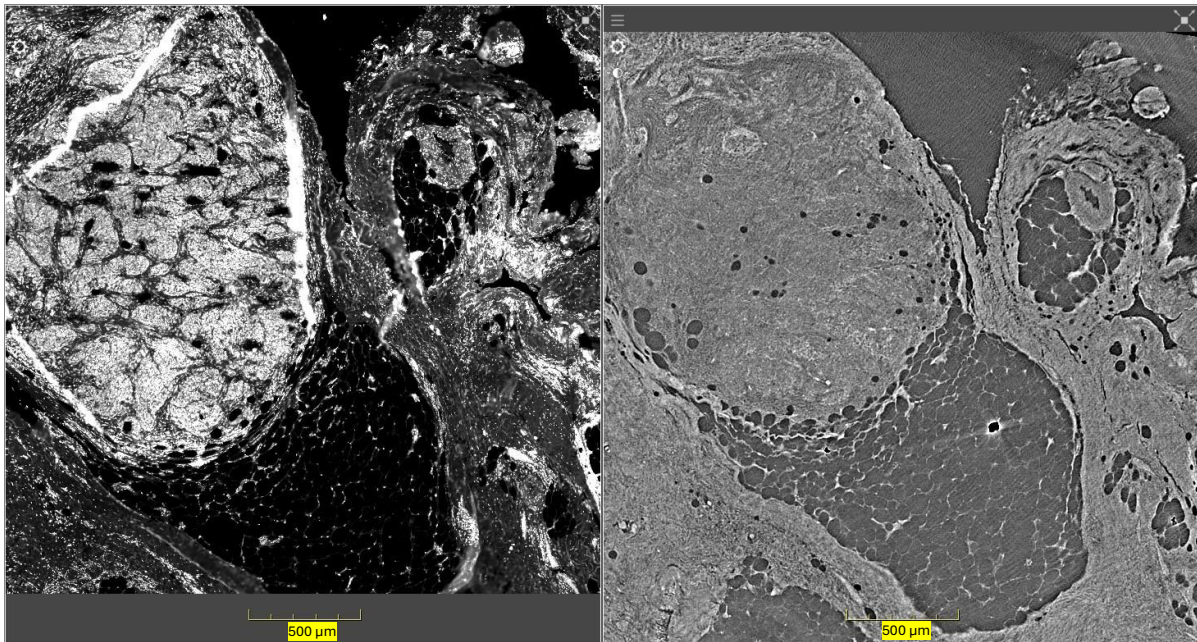


Abbildung 30: Multiplex-ROI der Probe 2023_09_02 mit der gematchten μ CT-Ebene. Der Skalenbalken gibt 500 μ m an.

In Abbildung 30 ist links die in der Multiplex-Färbung mit den verwendeten Markern (s. Tabelle 8) auf dem Glasobjektträger gefärbte korrespondierende Lymphknotenmetastase dargestellt, während rechts die durch den zweistufigen Algorithmus zur Ebenenfindung herausgesuchte Ebene des 3D- μ CT-Datensatzes veranschaulicht wird. Es wird deutlich, dass die Diskrepanz zwischen Schnitt und μ CT-Bild insbesondere in den Randbereichen der Probe signifikant ist, der Algorithmus jedoch trotz dieser Diskrepanz die Ebene identifizieren konnte.

3.9. Das Training der künstlichen Intelligenz zur automatisierten Annotation erfolgte anhand der manuellen Annotationsdaten

Zu dem Training der künstlichen Intelligenz wurden die in HORUSkop angefertigten manuellen Annotationsdaten der μ CT-Datensätze verwendet. Die Trainingsmenge der Tonsillen-Proben umfasst 708 manuell annotierte Ebenen, während die Validierungs- und Testmenge 94 bzw. 101 manuell annotierte Ebenen beinhaltet. Die Trainingsmenge für die Tumor-Proben umfasst 5100 annotierte Ebenen. Auf Grundlage dieser Daten wurden von ImFusion verschiedene U-Net- und DiceLoss-Modelle trainiert. Für die Tonsillen-Proben wurden insgesamt neun Marker, welche zuvor manuell annotiert wurden, vom Modell erkannt. Dabei wurde exemplarisch mit der Probe 2022_26 gearbeitet, um einen Ausblick zu gewähren.

Die folgenden Ergebnisse wurden anhand der in dieser Arbeit erstellten Annotationsdaten durch die Kooperationspartner von ImFusion erhoben.

Für die Tumورproben wurde sich auf ROIs beschränkt. Durch das bereits vorhandene Modell konnte abgeschätzt werden, dass eine bessere Erkennung von Tumor zu Nicht-Tumor möglich war. Daher wurden nur zwei Marker und Hintergrund zum Training des Modells genutzt.

Die mit Exciscope erfassten Phasenkontrast- μ CT-Volumina wurden zum Training des Segmentierungsmodells herangezogen. Die Extrahierung der 2D- μ CT-Schichten erfolgt aus den annotierten 3D- μ CT-Volumina, um ein 2D-Segmentierungsmodell zu trainieren. Im Rahmen dieser Arbeit findet ein gut etabliertes Segmentierungs-Faltungsnetz, das sogenannte U-Net [150], Anwendung.

Innerhalb der Datenvorverarbeitung werden die Eingabebilder auf einen Bereich von (0, 1) normalisiert und einer Neuabtastung mit einem Abstand von 10,4 μm unterzogen (was einem vierfachen Downsampling entspricht). Hinsichtlich der Sampling-Strategie erfolgt die Extraktion zufälliger ROIs mit einer Größe von 256 * 256 Pixeln. Als kombinierter Verlust wird ein Würfelverlust in Kombination mit einem Kreuzentropieverlust verwendet, wobei der Würfelverlust mit einer Gewichtung von 0,2 und der Kreuzentropieverlust mit einer Gewichtung von 1,0 berücksichtigt wird. Der Validierungsverlust konnte nach 150 Epochen von 0,24 auf 0,08 verbessert werden.

Die vorhergesagten 2D-Annotationskarten werden zu einem späteren Zeitpunkt gestapelt, um ein 3D-Annotationskartenvolumen für die weitere Verwendung zu generieren.

3.10. Der Vergleich manueller Annotation gegen KI-Annotation konnte für die Genauigkeit der Annotation der Tonsillen-Probe einen Dice-Score von 0,57 und für die Tumorprobe einen Dice-Score von 0,71 erreichen

Die manuelle Annotation der verschiedenen Marker in den einzelnen FFPE-Tonsillen-Proben diente dem zuvor beschriebenen Training eines KI-Modells. Aufgrund der geringen Anzahl an Bilddaten erfolgte ein erster Vergleich auf den identischen Datensätzen unter Anwendung des zuvor trainierten KI-Modells. Die folgenden Ergebnisse wurden anhand der in dieser Arbeit erstellten Annotationsdaten durch die Kooperationspartner von ImFusion erhoben.

Abbildung 31 zeigt den Vergleich der manuellen Annotation mit der ML-gestützten Annotation eines Tonsillengewebes (oben) und eines Tumorgewebes (unten). Die folgenden Strukturen wurden in der Phasenkontrast-CT der Tonsillen-Probe identifiziert: Die manuelle Annotation führte zu Erkennung folgender Strukturen: Keimzentren, lymphatisches Gewebe, Bindegewebe, Muskelgewebe, Fettgewebe, Plattenepithel, Speicheldrüsen sowie venöse und arterielle Gefäße. Die zunächst manuell annotierten Strukturen wurden anschließend mit KI annotiert. Im Falle der Tonsillen-Proben wurde Fettgewebe als kleinste erkennbare Struktur identifiziert. In einem Testsatz erreichte die ML-Annotation einen Dice-Gesamtwert von 0,57. Dieser Wert beschreibt die Genauigkeit der Überlagerung von KI-Annotation mit der manuellen Annotation.

Die Erkennung einzelner Zellkerne war bei den Tumorproben, die mit Synchrotronstrahlung aufgenommen wurden, gewährleistet. Allerdings wurden nur zwei Tumorgewebe für das Training des ML-Segmentierungsmodells berücksichtigt.

Abbildung 31 (unten) zeigt ein μCT einer Tumorprobe und den Vergleich zwischen der manuellen und der ML-Annotation. Das Ergebnis der ML-Annotation zeigt eine Erkennung von Tumorgewebe und erreicht einen durchschnittlichen Dice-Score von 0,71 in den Segmentierungsklassen.

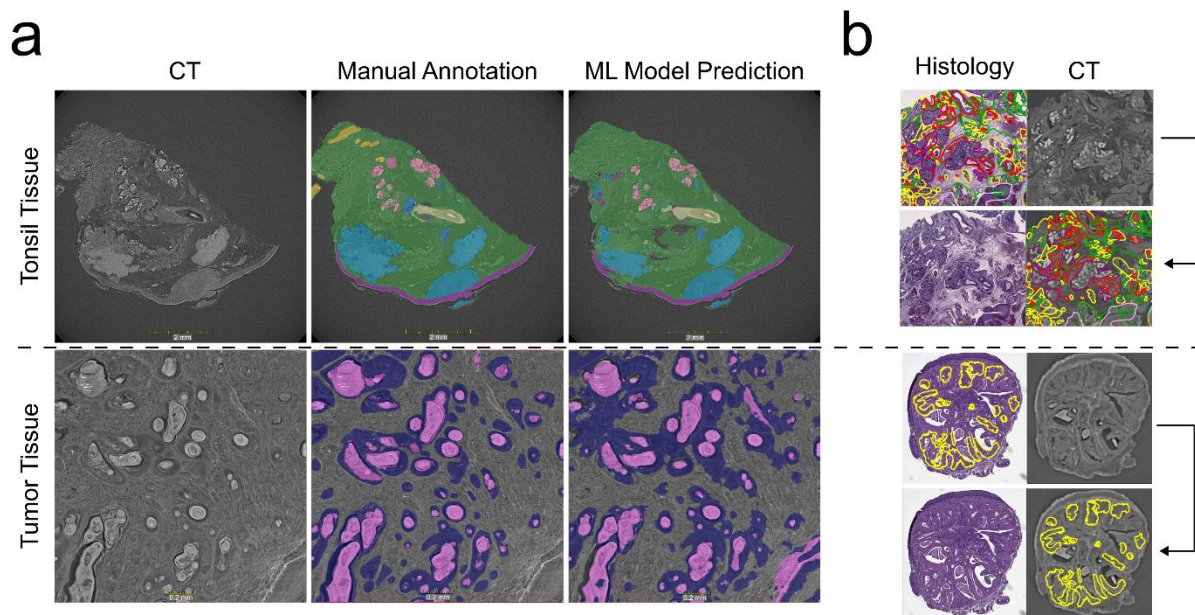


Abbildung 31: (a) Vergleich der manuellen Annotation zu der Annotation der KI auf den Datensätzen der Tonsillen-Probe 2022_26 (oben) und der Tumorseite 2023_04_01 (unten). Die Farben entsprechen den folgenden Markern: Lila: Plattenepithel, Blau: lymphatisches Gewebe, Rot: Keimzentren, Grün: Bindegewebe, Gelb: Muskelgewebe, Rosa: Speicheldrüsen, Orange: Fettgewebe, Hellgelb: venöse Gefäße, blau: arterielle Gefäße, pink: verhorntes Tumorgewebe und dunkelblau: weiches Tumorgewebe. (b) Demonstration der Übertragung von Annotationen von der Histologie auf das CT nach einem räumlichen 2D-3D-Matching über den vorgeschlagenen Bildregistrierungsworkflow.

Außerdem konnten die Volumendaten der KI-Annotation mit denen der manuellen Annotation verglichen werden, um so eine Genauigkeitsangabe der KI-Annotation machen zu können.

Tabelle 26: Volumendaten der Annotation im mm^3 durch die KI gegen die der manuellen Annotation der einzelnen Marker, welche in der Tonsillen-Probe Probe 2022_26 und der Tumorseite 2023_04_01 verwendet wurden.

Marker/Probenname	2022_26, manuell	2022_26, KI
Keimzentren	1,23446	0,25115
Lymphatisches Gewebe	18,86118	26,71032
Muskeln	24,22009	0,1364
Bindegewebe	46,77687	49,80358
Plattenepithel	5,41444	4,89134
Fettgewebe	0,19105	0
Speicheldrüsen	2,1099	1,45045
Arterielle Gefäße	0,18333	0,11592
Venöse Gefäße	0,38644	0,30375

Marker/Probenname	2023_04_01, manuell	2023_04_01, KI
Verhorntes Krebsgewebe	0,17292	0,17983
Weiches Krebsgewebe	0,40458	0,39106

Die Werte der Tabelle 26 werden im Folgenden noch einmal graphisch dargestellt. Da die Spearman-Korrelation einen p-Wert von 0,00984 ausgibt, bedeutet dies, dass wenn in der manuellen Annotation das Gewebe mit einem hohen Anteil vorkommt, es in der KI-Annotation

ebenfalls zu einem hohen Anteil vorkommt. Daher unterscheiden sich manuelle Annotation und KI-Annotation hinsichtlich der Rangfolge nicht signifikant voneinander.

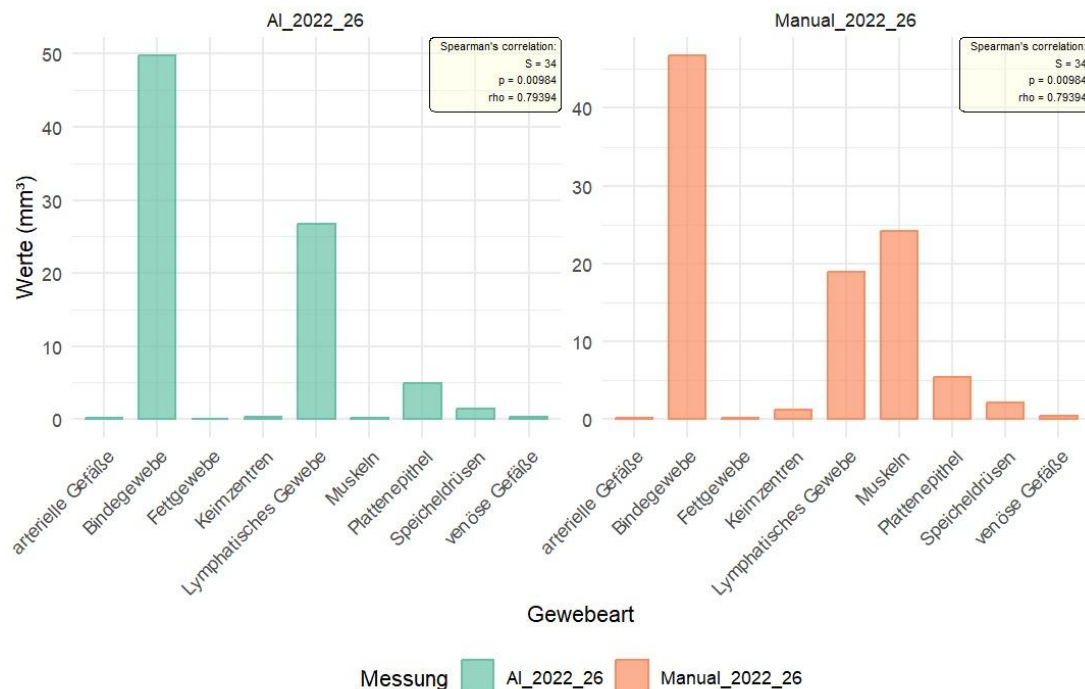


Abbildung 32: Graphischer Vergleich der manuellen zur KI-Annotation von Probe 2022_26. In Blau dargestellt ist die KI-Annotation, in Rot dargestellt ist die manuelle Annotation. Auf der y-Achse sind die Volumenwerte der Annotationen in mm³ dargestellt, auf der x-Achse die jeweilige Art des Gewebes. Die Werte der Spearman-Korrelation sind S = 34, p = 0,00984 und $\rho = 0,79394$.

Im Vergleich von KI-Annotation zu manueller Annotation für die Tonsillen-Probe 2022_26 (s. Abbildung 32) ist deutlich zu erkennen, dass die KI etwas mehr positive Strukturen in der Probe erkennt als in der manuellen Annotation. Bindegewebe und lymphatisches Gewebe wurden von der KI ähnlich gut erkannt. Muskeln, Fettgewebe und Keimzentren werden allerdings deutlich schlechter von der KI erkannt als in der manuellen Annotation.

In Abbildung 33 zeigt die Spearman-Korrelation einen p-Wert von 1. Dies bedeutet, dass die Spearman-Korrelation aufgrund zu wenig erhobener Daten keine Aussage treffen kann. Allerdings kann man die Aussage, dass wenn in der manuellen Annotation das Gewebe mit einem hohen Anteil vorkommt, es in der KI-Annotation ebenfalls zu einem hohen Anteil vorkommt, übertragen. Die manuelle Annotation und KI-Annotation unterscheiden sich nicht signifikant voneinander.

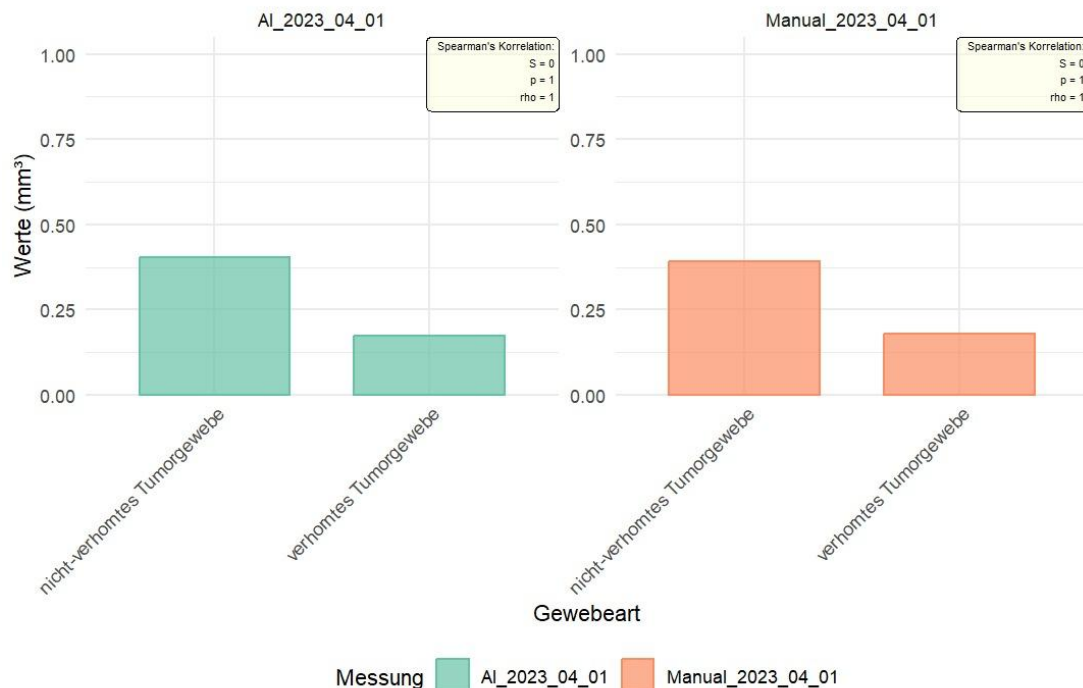


Abbildung 33: Graphischer Vergleich der manuellen zur KI-Annotation von Probe 2023_04_01. In Blau dargestellt ist die KI-Annotation, in Rot dargestellt ist die manuelle Annotation. Auf der y-Achse sind die Volumenwerte der Annotationen in mm³ dargestellt, auf der x-Achse die jeweilige Art des Gewebes. Dort wurde zwischen verhorntem Tumorgewebe und weichem Tumorgewebe unterschieden. Die Werte der Spearman-Korrelation sind $S = 0$, $p = 1$ und $\rho = 1$.

Die Abbildung 33 zeigt den Vergleich zwischen KI-Annotation zu manueller Annotation für die Tumorphobie 2023_04_01. Für die Tumorphobie wurde sich nur auf eine Annotation des Tumorgewebes (verhornt und nicht-verhornt) beschränkt. Es ist erkennbar, dass die KI-Annotation sehr ähnlich zur manuellen Annotation ist.

3.11. Die Übertragung von H&E-Annotationsdaten auf μ CT-Datensätze ermöglicht eine Annotation von Strukturen bis zu 0,4 μ m Größe bei einer μ CT-Auflösung von 1 – 5 μ m mit einer Genauigkeit, die mit Dice-Werten von 0,61 für die Tonsille und 0,78 für die Tumor-Probe bestimmt wurde

Aufgrund der zuvor hergestellten räumlichen Übereinstimmung zwischen Histologie-Objektträgern und μ CT-Schichten können die Annotationen zwischen den beiden Modalitäten übertragen werden. Die folgenden Ergebnisse wurden anhand der in dieser Arbeit erstellten Annotationsdaten durch die Kooperationspartner von ImFusion erhoben.

Wie in Abbildung 31b (oben) gezeigt, wurde eine Annotation auf dem histologischen Schnitt mit Tonsillengewebe mittels QuPath erstellt. Nach der Registrierung zwischen Histologie und μ CT lässt sich die Annotation auf die entsprechenden Gewebe im μ CT übertragen. Abbildung 31b (unten) zeigt einen ähnlichen Prozess zwischen dem histologischen Schnitt mit Tumorgewebe und dem entsprechenden μ CT.

Um die Genauigkeit des vorgeschlagenen Annotationstransfers zu bewerten, wurden einige sichtbare Gewebe auf den registrierten μ CT-Ebenen direkt manuell annotiert und dann die Dice-

Metrik zwischen dieser Annotation und der übertragenen Annotation berechnet. Die Werte der Dice-Metrik für die beiden in Abbildung 31b dargestellten Datensätze betragen 0,61 bzw. 0,78.

3.12. Korrelation der Annotationsdaten aller annotierten ROIs für die Marker verhorntes und nicht-verhorntes Tumorgewebe mit klinischen Daten, die zur Durchführung der Diagnostik erhoben wurden

Die Annotationsdaten des Tumorgewebes wurden mit den klinischen Daten aus Tabelle 16 statistisch korreliert. Verwendet wurde dafür eine Spearman-Korrelation. In Tabelle 27 sind die Annotationsdaten zu den Markern in der Probe gelistet. Zu beobachten ist, dass nicht in allen Proben verhorntes Tumorgewebe vorhanden ist.

Tabelle 27: Volumendaten der Annotationen aus allen annotierten ROIs der Tumorproben (n = 17). Die angegebenen Werte sind in mm³. Aufgelistet sind nur die Werte der Annotationen des Tumorgewebes. Dies ist die Summe aus 5100 annotierten Ebenen der Tumorproben.

Probe (ROI)	verhorntes Tumorgewebe	nicht-verhorntes Tumorgewebe
2023_02_01	0	0,14
2023_12_02	0	0,17
2023_11_01	0	0
2023_13_01	0,03	0,66
2023_04_01	0,18	0,39
2023_05_01	0	0,65
2023_04_02	0,18	0,66
2023_01_01	0	0,59
2023_15_02	0	0,79
2023_07_02	0,35	0,27
2023_08_01	0	0,18
2023_09_02	0	0,55
2023_12_01	0	0,23
2023_11_02	0,19	0,51
2023_10_02	0	0,84
2023_01_02	0	0,29
2023_02_02	0	0,92

3.12.1. Zwischen den Eigenschaften Verhornung und HPV-Status besteht kein signifikanter Unterschied (p = 0,7508) und keine Korrelation (p = 0,08321787)

Die Daten zum HPV-Status Tabelle 16 und Tabelle 27 wurden statistisch korreliert und in der Abbildung 34 graphisch dargestellt. Der Spearman-Korrelationskoeffizient ρ beträgt 0,083. Die statistische Signifikanz, der p-Wert, betrug 0,751.

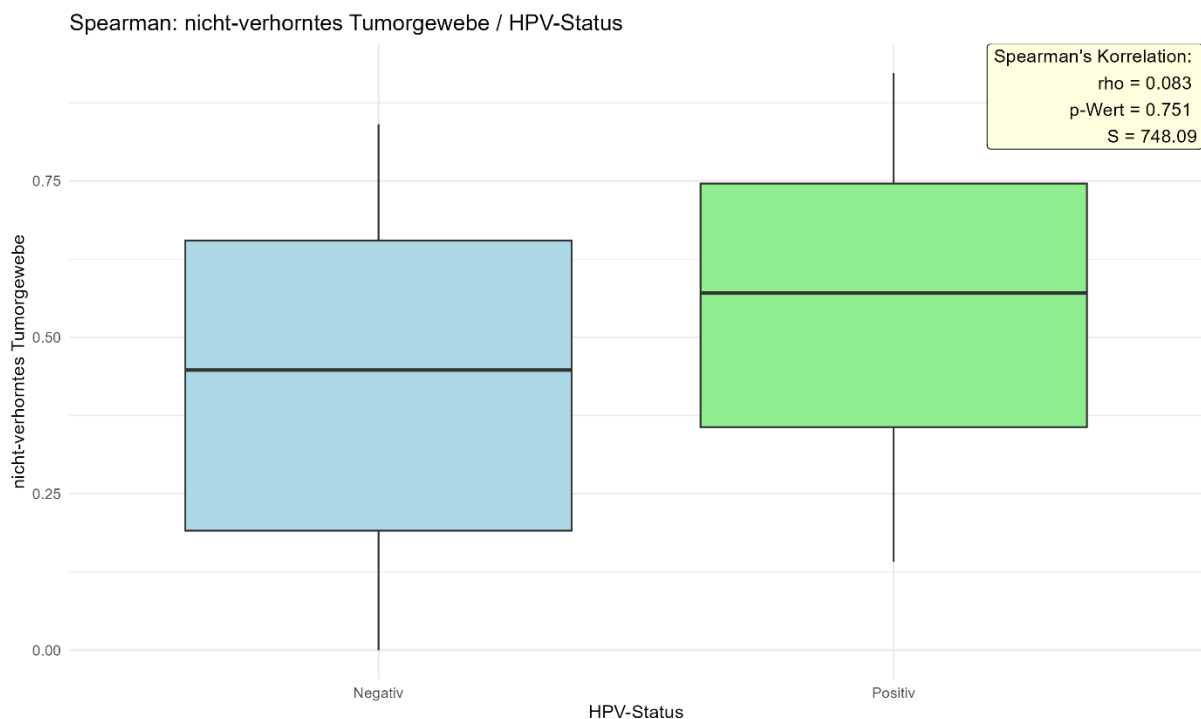


Abbildung 34: Darstellung des Volumenanteils des nicht-verhornten Tumors mit dem HPV-Status als Boxplot für die Stichprobenanzahl $n = 17$ (s. Tabelle 27). Die x-Achse bezeichnet des jeweiligen HPV-Status, die y-Achse zeigt den Wert des Volumenanteils für nicht-verhorntes Tumorgewebe. Blau: Volumenanteil des nicht-verhornten Tumorgewebes zu negativem HPV-Status. grün: Volumenanteil des nicht-verhornten Tumorgewebes zu positiven HPV-Status pro Probe. Der Median liegt bei 0.447825 (blau) und 0.57091 (grün). Die Standardabweichung liegt bei 0.275692 (blau) und 0.295072 (grün). Spearman-Korrelationskoeffizient $\rho = 0,083$, $p\text{-Wert} = 0,751$, $S = 748,09$.

3.12.2. Korrelation und Testung auf signifikante Zusammenhänge für die Parameter HPV-Status, Geschlecht, Lebensstatus, Immuntherapie und Tumor-Grading mit den Annotationsdaten für Verhornung und nicht-Verhornung zeigt keine signifikanten Zusammenhänge von Annotationsdaten mit den Parametern

In Abbildung 35 sind die Daten für nicht-verhorntes Tumorgewebe (s. Abbildung 35a) und verhorntes Tumorgewebe (s. Abbildung 35b) mit den klinischen Daten aus Tabelle 16 graphisch dargestellt und mittels Spearman-Korrelation untersucht worden.

Die Daten für den HPV-Status zu nicht-verhorntem Tumorgewebe sind bereits dargestellt worden (s. Abbildung 34). Die Korrelation für den HPV-Status zu verhorntem Tumorgewebe ist zusätzlich berechnet worden (s. Abbildung 35b). Diese zeigt einen S-Wert von 895,974, ρ von -0,098 und ein p von 0,708. Es gibt eine sehr schwache und nicht signifikante negative Korrelation zwischen dem HPV-Status und dem Ausmaß des verhornten Tumorgewebes.

Die Spearman-Korrelation von nicht-verhorntem Tumorgewebe und Geschlecht der Patient:innen zeigt einen Spearman-Korrelationskoeffizienten ρ von 0,144, einen S-Wert von 698,221 und einen p -Wert von 0,5805. Es gibt eine schwache positive monotone Beziehung zwischen "nicht-verhorntem Tumorgewebe" und dem Geschlecht (s. Abbildung 35a). Die Korrelation zwischen Geschlecht und verhorntem Tumorgewebe (s. Abbildung 35b) zeigt einen S-Wert von 1303,142, einen p -Wert von 0,0114 und ρ von -0,597. Es gibt eine mäßig starke negative Korrelation zwischen dem Geschlecht und dem Ausmaß des verhornten Tumorgewebes.

Es gibt eine schwache positive monotone Beziehung zwischen "nicht-verhorntem Tumorgewebe" und dem Lebensstatus (s. Abbildung 35a). Der S-Wert liegt bei 659,449, der p-Wert bei 0,461 und das ρ bei 0,192. Für das verhornte Tumorgewebe und dem Lebensstatus gibt es fast keine Korrelation (s. Abbildung 35b). Der S-Wert liegt bei 819,349, der p-Wert bei 0,988 und ρ bei -0,004.

Zwischen nicht-verhorntem Tumorgewebe und dem Erhalten einer Immuntherapie konnte eine schwache monotone Beziehung festgestellt werden (s. Abbildung 35a). Der S-Wert liegt bei 608,114, der p-Wert bei 0,324 und der Spearman-Korrelationskoeffizient ρ bei 0,255. Es gibt eine schwache bis mäßige negative Korrelation zwischen Immuntherapie und dem Ausmaß des verhornten Tumorgewebes (s. Abbildung 35b). Hier liegt der S-Wert bei 1102,609, der p-Wert bei 0,167 und ρ bei -0,351.

Die Spearman-Korrelation von nicht-verhorntem Tumorgewebe und dem Grading des Tumors auf der Ordinalskala zeigt eine schwache positive monotone Beziehung (s. Abbildung 35a). Der S-Wert liegt bei 651,978, der p-Wert bei 0,439 und ρ bei 0,201. Es gibt eine mäßige negative Korrelation zwischen dem Grading und dem Ausmaß des verhornten Tumorgewebes (s. Abbildung 35b). Der S-Wert liegt bei 1197,602, der p-Wert bei 0,058 und ρ bei -0,468.

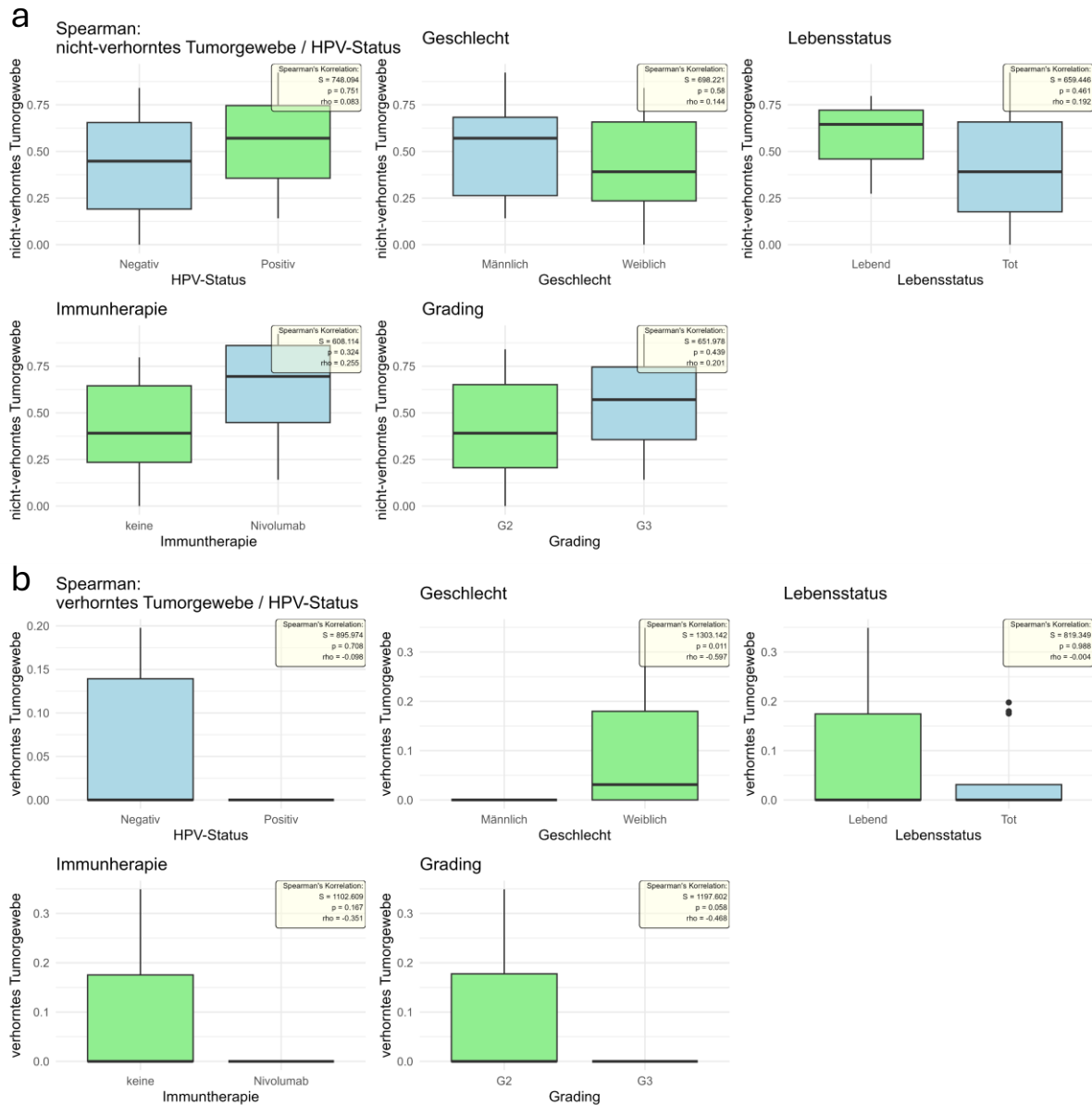


Abbildung 35: Darstellung des Volumenanteils der Tumorgewebsarten in Bezug zu verschiedenen klinischen Daten als Boxplot für die Stichprobenanzahl $n = 17$ (s. Tabelle 27) und den zugehörigen Korrelationskoeffizienten jeweils rechts oben. Die x-Achse bezeichnet den Status des jeweiligen klinischen Parameters, die y-Achse zeigt den Wert des Volumenanteils für nicht-verhorntes (a) oder verhorntes (b) Tumorgewebe. Blau: Volumenanteil des nicht-verhornten Tumorgewebes zu negativem HPV-Status. grün: Volumenanteil des nicht-verhornten Tumorgewebes zu positivem HPV-Status pro Probe. (a) Zu sehen ist von links nach rechts das Volumenverhältnis des nicht-verhornten Tumorgewebes (s. Tabelle 27) zu HPV-Status (negativ (blau), positiv (grün)), Geschlecht (männlich (blau), weiblich (grün)), Lebensstatus (Lebend (grün), Tot (blau)), Immuntherapie (keine (grün), Nivolumab (blau)) und Grading (G2 (grün), G3 (blau)). (b) Zu sehen ist von links nach rechts das Volumenverhältnis des verhornten Tumorgewebes (s. Tabelle 27) zu HPV-Status (negativ (blau), positiv (grün)), Geschlecht (männlich (blau), weiblich (grün)), Lebensstatus (Lebend (grün), Tot (blau)), Immuntherapie (keine (grün), Nivolumab (blau)) und Grading (G2 (grün), G3 (blau)).

3.13. Verhornte Plattenepithelkarzinome nahmen einen signifikant kleineren Anteil am Probenvolumen ein als unverhornte Plattenepithelkarzinome

Das Verhältnis der verschiedenen Gewebearten des Tumors zueinander konnte für einige Proben bestimmt werden, wobei das Gesamtvolumen des Tumors in der ROI sowie das Annotationsvolumen der Tumorfläche im dreidimensionalen Datensatz als Parameter dienen.

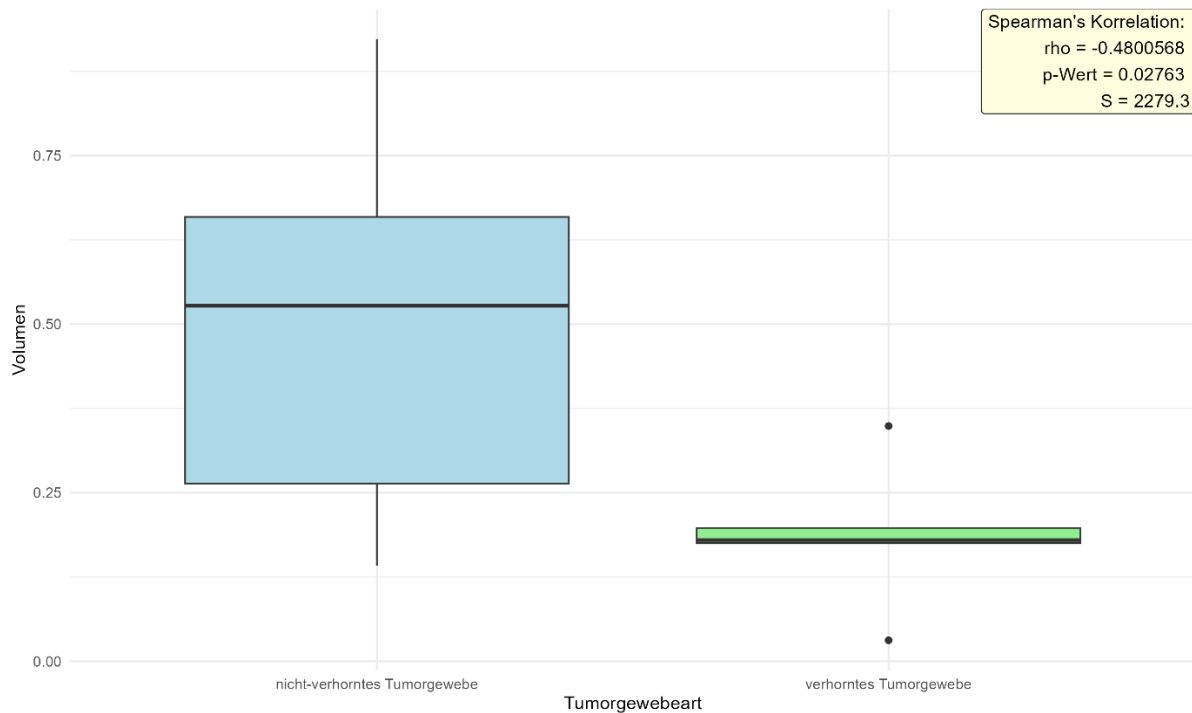


Abbildung 36: Darstellung des Volumenanteils der Tumorgewebearten als Boxplot für die Stichprobenanzahl $n = 5$ (s. Tabelle 27). Die x-Achse bezeichnet die jeweilige Gewebeart, die y-Achse zeigt den Wert des Volumenanteils. Blau: nicht-verhorntes Tumorgewebe grün: verhorntes Tumorgewebe pro Probe. Der Median für verhorntes Tumorgewebe liegt bei 0,1798, die Standardabweichung bei 0,1128. Der Median für nicht-verhorntes Tumorgewebe liegt bei 0,5273 und die Standardabweichung bei 0,2563. Die Werte der Spearman-Korrelation lagen bei $p = -0,48$, p -Wert = 0,02763 und $S = 2279,3$.

Das Verhältnis konnte nicht für alle annotierten ROIs errechnet werden, da einige Proben innerhalb der annotierten ROI keinen verhornten Tumor zeigten (s. Tabelle 27). Der Median für nicht-verhorntes Tumorgewebe liegt bei 0,5273 und die Standardabweichung bei 0,2563. Die Werte der Spearman-Korrelation lagen bei $p = -0,48$, p -Wert = 0,02763 und $S = 2279,3$.

3.14. Die Gefäßdaten in den ROIs der Tumorproben zeigen den Gefäßverlauf im Vergleich zum Tumorgewebe

Im Rahmen von HORUS wurden die Gefäßdaten der Tumorproben analysiert. Zur Veranschaulichung sei an dieser Stelle Abbildung 37 präsentiert, welche die Annotation und 3D-Darstellung von Gefäßen in einer Tumorprobe veranschaulicht.

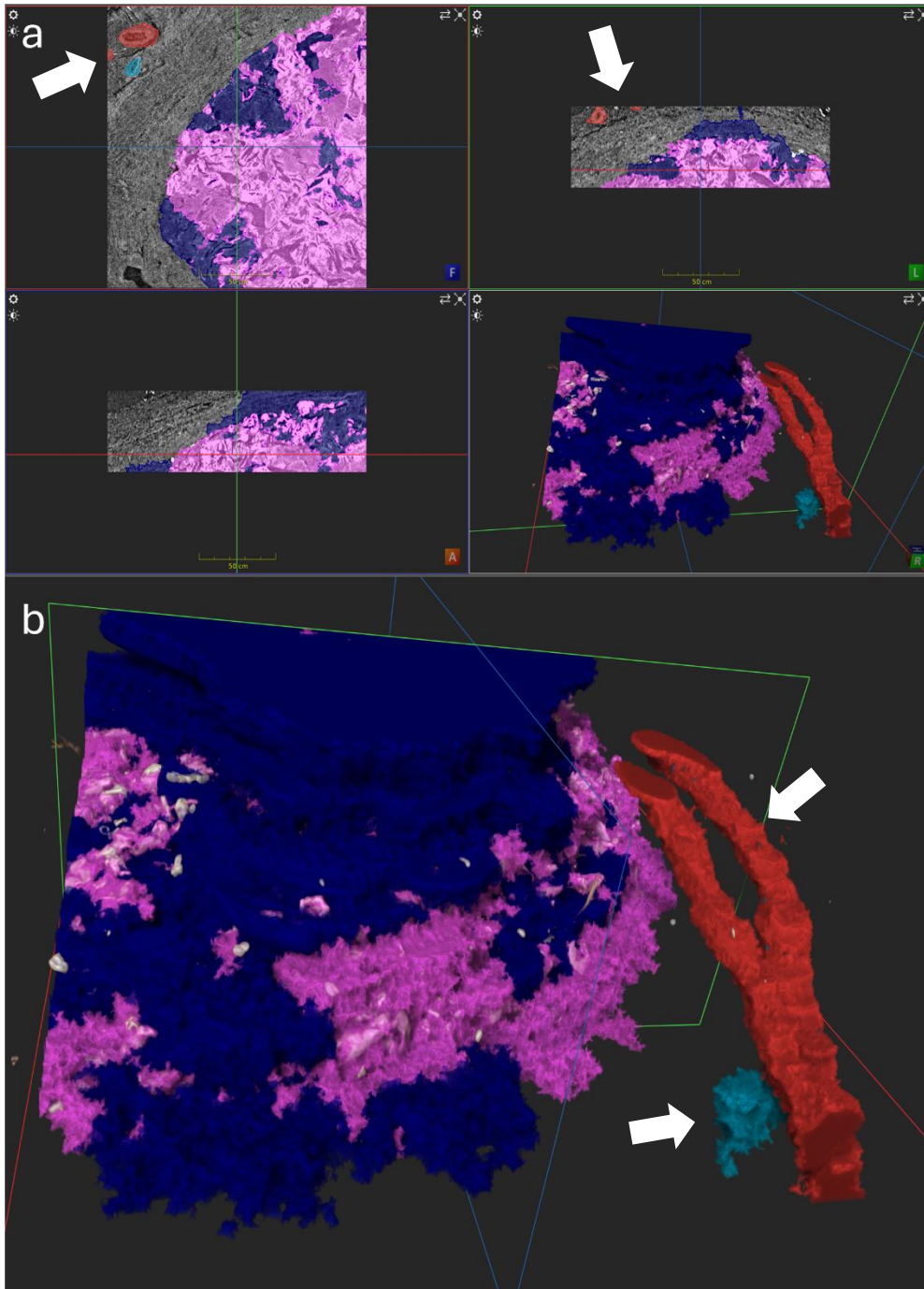


Abbildung 37: Dreidimensionale Darstellung der Annotationen einer Tumorprobe mit gesonderter Darstellung der Gefäße. Pink: verhorntes Tumorgewebe, dunkelblau: nicht-verhorntes Tumorgewebe, rot: arterielle Gefäße, hellblau: venöse Gefäße. (a) Darstellung der Annotation aus drei verschiedenen Perspektiven mit 3D-Darstellung. Die weißen Pfeile zeigen die Annotation der Gefäße innerhalb der Probe. (b) Vergrößerung der 3D-Darstellung der Annotation. Die weißen Pfeile zeigen die 3D-Darstellung aus der annotierten μ CT-Messung der Gefäße an.

Die Volumendaten zu den Gefäßen wurden ebenfalls gesondert dargestellt. Die Darstellung bezieht sich ebenfalls einzig auf die annotierten ROIs.

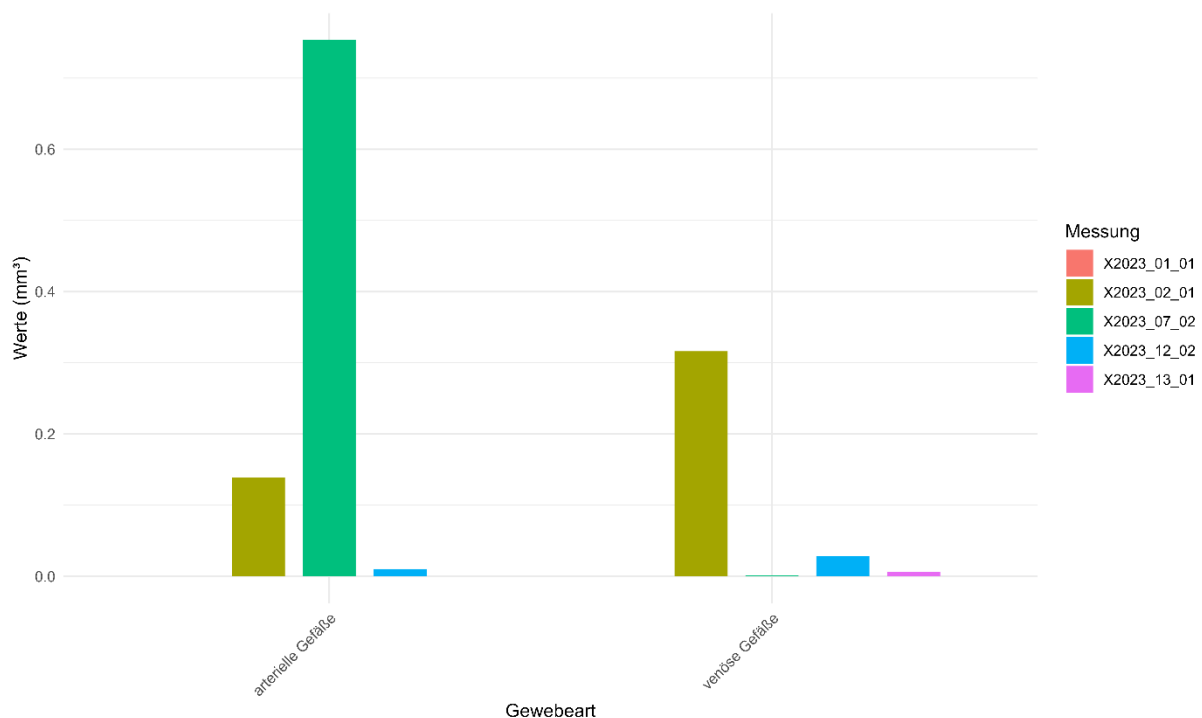


Abbildung 38: Darstellung der Volumendaten von arteriellen und venösen Gefäßen in den Tumormustern ($n = 5$) als Balkendiagramm. Es wurden Daten aus insgesamt 101 Annotationsebenen verwendet. Auf der y-Achse sind die Volumenwerte der Annotationen in mm^3 aufgezeigt, auf der x-Achse ist die jeweilige Gewebeart angegeben. Dargestellt sind die Proben 2023_13_01 (lila), 2023_12_02 (blau), 2023_02_01 (rot) und 2023_07_02 (grün).

Zu erkennen ist, dass nicht in allen ROIs Gefäße erkennbar waren bzw. teilweise nur arterielle oder venöse Gefäße annotiert werden konnten (s. Abbildung 38). Dies ist auf Struktur und Heterogenität des Gewebes zurückzuführen, sowie dass nur ROIs und somit nur ein kleiner Ausschnitt der Gesamtprobe begutachtet wurden. In Probe 2023_13_01 wurden zu einem geringen Anteil venöse Gefäße (ca. $0,005 \text{ mm}^3$) annotiert. In Probe 2023_12_02 konnten zu geringen Anteilen venöse (ca. $0,02 \text{ mm}^3$) und arterielle Gefäße (ca. $0,01 \text{ mm}^3$) erfasst werden. In Probe 2023_07_02 nahmen die arteriellen Gefäße einen größeren Anteil (ca. $0,75 \text{ mm}^3$) ein. In Probe 2023_02_01 konnten mehr venöse Gefäße (ca. $0,31 \text{ mm}^3$) als arterielle Gefäße (ca. $0,12 \text{ mm}^3$) annotiert werden.

3.15. Die zuverlässige Relokalisation von Schnitten im μCT -Datensatz lässt sich auf Multiplex-Färbungen übertragen

Zur Demonstration der Machbarkeit wurden von oberflächlichen Schnittpräparaten von Tonsillen- und Tumormustern Multiplex-Färbungen mit verschiedenen immunologischen Markern angefertigt. Im Folgenden werden exemplarisch ROI-Aufnahmen vom Kopf-Hals-Tumormusterräparat 2023_09_01 mit korrespondierender Metastase 2023_09_02 präsentiert. Diese Daten dienen als Ausblick zur Erweiterung der HORUS-Methodik in Zukunft.

In Abbildung 39 sind die Multiplex-Färbungen der Kopf-Hals-Tumormusterräparat abgebildet. In der pathologischen Diagnostik und den zur Verfügung stehenden klinischen Daten aus Tabelle 16 handelt es sich bei besagtem Tumor um ein Plattenepithelkarzinom mit einem G3-Grading, HPV-Positiv.

Die vorliegende Analyse der Marker für B-Zellen, CD20 und CD79a, ergibt im Tumorgewebe eine Expression, wohingegen der Marker für Plasmazellen, CD138, nur eine geringe Expression aufweist. Die qualitative, optische Analyse der T-Zell-Marker CD3, CD4 und CD8a ergab eine hohe

Zelldichte im Tumorgewebe, während der Marker für regulatorische T-Zellen (FoxP3) eine geringe Zelldichte aufwies. Die Marker für Makrophagen (CD68 und CD163) zeigen eine hohe Expression in der aufgenommenen ROI. Die Expression der Marker für Immun-Checkpunkte bzw. -hemmungen (CD223, CD274, CD279) hingegen weist Unterschiede auf. CD223 weist eine geringe spezifische Expression auf, während CD274 und CD279 eine hohe spezifische Expression in bestimmten Tumorregionen aufweisen. Die Marker CD31 und CD34 zeigen die Gefäße. Pan-Cytokeratin weist eine starke Expression innerhalb der epithelialen Tumorzellen auf.

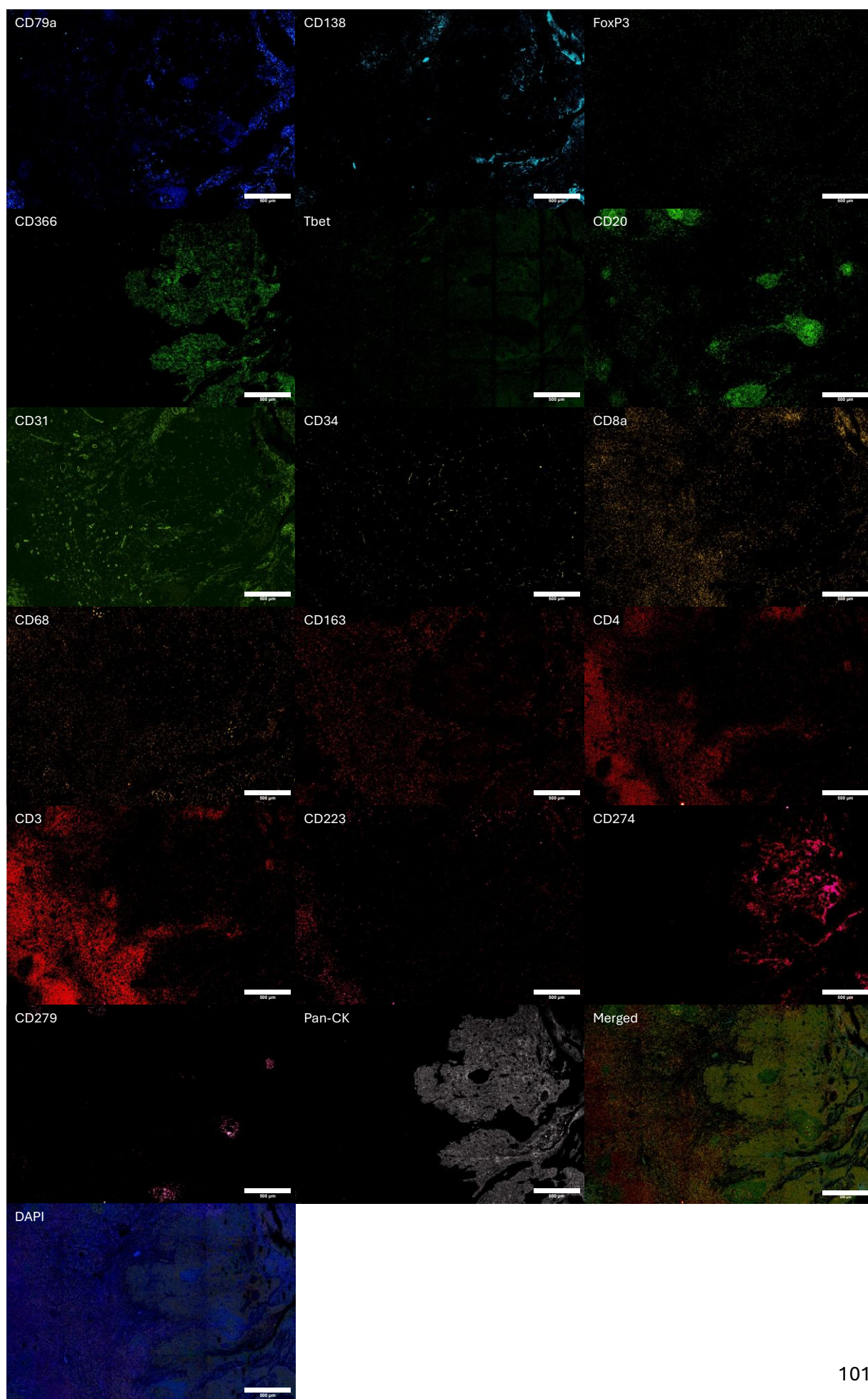


Abbildung 39: Einzelne Darstellung der 17 ausgewählten Marker in der Tumorprobe 2023_09_01. Von oben links nach unten rechts sind folgende Marker abgebildet: CD79a, CD138, FoxP3, CD366, Tbet, CD20, CD31, CD34, CD8a, CD68, CD163, CD4, CD3, CD223, CD274, CD279, Pan-Cytokeratin (CK), Merged (alle Kanäle übereinandergelegt) und DAPI. Der Skalenbalken gibt 500 µm an.

In Abbildung 40 sind die Multiplex-Färbungen der korrespondierenden Lymphknotenmetastase abgebildet. Diese verdrängt einen Großteil des lymphatischen Gewebes.

Die Analyse der Marker für B-Zellen (CD20, CD79a) ergibt innerhalb der Lymphknotenmetastase eine kaum nachweisbare Expression, während die CD138 eine sehr starke Expression in den Tumorzellen zeigt, wobei das Signal von CD138 vor allem das Epithel färbt. Die T-Zell-Marker CD3 und CD4 weisen eine geringe Expression auf, während CD8a eine starke Expression zeigt. Regulatorische T-Zellen (FoxP3) liegen im Tumorgewebe, ebenso wie Makrophagen (CD68, CD163), wobei CD68 eine stärkere Expression zeigt als CD163. Bei den Markern für Immun-Checkpoints (CD223, CD274, CD279) zeigt ausschließlich CD274 eine erhöhte Expression im Tumorgewebe, während Gefäßstrukturen (CD31, CD34) im gesamten Bildausschnitt zu sehen sind. Pan-Cytokeratin weist im Tumorgewebe des Lymphknotens eine hohe Expression auf.

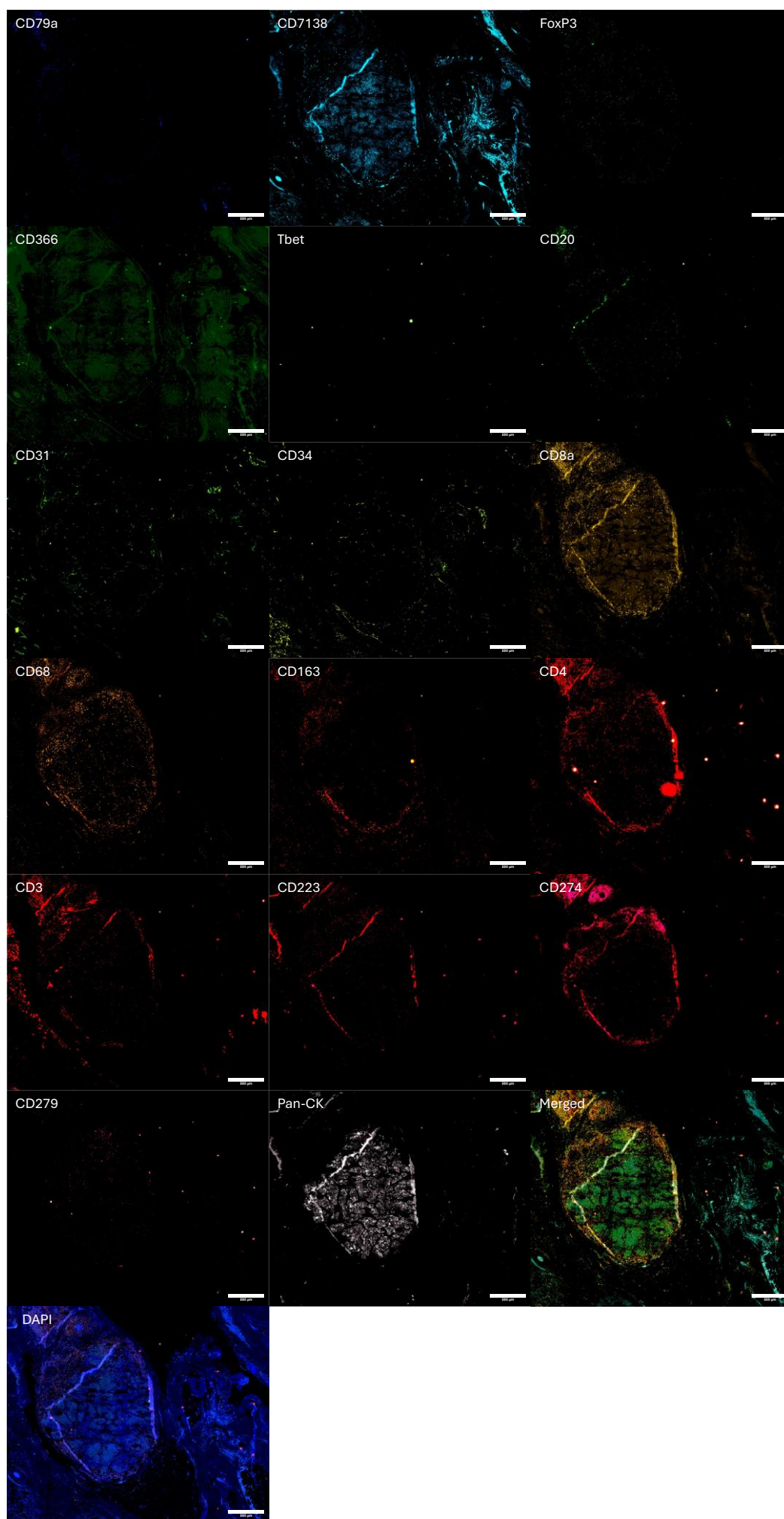


Abbildung 40: Einzelne Darstellung der 17 ausgewählten immunologischen Markern in der Lymphknotenmetastase 2023_09_02. Von oben links nach unten rechts sind folgende Marker abgebildet: CD79a, CD138, FoxP3, CD366, Tbet, CD20, CD31, CD34, CD8a, CD68, CD163, CD4, CD3, CD223, CD274, CD279, Pan-Cytokeratin (CK), Merged (alle Kanäle übereinandergelegt) und DAPI. Der Skalenbalken gibt 500 μm an.

Die aufgenommenen ROIs wurden zusätzlich mithilfe eines eigens für HORUS entwickelten Algorithmus im μCT -Datensatz reidentifiziert (s. Abbildung 30).

4. Diskussion

4.1. Projektbeschreibung

Das vom BMBF geförderte Projekt HORUS (Förderkennzeichen: 13GW057D) hat die Erforschung innovativer Lösungen zur Entlastung der Pathologie in Deutschland zum Ziel. Die Pathologie ist durch hohen Arbeitsaufwand, Fachkräftemangel und begrenzte digitale Prozesse geprägt. Der Fokus liegt auf der Anwendung der μ CT-Bildgebung zur Erzeugung dreidimensionaler Bilder von FFPE-Gewebeproben. Die erstellten 3D-Datensätze dienen als Grundlage für die Identifikation optimaler Schnittebenen für mikroskopische Untersuchungen und können somit zukünftig zur Optimierung der Diagnosefindung beitragen. Ein wesentlicher Bestandteil des HORUS-Protokolls ist die Erkennung von Tumorgewebe im μ CT-Datensatz. Hierbei kommt künstliche Intelligenz (KI) und maschinelles Lernen zum Einsatz, um die automatisierte Erkennung zu ermöglichen. HORUS zielt darauf ab, eine schnellere, präzisere und ressourcenschonendere Diagnostik zu ermöglichen. Ein weiterer Bestandteil von HORUS ist die automatisierte Reidentifizierung schnittbasierter Färbemethoden und molekularbiologischer Anwendungen, wie Multiplex- oder immunhistochemische Färbungen und in situ Hybridisierung, im μ CT-Datensatz. Ziel ist die Verknüpfung der 2D-Informationen mit der räumlichen Information, um eine umfassendere und individuellere Diagnostik zu schaffen.

Das Projekt gilt als Proof-of-Concept, das durch die Kombination von digitaler Röntgenbildgebung und künstlicher Intelligenz zukünftig einen effizienten Workflow schaffen soll. Dieser soll den Arbeitsaufwand reduzieren, Material sparen und die diagnostische Genauigkeit steigern. Die daraus resultierende, praxisnahe digitale Pathologie leistet einen Beitrag zur Optimierung der Patientenversorgung.

4.2. Die Definition histopathologisch relevanter Strukturen bis zu 0,4 μ m beschreibt den Goldstandard der Pathologie

Die Definition histopathologisch relevanter Strukturen anhand von H&E-Schnitten diene in erster Linie der Qualitätssicherung der HORUS-Methode. Anhand des bereits etablierten Goldstandards der H&E-Färbung in der Pathologie [57], [58], [59] muss sich die zu etablierende Methode in der Qualität am Goldstandard messen. Die durchgeführten Definitionen sind an Lehrpräparaten aus dem Kopf-Hals-Bereich durchgeführt worden, um sicherzustellen, dass die relevanten Strukturen im H&E-Schnitt sichtbar sind. Zudem sind die Definitionen durch einen Pathologen durchgeführt worden, um die Richtigkeit zu gewährleisten.

4.3. Oberflächenmessungen der FFPE-Blöcke ermöglichen künftig eine verzerrungsfreie Darstellung histopathologischer Strukturen. Mithilfe fluoreszierender Oberflächenfärbungen lassen sich relevante Strukturen bis zu 0,4 μ m sichtbar machen.

Die Oberflächenfärbung auf FFPE-Blöcken wurde entwickelt, um histopathologisch relevante Strukturen verzerrungsfrei darstellen zu können. Während bei klassischen Schnittpräparationen durch Schneiden, Erhitzen und Aufziehen auf den Objektträger häufig elastische Deformationen und Gewebeverzerrungen auftreten, erlaubt die direkte Färbung der Blockoberfläche eine realitätsnähere Darstellung. Durch Entparaffinierung mit Aceton konnte die oberste Zellschicht

freigelegt und für die Anfärbung hydrophilisiert werden. Dies ermöglicht eine gezielte Bindung von Farbstoffen an intakte Strukturen ohne die typischen Deformationsartefakte [5], [9].

Ein wesentliches Ziel ist es, künftig auf komplexe, probeindividuelle Deformationsschritte bei der Übertragung von Annotationen zu verzichten. Stattdessen könnten Annotationen direkt auf der fluoreszent gefärbten, unverzerrten Blockoberfläche vorgenommen und unmittelbar auf den μ CT-Datensatz übertragen werden. Dies bietet insbesondere bei kleinen Strukturen, die mit laborbasierter μ CT nicht aufgelöst werden können (s. Abbildung 26), einen erheblichen Vorteil. Zudem zeigte sich, dass Strukturen in H&E-Schnitten im Vergleich zur Blockoberfläche größer erscheinen (s. Abbildung 15) – eine Folge der Dehnung während der klassischen Probenvorbereitung [151].

Zur Beurteilung der Oberflächenbeschaffenheit nach der Entparaffinierung (s. Abbildung 13) wurden Scans mit einem 3D-Laserscanningmikroskop durchgeführt [106]. Diese offenbarten deutliche Unebenheiten und zerklüftete Oberflächen, die vermutlich durch Mikrotomschnitte und nicht allein durch die Entparaffinierung (s. Abbildung 27) entstehen. Solche Unregelmäßigkeiten erschweren konfokale Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen [103], da das Mikroskop bei größeren Flächen oft den Fokus verliert und die Aufnahmezeiten steigen. Dies kann zu einem Ausbleichen der Farbstoffe und einer Verschlechterung der Bildqualität führen. Die gewonnenen Höhenprofile könnten künftig genutzt werden, um die genaue Position der Strukturen im μ CT-Datensatz einfacher zu identifizieren und Relokalisationen effizienter durchzuführen.

Zukünftig ist eine Optimierung der Färbung und Aufnahmeverfahren geplant. Während konfokale Mikroskope zwar die nötige Auflösung liefern, sind sie durch lange Aufnahmezeiten (bis zu 2 Stunden/mm²) und mangelnde Probenhalterung für große Flächen ungeeignet [103]. In diesem Zusammenhang wurde auch eine H&E-Färbung auf der Blockoberfläche erfolgreich getestet, die im Gegensatz zu fluoreszenten Markern über einen längeren Zeitraum stabil blieb. Daher wird geprüft, ob konventionelle Färbungen wie H&E oder alternative Aufnahmetechniken – z. B. Slide Scanner oder spezielle Mikroskope zur Erfassung ganzer FFPE-Blöcke – in zukünftige Workflows integriert werden können.

4.4. μ CT-Messungen mit unterschiedlichen Auflösungen ermöglichen die Darstellung von histopathologisch relevanten Strukturen (z.B. Gefäße) mit Phasenkontrast- μ CT und Synchrotron-Aufnahmen.

Zentrales Ziel von HORUS ist die Ergänzung der konventionellen pathologischen Diagnostik durch zerstörungsfreie, markierungs- und verzerrungsfreie dreidimensionale μ CT-Bildgebung. Während klassische histologische Methoden auf zweidimensionale Schnitte beschränkt sind und dabei elastische Verformungen und Gewebeschäden verursachen können [5], [9], ermöglicht die μ CT eine realitätsgetreue Darstellung der Gewebeproben im Raum.

Für die Erfassung der FFPE-Blöcke wurden verschiedene μ CT-Verfahren getestet (s. Abbildung 9). Dabei zeigte sich, dass die Phasenkontrast- μ CT den besten Kompromiss zwischen Auflösung und praktischem Arbeitsaufwand bietet. Im Vergleich dazu wies die Absorptions- μ CT unzureichende Auflösung und zu lange Scanzeiten auf, zumal die verwendeten Systeme des Fraunhofer EMI primär für Materialien und nicht für biologische Proben ausgelegt sind [107], [108]. Zukünftig könnten speziell für Gewebe entwickelte, niederenergetische μ CT-Systeme eine weiter verbesserte Integration in den pathologischen Workflow ermöglichen [152], [153].

Trotz der hohen Bildqualität von Synchrotron-basierten μ CT-Daten, die für das Training der Machine-Learning-Modelle genutzt wurden, sind Synchrotrons aufgrund ihrer Größe und Infrastrukturanforderungen nicht für die klinische Routine geeignet. Perspektivisch könnten kompakte Phasenkontrast- μ CT-Geräte für Laborumgebungen diese Lücke schließen.

Die zusätzliche Integration von Gefäßdaten (s. Abbildung 38) in HORUS erweitert das diagnostische Spektrum erheblich. Die Gefäßarchitektur beeinflusst Tumorwachstum und Therapieansprechen entscheidend [154]. Tumorinduzierte Angiogenese, vermittelt über Faktoren wie VEGF (vascular endothelial growth factor) [155], fördert die Versorgung des Tumors mit Nährstoffen, während hypoxische Bedingungen Resistenzen gegenüber Strahlentherapien begünstigen [180]. Multiplex-Färbungen ermöglichten in HORUS erstmals die spezifische Darstellung von Gefäßmarkern wie VEGF, CD31 und CD34 [79], [80], [158] (s. Abbildung 39, Abbildung 40). Mithilfe der entwickelten Ebenenfindung konnten diese Marker innerhalb der μ CT-Daten reidentifiziert und mit räumlichen Informationen ergänzt werden. Langfristig könnten diese Erkenntnisse zur prädiktiven Einschätzung der Gefäßdynamik und der Therapieansprechens beitragen [158].

4.4.1. Der Ebenenvergleich der μ CT-Daten demonstriert die Signifikanz der räumlichen Komponente und den potenziellen Nutzen ihrer Implementierung in der pathologischen Diagnostik. Der Vergleich einzelner Ebenen zeigt, dass keine eindeutige Vorhersage von Strukturen von Ebene zu Ebene getätigt werden kann.

Ein wesentlicher methodischer Fortschritt innerhalb von HORUS bestand in der Entwicklung einer modalitätsübergreifenden, verformbaren 2D-3D-Bildregistrierung. Um histopathologische und molekulare Informationen exakt in die dreidimensionalen μ CT-Daten zu überführen, wurde ein spezifischer Algorithmus entwickelt, der auf der Approximation der LC2-Metrik mittels eines kleinen CNN basiert [123], [124]. Dies ermöglichte eine robuste Initialisierung, die anschließend durch ein Freiformverformungsmodell (FFD) und die Nutzung der lokalen normalisierten Kreuzkorrelation (LNCC) verfeinert wurde [127].

Dieser hybride Ansatz, der klassische und ML-basierte Verfahren kombiniert, erlaubt eine präzise Registrierung von histologischen Schnitten und Multiplex-Aufnahmen mit einer Genauigkeit von bis zu 20 μ m (s. Abbildung 29, Abbildung 30). Dadurch wird es zukünftig möglich sein, immunologische (z. B. Zellinfiltrate) und histopathologische (z. B. Tumorerheterogenität) Informationen direkt in den μ CT-Datensatz einzubringen und für erweiterte Diagnostik oder weitere ML-Anwendungen zu nutzen.

Die methodische Weiterentwicklung könnte perspektivisch durch den Einsatz von Transformer-Architekturen oder GANs erfolgen [159]. Insbesondere die Generalisierbarkeit auf weitere Modalitäten und größere Datensätze sowie eine systematische Vergleichsstudie mit bestehenden Methoden bieten Ansatzpunkte für zukünftige Arbeiten [130], [160], [163], [164].

HORUS positioniert sich in der wissenschaftlichen Literatur an der Schnittstelle zwischen klassischen Verfahren der Bildverarbeitung und maschinellen Lernverfahren (ML). Die Methode reiht sich ein zwischen traditionellen Verfahren [162] der Bildregistrierung und modernen ML-gestützten Ansätzen [130]. Aufgrund des Fokus der Bildregistrierung auf verformbare multimodale Registrierung könnte HORUS eine Verbindung zu gegenwärtigen Entwicklungen in der synthetischen Daten- und Modalitätssynthese schaffen [163]. In zukünftigen Forschungsarbeiten

könnte man sich durch die Bereitstellung von weiteren μ CT-Bilddaten, sowie korrespondierenden H&E-Schnitten auf die Weiterentwicklung von ML-gestützten Ähnlichkeitsmetriken, die Einführung dynamischer Deformationsmodelle sowie die Integration von Unsicherheitsmaßen konzentrieren, um die Robustheit und die Anwendungsmöglichkeiten der Methode weiter zu verbessern.

4.4.2. Das KI-Training anhand der manuell annotierten μ CT-Daten zeigt ein erstes erfolgreich trainiertes Modell. Vergleich manueller Annotation gegen KI-Annotation und Übertragung von H&E-Annotationsdaten auf μ CT-Datensätze. Die Annotationsübertragung auf 2D-Flächen zeigte mit Dice-Werten von 0,57 und 0,71 eine Genauigkeit, die zukünftig Potenzial zur Verbesserung bietet.

Für die Segmentierung histopathologischer Strukturen wurde eine U-Net-Architektur eingesetzt [150], kombiniert mit einer Verlustfunktion aus Dice Loss und Kreuzentropie [121]. Die Trainingsdaten wurden systematisch vorbereitet, wobei eine Reduktion der Auflösung auf 10,4 μ m und eine gezielte ROI-Auswahl zur Reduzierung von Rechenaufwand und Verbesserung der Trainingsqualität beitrugen. Die Anbindung der μ CT-Daten an die histologischen Ebenen erfolgte über den zuvor entwickelten Ebenenfindungsalgorithmus [2].

Insgesamt wurden 708 Trainings-, 94 Validierungs- und 101 Testebenen verwendet. Ein signifikanter Rückgang des Validierungsverlusts von 0,24 auf 0,08 nach 150 Epochen deutet auf einen erfolgreichen Trainingsprozess hin. Dennoch wäre die Ergänzung weiterer Evaluationsmetriken wie Präzision, Recall und Dice-Koeffizient zur differenzierteren Bewertung der Segmentierungsleistung wünschenswert.

Durch Annotationsübertragung konnten zudem Bereiche, die in μ CT aufgrund der begrenzten Auflösung schwer erkennbar sind, effizient ergänzt werden. Erste Versuche ergaben Dice-Scores von 0,57 für Tonsillen- und 0,71 für Tumorgewebe [121], [27]. Die höhere Komplexität des lymphatischen Gewebes in Tonsillen erschwerte die Segmentierung. Um Overfitting zu vermeiden und die Generalisierbarkeit zu verbessern, sollten künftige Trainingsdatensätze vergrößert und diversifiziert werden.

4.4.3. Der Vergleich der Volumenwerte manueller Annotation zur Annotation durch künstliche Intelligenz zeigt keine signifikanten Unterschiede.

Ein Vergleich zwischen manuellen und KI-gestützten Annotationen zeigte, dass insbesondere lymphatisches Gewebe und Keimzentren Herausforderungen für die automatische Segmentierung darstellen, während verhorntes Tumorgewebe zuverlässig erkannt werden konnte (s. Abbildung 32, Tabelle 26). Die Diskrepanzen lassen sich auf geringe Grauwertkontraste, begrenzte Trainingsdaten und die Komplexität der Gewebemorphologie zurückführen [164].

In Tumorproben zeigte die KI eine nahezu vollständige Übereinstimmung mit der manuellen Segmentierung für verhorntes und nicht-verhorntes Tumorgewebe. Die abweichenden Röntgendichten zwischen Tumor- und Normalgewebe erleichterten die Erkennung.

Zukünftig sollten hybride Ansätze, die automatische Segmentierungen durch gezielte manuelle Korrekturen ergänzen, sowie multimodale Bildgebungsansätze zur Verbesserung der Grenzenerkennung implementiert werden [2].

4.5. Annotationen sowie die deskriptive Statistik der Annotationsdaten von Tonsillen- und Tumorproben.

Für das Projekt HORUS wurden sowohl histologische Schnitte als auch μ CT-Daten annotiert. Der Fokus dieser Arbeit liegt auf den Annotationsdaten der μ CT-Datensätze. Während die 2D-H&E-Schnitte zur Erkennung und Annotation von Tumorgewebe gefärbt wurden [5], erfolgt die Annotation der 3D-Daten unter Verzicht auf Marker und nutzte ein trainiertes ML-Modell, basierend auf räumlichen Informationen [2]. Diese Vorgehensweise ermöglicht eine verzerrungsfreie Darstellung ohne zusätzliche Färbeprozesse.

Die manuelle Annotation der FFPE-Blöcke mittels Phasenkontrast- μ CT ermöglichte eine differenzierte strukturelle und volumetrische Charakterisierung des Tonsillengewebes. Damit konnten die Möglichkeiten der Phasenkontrast- μ CT im Vergleich zu klassischen histologischen Methoden systematisch bewertet und potenzielle diagnostische Anwendungen evaluiert werden.

4.5.1. Die Tonsillen weisen eine heterogene immunologische Struktur auf.

Die in Tabelle 17 und Abbildung 16 dargestellten volumetrischen Daten zeigen deutliche Unterschiede in der Gewebeverteilung zwischen den Proben. Diese Unterschiede sind vermutlich auf biologische Heterogenität, altersabhängige Veränderungen, Entzündungszustände oder anatomische Varianten zurückzuführen.

Die Analyse der annotierten Gewebearten in den drei Proben zeigt signifikante Unterschiede in der Zusammensetzung der Gewebevolumina, wobei insbesondere die Variabilität des lymphatischen Gewebes und der Keimzentren zwischen den einzelnen Proben auffällig ist. Diese Variabilität könnte auf unterschiedliche immunologische Aktivitäten hindeuten.

Die Analyse der Gewebeanteile zeigte eine signifikante Variabilität, insbesondere beim lymphatischen Gewebe und den Keimzentren. In Probe 2022_26 (99,38 mm³ Gesamtvolumen) dominieren Bindegewebe (47,07 %) und Muskelgewebe (24,37 %), während lymphatisches Gewebe 18,98 % ausmacht. Der geringe Anteil an Keimzentren (1,24 %) deutet auf eine primär zelluläre Immunantwort hin [22], [27].

Im Gegensatz dazu zeigt Probe 2022_02 (17,6 mm³) einen hohen Anteil lymphatischen Gewebes (79,09 %), wovon 15,06 % auf Keimzentren entfallen. Dies spricht für eine stärkere humorale Immunaktivität [164]. Probe 2022_56 (29,42 mm³) wiederum weist mit 77,63 % vorwiegend Bindegewebe auf, während der Anteil an lymphatischem Gewebe (9,79 %) und Keimzentren (0,19 %) äußerst gering ist. Möglicherweise wurde hier nur der bindegewebige Randbereich der Tonsille erfasst.

Zusätzlich lieferten die Oberflächendaten (s. Tabelle 18 und Abbildung 17) Hinweise auf die strukturelle Heterogenität der Proben. Lymphatisches Gewebe zeigte eine komplex gefaltete Architektur, was sich in einem hohen Oberflächen-Volumen-Verhältnis widerspiegelte, charakteristisch für die kryptenreiche Struktur der Tonsillen.

4.5.2. Die Analyse von Kopf-Hals-Tumorproben ergibt Hinweise auf das Vorhandensein von tumorassoziierten immunologischen Strukturen.

Die Übertragung der Annotationstechniken auf Kopf-Hals-Tumoren und korrespondierende Lymphknotenmetastasen war ein nächster logischer Schritt, um die Anwendbarkeit der Methode auf unterschiedliche Gewebetypen zu prüfen. Die Auswahl der Marker wurde hierbei reduziert, um spezifischere Trainingsdaten für die KI-Modelle zu erhalten.

Besondere Bedeutung hatte die Differenzierung zwischen verhorntem und nicht-verhorntem Tumorgewebe, da diese Varianten unterschiedliche prognostische Bedeutungen besitzen könnten [165], [166]. Lymphatisches Gewebe wurde in zwei Tumorproben identifiziert: in Probe 2023_12_02 mit 5,12 % und in Probe 2023_02_01 mit 17,59 %. Ein hoher Anteil lymphatischen Gewebes kann auf eine aktive Immunantwort hindeuten, während niedrige Werte auf ein „immunologisch kaltes“ Tumormikromilieu verweisen [167], [131].

Auch die Blutgefäßanalyse offenbarte Unterschiede zwischen den Proben: In Probe 2023_07_02 machten arterielle Gefäße 51,22 % des annotierten Volumens aus, während in Probe 2023_02_01 venöse Gefäße 17,28 % dominierten. Diese Verteilung unterstreicht die Bedeutung der Tumolvaskularisierung für Tumorwachstum und Metastasierung [155], [168]. Eine hohe Gefäßdichte korreliert mit einer aggressiven Tumorbiologie, während ein niedriger Gefäßanteil Hypoxie und Therapieresistenz begünstigen könnte.

Oberflächendaten (s. Tabelle 20 und Abbildung 19) ergänzen die volumetrische Analyse um weitere Einsichten in die Gewebearchitektur. Beispielsweise wies das nicht-verhornte Tumorgewebe eine hohe Oberfläche relativ zum Volumen auf, was auf ein infiltratives, aggressives Wachstum hinweisen könnte.

Die Relation zwischen Oberfläche und Volumen gibt Hinweise auf die Gewebekomplexität: Hohe Oberflächenanteile deuten auf verzweigte, irreguläre Strukturen hin, während kompakte Gewebe geringere Oberflächen-Volumen-Verhältnisse aufweisen. In einer Studie zum Glioblastom wurden Tumoroberflächen und Tumorumfänge separat gemessen. Die Ergebnisse zeigen, dass unregelmäßige Tumorränder und hohe Oberflächen-Volumen-Verhältnisse mit einer komplexen Gewebestruktur und ungünstiger Prognose einhergehen [169]. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie legen nahe, dass eine präzise Volumetrie in anderen Untersuchungen die Hypothese stützt, dass große oder unregelmäßig geformte Tumorumfänge die zugrunde liegende Heterogenität widerspiegeln [170]. Die für HORUS im Rahmen dieser Arbeit etablierten Verfahren zeigen, dass sich die notwendigen Messdaten sehr gut in hoher Auflösung labelfrei aus FFPE-Gewebe erheben lassen (Abbildung 16 - Abbildung 19). Es ist zu erkennen, dass sowohl Volumen als auch Oberfläche der vorhandenen Strukturen sowohl bei den Tumoren als auch bei den Tonsillen Hinweise auf die Gewebekomplexität geben. So hat bspw. von Krypten durchzogenes Epithel eine größere Oberfläche als glattere Strukturen, wie z.B. Muskulatur.

Ein weiterer, systematischer Aspekt dieser Arbeit war die Reflexion über mögliche Fehlerquellen bei der manuellen Annotation. Obwohl ROIs zur Fokussierung eingesetzt wurden, bleiben subjektive Einflüsse bestehen. Die Entwicklung automatisierter Segmentierungsverfahren ist deshalb essenziell. Ein erster erfolgreicher Proof-of-Concept wurde bereits erreicht (s. Abbildung 31): Künftig könnte die KI-basierte Annotation Patholog:innen bei der dreidimensionalen Erkennung von Tumorgewebe im μ CT-Datensatz unterstützen [2].

Ein limitierender Faktor war die geringe Anzahl der untersuchten Proben. Um belastbare Aussagen zur Heterogenität und Typologie von Tonsillen- und Kopf-Hals-Tumoren treffen zu können, sind zukünftige Studien mit größeren Probenkollektiven notwendig. Diese könnten dann effizient und reproduzierbar mit KI-Unterstützung annotiert werden.

4.6. Statistische Flächendaten einzelner 2D-Flächen extrahiert aus dem μ CT-Datensatz zeigen die Relevanz der räumlichen Komponente und den möglichen Nutzen, diese in der pathologischen Diagnostik zu etablieren

Die Untersuchung extrahierter 2D-Flächen aus den μ CT-Daten zeigte, dass Strukturen zwischen verschiedenen Ebenen erheblich variieren können. Ein optischer Vergleich belegt, dass von einer Ebene nicht zuverlässig auf benachbarte Ebenen geschlossen werden kann (s. Abbildung 20, Abbildung 23). In der konventionellen Pathologie werden lediglich etwa 0,5 % einer Probe untersucht [9]. Vor diesem Hintergrund erscheint die Erweiterung der Diagnostik um eine räumliche Komponente entlang der z-Achse sinnvoll, insbesondere zur Auswahl optimaler Schnittebenen mittels Ebenenfindung (s. Abbildung 29).

4.6.1. Der Vergleich einzelner 2D-Flächen zeigt, dass aus einer Ebene nicht auf die andere geschlossen werden kann

Die Analyse der Tonsillenproben bestätigte die hohe Variabilität der Gewebestrukturen zwischen den Ebenen (s. Abbildung 21, Abbildung 22). Während einige Gewebearten, etwa Keimzentren oder lymphatisches Gewebe, in einzelnen Proben signifikante Korrelationen zwischen Schichttiefe und annotierter Fläche zeigten, war in anderen Proben keine solche Korrelation erkennbar. Die Ergebnisse weisen somit auf eine erhebliche strukturelle Heterogenität hin.

Heatmaps und Scatterplots illustrieren diese Heterogenität: In Probe 2022_02 wurde eine signifikant negative Korrelation für Keimzentren und lymphatisches Gewebe festgestellt. Auch Muskelgewebe und Speicheldrüsen zeigten signifikante Zusammenhänge. Dennoch wiesen viele Gewebearten keine konsistenten Trends auf, wie die Vielzahl nicht-signifikanter Ergebnisse in den Heatmaps verdeutlicht.

Diese Befunde unterstreichen die Notwendigkeit einer dreidimensionalen Analyse, da lokale Trends nicht ohne Weiteres auf gesamte Gewebestrukturen oder andere Proben übertragbar sind [171]. Eine 3D-Betrachtung erlaubt es, die komplexe Architektur und funktionellen Zusammenhänge innerhalb des Gewebes besser zu erfassen. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die Verteilung bestimmter Gewebearten wie Keimzentren und lymphatisches Gewebe nicht zufällig ist, sondern funktionellen Mustern folgen könnte. Eine 3D-Rekonstruktion dieser Strukturen könnte daher helfen, Immunaktivität und Gewebedynamik besser zu verstehen [172].

Blutgefäße spielen in diesem Kontext eine wichtige Rolle. Die räumliche Erfassung venöser und arterieller Gefäße liefert wertvolle Informationen zur Durchblutungssituation des Gewebes [168]. Eine präzise dreidimensionale Darstellung könnte zukünftig dazu beitragen, hypoxische Bereiche, Tumorangiogenese sowie therapeutische Zielstrukturen zuverlässiger zu identifizieren. Tumorassoziierte Gefäße können chaotische Wachstumsstrukturen aufweisen, die in einer reinen 2D-Analyse nicht vollständig erfasst werden können.

Die klassische histopathologische Diagnostik basiert überwiegend auf zweidimensionalen Schnittpräparaten, wodurch potenziell wichtige Informationen über die räumliche Gewebeorganisation verloren gehen. Die Integration dreidimensionaler Bildgebungsmethoden in den diagnostischen Workflow bietet die Möglichkeit, die strukturelle Heterogenität besser zu erfassen [171]. Zudem könnten räumliche Daten zu einer besseren Analyse der Interaktionen zwischen Tumorzellen, Immunzellen und vaskulären Strukturen beitragen und so die Entwicklung neuer diagnostischer Marker und Therapieansätze unterstützen.

Eine größere Stichprobe könnte helfen, systematische Muster klarer herauszuarbeiten und den Einfluss individueller Variationen besser zu quantifizieren. In Kombination mit 3D-Analysen könnte dies das Verständnis der Tumorbilogie wesentlich verbessern und die Entwicklung personalisierter Therapieansätze unterstützen.

Die hier vorgestellten Ergebnisse verdeutlichen die Notwendigkeit, die konventionelle, zweidimensionale Diagnostik durch dreidimensionale Bildgebungsverfahren zu ergänzen [2], [171]. Eine solche Integration könnte nicht nur die Präzision der diagnostischen Aussagen verbessern, sondern auch neue Möglichkeiten für individualisierte Therapieentscheidungen eröffnen.

4.7. Die annotierten Keimzentren zeigen eine mittlere Kreisähnlichkeit von 0,92, was für Keimzentren mit regulärer Kreisform spricht

Morphologie und Rundheit von Keimzentren können als diagnostische und prognostische Merkmale dienen. Frühere Studien zeigten, dass die Unrundheit von Follikeln und Keimzentren unter anderem ein Merkmal für CVID darstellt [173] und zusätzlich mit begleitender Autoimmunität assoziiert ist [173], [174].

Romberg et al. [174] differenzierten CVID-Patienten nach dem Vorliegen von Autoimmunität und identifizierten dabei histologische Kriterien: Bei autoimmunen Verläufen traten vergrößerte, unregelmäßig geformte Keimzentren auf, während bei Patienten ohne Autoimmunität die Keimzentren kleiner und weniger deformiert waren. Zum Vergleich wurden Lymphknoten immunologisch gesunder Personen nach bakterieller Stimulation untersucht – diese zeigten zwar ebenfalls Hyperplasien, jedoch mit regelhafter Form. Die Unrundheit in Kombination mit Hyperplasie kann laut Romberg et al. als Hinweis auf eine bestimmte CVID-Subgruppe gewertet werden, was durch Daten von Unger et al. [173] gestützt wird.

Die mittlere Fläche von Keimzentren beträgt etwa $0,36 \text{ mm}^2$ [171], wobei Schnittlage und Entwicklungsstadium die sichtbaren Zonenanteile stark beeinflussen können [171], [175]. So erscheinen kleinere Keimzentren teils überproportional von der hellen Zone dominiert.

In gesunden Tonsillen sind Keimzentren typischerweise rund, gut begrenzt und von einem Mantel aus naiven B-Zellen umgeben [176]. Auch wenn quantitative Daten zur Rundheit in Tonsillen rar sind, belegen morphometrische Studien hohe Circularity-Werte (ca. 0,8–0,9) bei gesunden Keimzentren [172], [177]. Ueda et al. (2024) stellten in Tonsillen mit chronischer Tonsillitis größere Keimzentren als in pathologischen Fällen fest [178], was auf eine organisierte, runde Architektur bei Reaktivität schließen lässt.

Bei HNSCC zeigen Lymphknoten und Tumorumgebung hingegen morphologische Abweichungen: Keimzentren können zusammenfließen, unregelmäßig oder oval erscheinen („fused germinal centers“) und zeigen reduzierte oder fehlende Mantelzonen [176]. Auch TLS im Tumorgewebe enthalten teils ausgebildete Keimzentren, die jedoch kleiner und weniger rund sein können [179], [180]. Studien belegen, dass TLS in HNSCC trotz abweichender Morphologie funktional aktiv sein können [179].

Morphometrische Auffälligkeiten gelten als diagnostische Marker, etwa bei CVID, wo Keimzentren oft diffus, unklar begrenzt und ohne Mantelzone erscheinen [176]. Ähnlich deuten gelappte Keimzentren bei bestimmten Infektionen (z. B. EBV, HIV) oder bei lymphatischen Neoplasien wie dem angioimmunoblastischen T-Zell-Lymphom auf pathologische Prozesse hin [176]. Auch onkologisch können Formparameter wie Rundheit prognostisch relevant sein: In Lymphknoten von Brustkrebspatientinnen korrelierte eine kompakte Keimzentrumform mit fortgeschrittenen Stadien, während unregelmäßige Formen häufiger bei kleineren Primärtumoren vorkamen – als Ausdruck unterschiedlicher Immunreaktionen [176].

Zur Bestimmung der Rundheit werden digitale Bildanalysetools genutzt. Die Kreisähnlichkeit – definiert als $C = \frac{4\pi \cdot A}{U^2}$ [149] – dient als Maß für Formregelmäßigkeit (1 = perfekt rund) [179]. Programme wie ImageJ, QuPath oder kommerzielle Systeme (z. B. HALO, Visiopharm) ermöglichen die Segmentierung und automatische Auswertung histologischer Präparate [180], [176], [181]. Neben Kreisähnlichkeit können weitere Parameter wie Feret-Durchmesser oder Kompaktheitsindizes berechnet werden. Solche automatisierten Verfahren liefern reproduzierbare morphometrische Daten und unterstützen die Identifikation krankheitsspezifischer Muster [176].

In der vorliegenden Analyse (s. Abbildung 28, Tabelle 25) wurden drei Keimzentren anhand von jeweils drei Schnittflächen (Ebenen) untersucht. Die berechneten Kreisähnlichkeitswerte reichen dabei von 0,867 bis 1,007, wobei ein Mittelwert von etwa 0,92 erreicht wurde.

Keimzentrum 1 zeigt eine insgesamt gute, wenngleich etwas variierende Kreisähnlichkeit. Besonders in Ebene 2 fällt ein höherer Wert auf, was auf eine näherungsweise runde Geometrie in dieser Schnittebene hindeutet. Die etwas niedrigeren Werte in Ebene 1 und 3 könnten durch leichte Asymmetrien oder eine periphere Schnittlage bedingt sein.

Keimzentrum 2 weist die höchste und zugleich gleichmäßigste Kreisähnlichkeit auf. Dies spricht für eine sehr kompakte, annähernd kugelförmige Struktur des Keimzentrums über alle Ebenen hinweg und kann als typisches Beispiel für ein gut organisiertes, funktionell aktives Keimzentrum in gesunder Tonsillenstruktur gewertet werden.

Demgegenüber zeigt Keimzentrum 3 die niedrigste Kreisähnlichkeit im Vergleich der drei untersuchten Zentren. Die Werte liegen jedoch weiterhin im oberen Bereich der Skala und deuten auf eine mäßig ovale oder leicht irreguläre Form hin. Dies kann biologisch völlig unbedenklich sein und zum Beispiel auf ein sich entwickelndes oder reagierendes Keimzentrum hinweisen.

Im Vergleich zu bestehenden Literaturdaten liegen alle berechneten Werte im physiologisch erwartbaren Bereich für reaktive, gesunde lymphatische Strukturen. Studien zu Keimzentren [171], [172], [176] in Lymphknoten und Tonsillen geben üblicherweise Werte $\geq 0,85$ als charakteristisch für runde, funktionstüchtige Keimzentren an, während deutlich niedrigere Werte eher im Kontext von pathologischen Veränderungen, wie z. B. bei Immundefekten oder

Tumorassoziierten tertiären Lymphstrukturen, zu finden sind. Die Ergebnisse dieser Analyse bestätigen somit die strukturelle Integrität und Regelmäßigkeit der untersuchten Keimzentren und stellen eine solide morphometrische Referenzbasis für künftige Vergleiche mit Tumorgewebe dar.

4.8. Klinische Daten aller untersuchten Tumorproben und Vergleich der erkannten Gewebearten

4.8.1. Die klinischen Daten zeigen in Verbindung mit den Annotationsdaten keine signifikanten Aussagen, können jedoch zukünftig Hinweise auf die Tumoranalyse geben

Die Tumorproben, die in HORUS mithilfe von μ CT digitalisiert wurden, sind vor der Verwendung in HORUS durch die klinische und konventionelle pathologische Diagnostik gelaufen (s. Tabelle 16). Die Annotation der Kopf-Hals-Tumorproben mittels Synchrotron-Phasenkontrast- μ CT und deren Zuordnung zu klinischen Parametern erlaubt eine differenzierte Untersuchung der Tumorerogenität. Hierbei wurden Volumina aller annotierten ROIs ($n = 17$) der relevanten Gewebemarker (s. Tabelle 27) gemessen und in Beziehung zu HPV-Status, Grading, Immuntherapie und klinischem Verlauf gesetzt. Es wurden Daten aus 5100 Annotationsebenen verwendet. Die Untersuchung auf signifikante Zusammenhänge wurde mit der Spearman-Korrelation durchgeführt [138].

Für HPV-Status, Grading, Erhalt einer Immuntherapie und Lebensstatus ergab sich kein signifikanter Zusammenhang, was der geringen Patientenzahl geschuldet ist.

Der HPV-Status von Patient:innen mit Kopf-Hals-Tumoren kann einen Aufschluss über die Tumorart geben. Humane Papillomaviren (HPV) sind ein maßgeblicher Risikofaktor für die Entwicklung einer spezifischen Untergruppe von Kopf-Hals-Tumoren, insbesondere für das oropharyngeale Plattenepithelkarzinom (OPSCC) [43]. Obgleich klassische Risikofaktoren für Kopf-Hals-Tumoren wie Rauchen und Alkoholkonsum nach wie vor von Relevanz sind, zeigt sich eine Zunahme von Fällen, deren Ätiologie auf eine persistierende HPV-Infektion zurückzuführen ist [35]. Diese Tumoren weisen charakteristische Merkmale auf, darunter eine Lokalisation im Oropharynx, eine bessere Prognose als HPV-negative Tumoren sowie eine stärkere Assoziation mit Lymphknotenmetastasen [45]. HPV-positive Tumore sind oftmals mit nicht-verhornten Tumorzellen assoziiert [182].

In den Daten dieser Arbeit kann nur eine sehr schwache und nicht signifikante positive Korrelation zwischen nicht-verhorntem Tumorgewebe und dem HPV-Status gezeigt werden. Nach Cohen's Richtlinien [138] liegt der Wert unter der Schwelle von 0,10 für eine schwache Korrelation, was auf einen vernachlässigbaren Zusammenhang hindeutet. Die sehr schwache positive Korrelation könnte zufällig sein, wie der hohe p-Wert (0,7510) nahelegt. Zukünftig sind größere Stichproben notwendig, um signifikante Ergebnisse zu erhalten.

In dieser Arbeit zeigten Frauen einen signifikant geringeren Anteil an verhorntem Tumorgewebe als Männer (s. Abbildung 35).

Es wurde bereits gezeigt, dass stark verhornende Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs häufiger bei Männern diagnostiziert werden, während Frauen tendenziell eine höhere Prävalenz von schlecht differenzierten, nicht-verhornenden Plattenepithelkarzinome (PEK) aufweisen [183], [184]. Eine mögliche Erklärung für diesen Unterschied könnte in den unterschiedlichen Expositionen gegenüber Risikofaktoren liegen. Der hauptätiologische Faktor

für PEKs im Kopf-Hals-Bereich ist der Tabak- und Alkoholkonsum, der mit einer stärkeren Differenzierung und Verhornung des Tumorgewebes in Verbindung gebracht wurde [35], [182].

4.8.2. Der Anteil von nicht-verhorntem Tumorgewebe und verhorntem Tumorgewebe kann zukünftig Aufschluss über Aggressivität geben und mit in die HORUS-Methode als Analysewert einbezogen werden

Im Projekt konnten die Volumenanteile von verhorntem und nicht-verhorntem Gewebe zuverlässig erhoben und könnten zukünftig potenziell zur Charakterisierung von Tumoren herangezogen werden. Obwohl ein hoher Verhornungsgrad im Kopf-Hals-Bereich klassischerweise mit einer schlechteren Prognose verbunden wird – etwa durch erschwerte Penetration von Therapeutika oder eine erhöhte Metastasierungsneigung [51], [170] – zeigen Studien, dass schlecht differenzierte Tumoren mit geringem Verhornungsgrad häufig eine gesteigerte Zellproliferation und Progressionsgeschwindigkeit aufweisen [186], [187]. Ein niedriger Anteil verhornten Gewebes könnte demnach auf eine weniger differenzierte, aggressivere Tumorbilogie hindeuten. HPV-abhängige Tumoren zeigen im Vergleich zu HPV-unabhängigen Tumoren eine geringere Verhornung [166], wobei erstere gemäß der WHO-Prognose eine günstigere Überlebensrate aufweisen. HPV-unabhängige Tumoren treten häufiger bei Rauchern und Alkoholikern auf [188]. Die Höhe des verhornten Gewebeanteils könnte somit als zusätzlicher Parameter zur Einschätzung der Tumoraggressivität und des klinischen Gradings dienen.

Das Tumorigradung stellt in der onkologischen Praxis einen etablierten prognostischen Marker dar: Schlechter differenzierte Tumoren gehen typischerweise mit einer ungünstigeren Prognose einher [182], [189]. Das Verhältnis von verhorntem zu nicht-verhorntem Gewebe könnte eine zusätzliche Charakterisierungsebene bieten, die das klassische Grading ergänzt. Besonders in Kombination mit der Tumorgroße, einem weiteren wichtigen prognostischen Faktor, könnten differenziertere Aussagen über die Tumorbilogie getroffen werden.

Um die prognostische Relevanz dieser Zusammenhänge zu validieren, sind größere Kohortenstudien notwendig. Ergänzende molekulare Analysen – beispielsweise die Untersuchung von Proliferationsmarkern wie Ki-67 oder epithelial-mesenchymaler Transition (EMT)-Markern – könnten helfen, die biologischen Grundlagen der beobachteten Korrelationen besser zu verstehen.

4.9. Die Multiplex-Bildgebung erwies sich als sinnvolle Ergänzung der HORUS-Methode und kann zukünftig Aufschluss über Tumorummunologie geben

Die Multiplex-Färbung kann nach vorausgehender, zerstörungsfreier μ CT-basierter Gewebedarstellung problemlos in den Workflow integriert werden. Mithilfe des Algorithmus zur Ebenenfindung lassen sich immunologisch relevante Strukturen im μ CT-Volumen zunächst analysieren und gezielt für histologische Schnitte extrahieren [63]. Exemplarisch wurden die Kopf-Hals-Tumorprobe 2023_09_01 und die korrespondierende Lymphknotenmetastase 2023_09_02 untersucht (s. Abbildung 39, Abbildung 40).

Diese Methode ermöglicht die Analyse verschiedener Zellpopulationen, darunter B-, T- und Plasmazellen, Epithelien, Endothelien sowie Makrophagen und dendritische Zellen. Dabei zeigten sich unterschiedliche Verteilungen innerhalb und außerhalb des Tumors. Beispielsweise waren FoxP3-positive T-Zellen innerhalb des Tumors vermehrt vorhanden, was auf eine lokale Immunsuppression hinweist [75]. Die Marker CD31 und CD34, Indikatoren für Gefäßdichte, waren im Tumorbereich geringer exprimiert als im umliegenden Gewebe, was auf eine schlechte Durchblutung und möglicherweise auf Hypoxie hinweist [79], [80]. Pan-CK ermöglichte die Lokalisierung des Tumorgewebes und die Evaluierung der Zellverteilung in Relation zum Tumor [81], [82]. Die dreidimensionale Darstellung erlaubte zudem eine Betrachtung der Tumormikroumgebung ober- und unterhalb der Schnittebene.

Zusammenfassend zeigt sich, dass die Multiplex-Färbung eine wertvolle Erweiterung innerhalb der HORUS-Methode darstellt und in Kombination mit klinischen Daten zukünftig wesentlich zur Charakterisierung und Individualisierung der Diagnostik beitragen kann.

5. Ausblick

Das Projekt HORUS (BMBF 13GW057D) ergänzt die konventionelle Pathologie um zerstörungsfreie, dreidimensionale μ CT-Analysen. Das Ziel besteht darin, die Untersuchung bislang unzugänglicher Gewebestrukturen zu ermöglichen, die Diagnostik zu individualisieren und umfassender zu gestalten. Ein KI-basierter Algorithmus identifiziert relevante Schnittebenen für molekulare Analysen, wie etwa Multiplex-Färbungen. Die Intention besteht darin, dass dies zukünftig eine präzisere, auf den Patienten zugeschnittene Diagnostik unterstützt.

Zur Optimierung der Identifikation histologischer Strukturen wurde ein Färbeverfahren entwickelt, welches direkt auf der FFPE-Blockoberfläche angewendet wird. In der Zukunft ist die Erprobung alternativer Färbemethoden (beispielsweise H&E) sowie Aufnahmetechniken, wie etwa des Slide Scanners, vorgesehen, mit dem Ziel, die Auflösung und Bildqualität zu erhöhen.

Die Kombination von Multiplex-Färbungen mit μ CT-Scans ermöglicht die Erfassung zusätzlicher Informationen über Immunzellinfiltrate und könnte zukünftig ein integraler Bestandteil der HORUS-Methode werden. Dies ermöglicht eine molekulare Erweiterung des diagnostischen Spektrums, die klinisch von Relevanz ist.

Die Analyse der Daten mittels eines Phasenkontrast- μ CT-Systems hat sich als praktikabel für zukünftige Workflows erwiesen. Mittels Färbungen und Annotationsübertragung wird eine präzise Abbildung pathologischer Strukturen in den μ CT-Daten ermöglicht.

Zur Optimierung der Orientierung im μ CT-Datensatz ist die Einbeziehung von Oberflächenprofilen der entparaffinierten Blockoberflächen vorgesehen. Die vorliegenden Höheninformationen tragen zur exakten Zuordnung von Strukturen bei und könnten einen Beitrag zur Optimierung der automatisierten Reidentifikation leisten.

Die Weiterentwicklung eines Algorithmus zur Ebenendetektion eröffnet neue Möglichkeiten für schnittbasierte Analysen, wie beispielsweise MALDI. Die automatisierte Annotation durch KI zeigt bereits eine hohe Präzision bei der Analyse von Tumorgewebe. Zukünftige Arbeiten sollten größere Datenmengen einbeziehen, hybride Annotationsverfahren entwickeln und die klinische Relevanz durch Korrelation mit Parametern wie Entzündungsmarkern vertiefen.

Für die Bildsegmentierung wurde ein U-Net-Modell mit DiceLoss verwendet. Die Ergebnisse bilden eine solide Grundlage für weiterführende Arbeiten, wie etwa den Vergleich mit anderen Modellen, die Optimierung der Hyperparameter und die multimodale Segmentierung in anderen Datensätzen.

Die Auswertung ergab eine hohe Präzision KI-basierter Annotationen bei spezifischen Gewebetypen. Um die Erkennungsrate weiter zu steigern, empfiehlt es sich, die Trainingsdaten gezielt um schwer erkennbare Gewebearten zu erweitern und hybride Verfahren zu testen. Langfristig könnte die Implementierung von KI-Systemen in die Pathologie zu einer Unterstützung der Patholog:innen führen.

Die Kombination von μ CT-Daten, histologischen Schnitten und klinischen Parametern erlaubt eine tiefere Einordnung immuntherapeutischer Effekte – insbesondere bei der Behandlung von Tumoren mit hoher Vaskularisierung. Die Analyse der vaskulären Dynamik birgt das Potenzial, prädiktive Biomarker zu identifizieren und eine personalisierte Therapieoptimierung zu ermöglichen. Zukünftig besteht die Möglichkeit, Gefäßdaten in Echtzeit zu nutzen, um die Wirksamkeit von Behandlungen zu bewerten und diese gezielt anzupassen.

HORUS demonstriert die potenzielle Erweiterung der klassischen Pathologie durch den Einsatz von μ CT-Bildgebung, KI-basierter Auswertung und molekularer Diagnostik. Die nächsten Schritte umfassen größere Studienkohorten, methodische Weiterentwicklungen und die Integration klinischer Daten. Die Verbindung von Bilddaten mit molekularen und genetischen Profilen eröffnet neue Perspektiven für die personalisierte Medizin und die gezielte Krebstherapie.

6. Literaturverzeichnis

- [1] A. von Schoenfeld u. a., „Multiple Immunostainings with Different Epitope Retrievals-The FOLGAS Protocol.“, *Int. J. Mol. Sci.*, Bd. 23, Nr. 1, Dez. 2021, doi: 10.3390/ijms23010223.
- [2] J. Chen u. a., „2D-3D Deformable Image Registration of Histology Slide and Micro-CT with ML-based Initialization“, *ArXiv Prepr. ArXiv241014343*, 2024.
- [3] S. S. Lakkimsetty u. a., „MSlreg: an R package for unsupervised coregistration of mass spectrometry and H&E images“, *Bioinformatics*, S. btae624, Okt. 2024, doi: 10.1093/bioinformatics/btae624.
- [4] C. Skelly, „Analysis- “This is Fine” Meme“, Medium. Zugegriffen: 10. März 2025. [Online]. Verfügbar unter: <https://medium.com/@CWSkelly/analysis-this-is-fine-meme-e8980ff61e78>
- [5] W. K. Funkhouser, *Pathology: The Clinical Description of Human Disease*. in Elsevier eBooks. 2009.
- [6] L. F. B Märkl, „Number of pathologists in Germany: comparison with European countries, USA, and Canada“, *Virchows Arch.*, Bd. 478, Nr. 2, S. 335–341, 2020, doi: <https://doi.org/10.1007/s00428-020-02894-6>.
- [7] DAkKS, „DAkKS“, Deutsche Akkreditierungsstelle. Zugegriffen: 7. Februar 2025. [Online]. Verfügbar unter: <https://www.dakks.de/de/home.html>
- [8] D. S. Curelea, A. Hartmann, und D. A. Várnai-Händel, „Die Akkreditierung in der Pathologie und Neuropathologie in Deutschland“, *Pathol.*, Bd. 43, Nr. 5, S. 334–337, 2022.
- [9] H. Hillman, „Limitations of clinical and biological histology“, *Med. Hypotheses*, Bd. 54, Nr. 4, S. 553–564, 2000, doi: <https://doi.org/10.1054/mehy.1999.0894>.
- [10] M. P. SW Jahn, „Digital Pathology: Advantages, Limitations and Emerging Perspectives“, *J. Clin. Med.*, Bd. 9, Nr. 11, S. 3697–3697, 2020, doi: <https://doi.org/10.3390/jcm9113697>.
- [11] O. Maassen u. a., „Future medical artificial intelligence application requirements and expectations of physicians in German university hospitals: web-based survey“, *J. Med. Internet Res.*, Bd. 23, Nr. 3, S. e26646, 2021.
- [12] S. Foersch und S. Schulz, „Künstliche Intelligenz in der Pathologie: Status quo und Zukunftsperspektiven“, *Onkol.*, Bd. 30, Nr. 5, S. 362–371, Mai 2024, doi: 10.1007/s00761-024-01482-6.
- [13] C. P. P Schmezer, „Epigenetic aspects in carcinomas of the head and neck“, *Springer eBooks*, 2008, doi: <https://doi.org/10.1007/s00106-008-1720-3>.
- [14] M. L. Tornesello, C. Annunziata, A. L. Tornesello, L. Buonaguro, und F. M. Buonaguro, „Human oncoviruses and p53 tumor suppressor pathway deregulation at the origin of human cancers“, *Cancers*, Bd. 10, Nr. 7, S. 213, 2018.
- [15] J. Fucikova u. a., „Prognostic and predictive value of DAMPs and DAMP-associated processes in cancer“, *Front. Immunol.*, Bd. 6, S. 402, 2015.
- [16] T. N. Schumacher, W. Scheper, und P. Kvistborg, „Cancer neoantigens“, *Annu. Rev. Immunol.*, Bd. 37, Nr. 1, S. 173–200, 2019.
- [17] J. W. X Jiang, „Role of the tumor microenvironment in PD-L1/PD-1-mediated tumor immune escape“, 2019, doi: <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0928-4>.
- [18] J. W. A Ribas, „Cancer immunotherapy using checkpoint blockade“, *Science*, 2018, doi: 10.1126/science.aar4060.
- [19] K. D. McCoy und G. Le Gros, „The role of CTLA-4 in the regulation of T cell immune responses.“, *Immunol. Cell Biol.*, Bd. 77, Nr. 1, S. 1–10, Feb. 1999, doi: 10.1046/j.1440-1711.1999.00795.x.
- [20] E. Mortier, A. Ma, B. A. Malynn, und M. F. Neurath, „Editorial: Modulating Cytokines as Treatment for Autoimmune Diseases and Cancer“, *Front. Immunol.*, Bd. 11, S. 608636, 2020, doi: 10.3389/fimmu.2020.608636.
- [21] J. G.-E. B Lores, „Lymph nodes and human tumors (review)“, *Int. J. Mol. Med.*, 1998, doi: <https://doi.org/10.3892/ijmm.1.4.729>.

- [22] F. B. HP Zenner, „Immunological aspects of tonsils and of tonsillitis“, 1998, doi: <https://doi.org/10.3109/00016488809125008>.
- [23] F. H. Netter, *Netter atlas of human anatomy: Classic regional approach-ebook*. 2019.
- [24] M. D. la F. G Landskron, „Chronic Inflammation and Cytokines in the Tumor Microenvironment“, 2014, doi: <https://doi.org/10.1155/2014/149185>.
- [25] M. K. SI Grivennikov, „Inflammation and oncogenesis: a vicious connection“, *Elsevier BV*, 2010, doi: <https://doi.org/10.1016/j.gde.2009.11.004>.
- [26] A. G. H Nave, „Morphology and immunology of the human palatine tonsil“, 2001, doi: <https://doi.org/10.1007/s004290100210>.
- [27] B. Arambula, „Anatomy and physiology of the palatine tonsils, adenoids, and lingual tonsils“, 2021, doi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8356106/>.
- [28] C. W. K Murphy, *Die humorale Immunantwort*. in Springer eBooks. 2018.
- [29] S. S. S Hartwig, „Estimation of the epidemiological burden of human papillomavirus-related cancers and non-malignant diseases in men in Europe: a review“, *BMC Cancer*, 2012, doi: <https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-30>.
- [30] L. Alabdulaaly, A. Almazyad, und S.-B. Woo, „Gingival leukoplakia: hyperkeratosis with epithelial atrophy is a frequent histopathologic finding“, *Head Neck Pathol.*, Bd. 15, Nr. 4, S. 1235–1245, 2021.
- [31] A. Y. Deneka u. a., „Association of TP53 and CDKN2A Mutation Profile with Tumor Mutation Burden in Head and Neck Cancer.“, *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, Bd. 28, Nr. 9, S. 1925–1937, Mai 2022, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-21-4316.
- [32] D. Bell, M. D. Williams, und A. K. El-Naggar, „Pathology of head and neck tumors“, *Oncol. Surg. Pathol.*, S. 573–579, 2020.
- [33] T. Fukusumi und J. A. Califano, „The NOTCH Pathway in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma.“, *J. Dent. Res.*, Bd. 97, Nr. 6, S. 645–653, Juni 2018, doi: 10.1177/0022034518760297.
- [34] N. Stransky u. a., „The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma.“, *Science*, Bd. 333, Nr. 6046, S. 1157–1160, Aug. 2011, doi: 10.1126/science.1208130.
- [35] T. Dalianis, „Human papillomavirus (HPV) and oropharyngeal squamous cell carcinoma“, *Presse Medicale Paris Fr.* 1983, Bd. 43, Nr. 12 Pt 2, S. e429-434, Dez. 2014, doi: 10.1016/j.lpm.2014.08.010.
- [36] F. L. Y Li, „A Mini-Review for Cancer Immunotherapy: Molecular Understanding of PD-1/PD-L1 Pathway & Translational Blockade of Immune Checkpoints“, *Int. J. Mol. Sci.*, Bd. 17, Nr. 7, S. 1151–1151, 2016, doi: <https://doi.org/10.3390/ijms17071151>.
- [37] A. Harris und T. Andl, „Precancerous Lesions of the Head and Neck Region and Their Stromal Aberrations: Piecemeal Data.“, *Cancers*, Bd. 15, Nr. 8, Apr. 2023, doi: 10.3390/cancers15082192.
- [38] S. Koontongkaew, „The tumor microenvironment contribution to development, growth, invasion and metastasis of head and neck squamous cell carcinomas.“, *J. Cancer*, Bd. 4, Nr. 1, S. 66–83, 2013, doi: 10.7150/jca.5112.
- [39] B. M. A Rubbert, „Functional characterization of tumor-infiltrating lymphocytes, lymph-node lymphocytes and peripheral-blood lymphocytes from patients with breast cancer“, *Int. J. Cancer*, 1991.
- [40] C. P. L Zamai, „NK Cells and Cancer“, *J Immunol*, 2007, doi: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.7.4011>.
- [41] I. A. Robadi, M. Pharaon, und B. S. Ducatman, „The Importance of High-Risk Human Papillomavirus Types Other Than 16 and 18 in Cervical Neoplasia“, *Arch. Pathol. Lab. Med.*, Bd. 142, Nr. 6, S. 693–695, Juni 2018, doi: 10.5858/arpa.2017-0563-RA.
- [42] K. Munger, „The role of human papillomaviruses in human cancers“, *Front. Biosci.-Landmark*, Bd. 7, Nr. 4, Art. Nr. 4, Marz 2002, doi: 10.2741/A800.

- [43] R. Woods, E. M. O'Regan, S. Kennedy, C. Martin, J. J. O'Leary, und C. Timon, „Role of human papillomavirus in oropharyngeal squamous cell carcinoma: A review“, *World J. Clin. Cases*, Bd. 2, Nr. 6, S. 172–193, Juni 2014, doi: 10.12998/wjcc.v2.i6.172.
- [44] D. Goldenberg u. a., „Cystic lymph node metastasis in patients with head and neck cancer: An HPV-associated phenomenon“, *Head Neck*, Bd. 30, Nr. 7, S. 898–903, Juli 2008, doi: 10.1002/hed.20796.
- [45] K. K. Ang u. a., „Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer“, *N. Engl. J. Med.*, Bd. 363, Nr. 1, S. 24–35, Juli 2010, doi: 10.1056/NEJMoa0912217.
- [46] G. B. Stanford-Moore, E. Ochoa, A. Larson, M. Han, K. Hoppe, und W. R. Ryan, „Patterns of Nodal Metastases and Predictors of Occult Disease in HPV-Associated Oropharynx Cancer“, *Otolaryngol.--Head Neck Surg. Off. J. Am. Acad. Otolaryngol.-Head Neck Surg.*, Bd. 164, Nr. 3, S. 624–630, März 2021, doi: 10.1177/0194599820951473.
- [47] I. Zhang, B. F. Branstetter, D. M. Beswick, J. H. Maxwell, W. E. Gooding, und R. L. Ferris, „The benefit of early PET/CT surveillance in HPV-associated head and neck squamous cell carcinoma“, *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, Bd. 137, Nr. 11, S. 1106–1111, Nov. 2011, doi: 10.1001/archoto.2011.181.
- [48] M. E. Harden, N. Prasad, A. Griffiths, und K. Munger, „Modulation of microRNA-mRNA Target Pairs by Human Papillomavirus 16 Oncoproteins“, *mBio*, Bd. 8, Nr. 1, S. e02170-16, Jan. 2017, doi: 10.1128/mBio.02170-16.
- [49] V. Bol und V. Grégoire, „Biological basis for increased sensitivity to radiation therapy in HPV-positive head and neck cancers“, *BioMed Res. Int.*, Bd. 2014, S. 696028, 2014, doi: 10.1155/2014/696028.
- [50] C. S. Kong, B. L. Balzer, M. L. Troxell, B. K. Patterson, und T. A. Longacre, „p16INK4A immunohistochemistry is superior to HPV in situ hybridization for the detection of high-risk HPV in atypical squamous metaplasia“, *Am. J. Surg. Pathol.*, Bd. 31, Nr. 1, S. 33–43, Jan. 2007, doi: 10.1097/01.pas.0000213347.65014.ee.
- [51] B. Seliger und C. Massa, „Immune Therapy Resistance and Immune Escape of Tumors“, *Cancers*, Bd. 13, Nr. 3, Art. Nr. 3, Jan. 2021, doi: 10.3390/cancers13030551.
- [52] M. W. Rohaan, S. Wilgenhof, und J. B. A. G. Haanen, „Adoptive cellular therapies: the current landscape“, *Virchows Arch. Int. J. Pathol.*, Bd. 474, Nr. 4, S. 449–461, Apr. 2019, doi: 10.1007/s00428-018-2484-0.
- [53] M. Gupta u. a., „Recent Advances in Cancer Vaccines: Challenges, Achievements, and Futuristic Prospects“, *Vaccines*, Bd. 10, Nr. 12, Art. Nr. 12, Dez. 2022, doi: 10.3390/vaccines10122011.
- [54] L. Guo, H. Zhang, und B. Chen, „Nivolumab as Programmed Death-1 (PD-1) Inhibitor for Targeted Immunotherapy in Tumor“, *J. Cancer*, Bd. 8, Nr. 3, S. 410–416, 2017, doi: 10.7150/jca.17144.
- [55] R. L. Ferris u. a., „Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck“, *N. Engl. J. Med.*, Bd. 375, Nr. 19, S. 1856–1867, Nov. 2016, doi: 10.1056/NEJMoa1602252.
- [56] M. L. Gillison u. a., „CheckMate 141: 1-Year Update and Subgroup Analysis of Nivolumab as First-Line Therapy in Patients with Recurrent/Metastatic Head and Neck Cancer“, *The Oncologist*, Bd. 23, Nr. 9, S. 1079–1082, Sep. 2018, doi: 10.1634/theoncologist.2017-0674.
- [57] J. A. Kiernan, „Nuclear Stains“, *Cold Spring Harb. Lab. Press*, Bd. 2008, Nr. 7, S. pdb.top50-pdb.top50, 2008.
- [58] C. L. JD Bancroft, *The hematoxylin and eosin*, Bd. 7. 2012.
- [59] H. H. H Alsharif, *Histopathological Characteristics and Classification for Prognostic Indicators*. in IntechOpen. 2019.
- [60] M. J. Waring, „Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids“, *Elsevier BV*, Bd. 13, S. 269-282-269–282, 1965.

- [61] „NIST XCOM: Element/Compound/Mixture“. Zugegriffen: 10. Februar 2025. [Online]. Verfügbar unter: <https://physics.nist.gov/PhysRefData/Xcom/html/xcom1.html>
- [62] C. P. BJC Quah, „The use of carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) to monitor lymphocyte proliferation“, *JoVE J. Vis. Exp.*, S. e2259–e2259, 2010.
- [63] E. R. Parra, A. Francisco-Cruz, und I. I. Wistuba, „State-of-the-Art of Profiling Immune Contexture in the Era of Multiplexed Staining and Digital Analysis to Study Paraffin Tumor Tissues.“, *Cancers*, Bd. 11, Nr. 2, Feb. 2019, doi: 10.3390/cancers11020247.
- [64] M. M. Bolognesi u. a., „Multiplex Staining by Sequential Immunostaining and Antibody Removal on Routine Tissue Sections“, *J. Histochem. Cytochem.*, Bd. 65, Nr. 8, S. 431–444, 2017, doi: 10.1369/0022155417719419.
- [65] J. Syed u. a., „Multiplex immunohistochemistry: the importance of staining order when producing a validated protocol“, *Immunotherapy*, Bd. 5, Nr. 2, S. 157, 2019.
- [66] W. C. C. Tan u. a., „Overview of multiplex immunohistochemistry/immunofluorescence techniques in the era of cancer immunotherapy.“, *Cancer Commun. Lond. Engl.*, Bd. 40, Nr. 4, S. 135–153, Apr. 2020, doi: 10.1002/cac2.12023.
- [67] M. Guo, M. Y. R. Liu, und D. G. Brooks, „Regulation and impact of tumor-specific CD4(+) T cells in cancer and immunotherapy.“, *Trends Immunol.*, Bd. 45, Nr. 4, S. 303–313, Apr. 2024, doi: 10.1016/j.it.2024.02.005.
- [68] D. K. Cole und G. F. Gao, „CD8: adhesion molecule, co-receptor and immuno-modulator.“, *Cell. Mol. Immunol.*, Bd. 12, S. 81–8.
- [69] M. S. Kuhns, M. M. Davis, und K. C. Garcia, „Deconstructing the form and function of the TCR/CD3 complex“, *Immunity*, Bd. 24, Nr. 2, S. 133–139, 2006.
- [70] A. G. Levine, A. Arvey, W. Jin, und A. Y. Rudensky, „Continuous requirement for the TCR in regulatory T cell function“, *Nat. Immunol.*, Bd. 15, Nr. 11, S. 1070–1078, 2014.
- [71] S. Ostrand-Rosenberg, L. A. Horn, und S. T. Haile, „The programmed death-1 immune-suppressive pathway: barrier to antitumor immunity.“, *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, Bd. 193, Nr. 8, S. 3835–3841, Okt. 2014, doi: 10.4049/jimmunol.1401572.
- [72] T. F. Tedder und P. Engel, „CD20: a regulator of cell-cycle progression of B lymphocytes.“, *Immunol. Today*, Bd. 15, Nr. 9, S. 450–454, Sep. 1994, doi: 10.1016/0167-5699(94)90276-3.
- [73] P. G. Chu und D. A. Arber, „CD79: a review.“, *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol. AIMM*, Bd. 9, Nr. 2, S. 97–106, Juni 2001, doi: 10.1097/00129039-200106000-00001.
- [74] J. Zhang, S. Li, F. Liu, und K. Yang, „Role of CD68 in tumor immunity and prognosis prediction in pan-cancer“, *Sci. Rep.*, Bd. 12, Nr. 1, S. 7844, Mai 2022, doi: 10.1038/s41598-022-11503-2.
- [75] L. M. S. Pereira, S. T. M. Gomes, R. Ishak, und A. C. R. Vallinoto, „Regulatory T Cell and Forkhead Box Protein 3 as Modulators of Immune Homeostasis.“, *Front. Immunol.*, Bd. 8, S. 605, 2017, doi: 10.3389/fimmu.2017.00605.
- [76] V. Lazarevic, L. H. Glimcher, und G. M. Lord, „T-bet: a bridge between innate and adaptive immunity.“, *Nat. Rev. Immunol.*, Bd. 13, Nr. 11, S. 777–789, Nov. 2013, doi: 10.1038/nri3536.
- [77] G. Onofre, M. Kolackova, K. Jankovicová, und J. Krejsek, „Scavenger Receptor CD163 and Its Biological Functions“, *Acta Medica Hradec Král. Univ. Carol. Fac. Medica Hradec Král.*, Bd. 52, S. 57–61, Jan. 2009, doi: 10.14712/18059694.2016.105.
- [78] M. Palaiologou, I. Delladetsima, und D. Tiniakos, „CD138 (syndecan-1) expression in health and disease.“, *Histol. Histopathol.*, Bd. 29, Nr. 2, S. 177–189, Feb. 2014, doi: 10.14670/HH-29.177.
- [79] H. Stockinger, W. Schreiber, O. Majdic, W. Holter, D. Maurer, und W. Knapp, „Phenotype of human T cells expressing CD31, a molecule of the immunoglobulin supergene family.“, *Immunology*, Bd. 75, Nr. 1, S. 53–58, Jan. 1992.

- [80] D. R. Sutherland und A. Keating, „The CD34 antigen: structure, biology, and potential clinical applications.“, *J. Hematother.*, Bd. 1, Nr. 2, S. 115–129, Summer 1992, doi: 10.1089/scd.1.1992.1.115.
- [81] N. Khan, „Ck AE1/AE3 Tumor Marker Expression in SCC of Head and Neck“, *Cell Biol. Res. Ther.*, Bd. 03, Jan. 2014, doi: 10.4172/2324-9293.1000109.
- [82] C. Esche, C. Stellato, und L. A. Beck, „Chemokines: key players in innate and adaptive immunity.“, *J. Invest. Dermatol.*, Bd. 125, Nr. 4, S. 615–628, Okt. 2005, doi: 10.1111/j.0022-202X.2005.23841.x.
- [83] M. Kisielow, J. Kisielow, G. Capoferri-Sollami, und K. Karjalainen, „Expression of lymphocyte activation gene 3 (LAG-3) on B cells is induced by T cells.“, *Eur. J. Immunol.*, Bd. 35, Nr. 7, S. 2081–2088, Juli 2005, doi: 10.1002/eji.200526090.
- [84] K. Sakuishi, P. Jayaraman, S. M. Behar, A. C. Anderson, und V. K. Kuchroo, „Emerging Tim-3 functions in antimicrobial and tumor immunity.“, *Trends Immunol.*, Bd. 32, Nr. 8, S. 345–349, Aug. 2011, doi: 10.1016/j.it.2011.05.003.
- [85] M. P.-C. RM Martínez-Ojeda, „Multiphoton Microscopy of Oral Tissues: Review“, *Front. Media*, Bd. 8, 2020, doi: <https://doi.org/10.3389/fphy.2020.00128>.
- [86] P. P.-G. A Walter, „Correlated Multimodal Imaging in Life Sciences: Expanding the Biomedical Horizon“, *Front. Media*, Bd. 8, 2020, doi: <https://doi.org/10.3389/fphy.2020.00047>.
- [87] K. Thorn, „A quick guide to light microscopy in cell biology“, *Am. Soc. Cell Biol.*, Bd. 27, Nr. 2, S. 219–222, 2016, doi: <https://doi.org/10.1091/mbc.e15-02-0088>.
- [88] X. Z. Y Wang, „The Development of Microscopic Imaging Technology and its Application in Micro- and Nanotechnology“, *Front. Media*, Bd. 10, 2022, doi: <https://doi.org/10.3389/fchem.2022.931169>.
- [89] H. Leschik, „Photonen–Über die Wechselwirkung photonischer Energie im biologischen Organismus: High dose und Low dose-Verfahren in ophthalmologisch therapeutischer Anwendung“, 2014.
- [90] K. R. A. MD Zarella, „High-throughput whole-slide scanning to enable large-scale data repository building“, *J. Pathol.*, Bd. 257, S. 383–390–383–390, 2022.
- [91] P. F. AW Wetzel, „Design of a high-speed slide imaging system for pathology“, *Int. Symp. Biomed. Imaging*, 2003, doi: 10.1109/ISBI.2002.1029254.
- [92] M. Z. F Aeffner, „Introduction to Digital Image Analysis in Whole-slide Imaging: A White Paper from the Digital Pathology Association“, *Elsevier BV*, Bd. 10, Nr. 1, S. 9–9, 2019, doi: https://doi.org/10.4103/jpi.jpi_82_18.
- [93] R. D. JA Beckstead, „High-throughput high-resolution microscopic slide digitization for pathology“, *SPIE*, 2003, doi: <https://doi.org/10.1117/12.476149>.
- [94] W. Sheng u. a., „Multiplex Immunofluorescence: A Powerful Tool in Cancer Immunotherapy“, *Int. J. Mol. Sci.*, Bd. 24, Nr. 4, Feb. 2023, doi: 10.3390/ijms24043086.
- [95] A. Francisco-Cruz, E. R. Parra, M. T. Tetzlaff, und I. I. Wistuba, „Multiplex Immunofluorescence Assays“, *Methods Mol. Biol. Clifton NJ*, Bd. 2055, S. 467–495, 2020, doi: 10.1007/978-1-4939-9773-2_22.
- [96] E. Parra Cuentas, „Novel Platforms of Multiplexed Immunofluorescence for Study of Paraffin Tumor Tissues“, *J. Cancer Treat. Diagn.*, Bd. 2, S. 43–53, Dez. 2017, doi: 10.29245/2578-2967/2018/1.1122.
- [97] E. D. Getzoff, H. M. Geysen, S. J. Rodda, H. Alexander, J. A. Tainer, und R. A. Lerner, „Mechanisms of antibody binding to a protein.“, *Science*, Bd. 235, Nr. 4793, S. 1191–1196, März 1987, doi: 10.1126/science.3823879.
- [98] J. Ramlau, „Use of secondary antibodies for visualization of bound primary reagents in blotting procedures“, *ELECTROPHORESIS*, Bd. 8, Nr. 9, S. 398–402, Jan. 1987, doi: 10.1002/elps.1150080906.

- [99] C. L. Schreiber, D.-H. Li, und B. D. Smith, „High-Performance Near-Infrared Fluorescent Secondary Antibodies for Immunofluorescence“, *Anal. Chem.*, Bd. 93, Nr. 7, S. 3643–3651, Feb. 2021, doi: 10.1021/acs.analchem.1c00276.
- [100] U. D. Z Földes-Papp, „Laser scanning confocal fluorescence microscopy: an overview“, *Elsevier BV*, Bd. 3, S. 1715-1729-1715–1729, 2003.
- [101] A. Kinkhabwala u. a., „MACSima imaging cyclic staining (MICS) technology reveals combinatorial target pairs for CAR T cell treatment of solid tumors“, *Sci. Rep.*, Bd. 12, Nr. 1, S. 1911, Feb. 2022, doi: 10.1038/s41598-022-05841-4.
- [102] S. Reiß u. a., „Abstract 245: Characterization and classification of glioblastoma multiforme using the novel multiparametric cyclic immunofluorescence analysis system MACSima“, *Cancer Res.*, Bd. 79, Nr. 13_Supplement, S. 245–245, Juli 2019, doi: 10.1158/1538-7445.AM2019-245.
- [103] O. D. Lavrentovich, „Confocal fluorescence microscopy“, *Wiley Online Libr.*, S. 1-15-1–15, 2002.
- [104] K. G. B Al-Nawas, „Validation of three-dimensional surface characterising methods: Scanning electron microscopy and confocal laser scanning microscopy“, *Scanning*, Bd. 23, S. 227-231-227–231, 2001.
- [105] B. R. BVR Tata, „Confocal laser scanning microscopy: Applications in material science and technology“, *Bull. Mater. Sci.*, Bd. 21, S. 263-278-263–278, 1998.
- [106] A. V. K. E. Merson, „The use of confocal laser scanning microscopy for the 3D quantitative characterization of fracture surfaces and cleavage facets“, Bd. 2, S. 533-540-533–540, 2016.
- [107] E. L. Ritman, „Current Status of Developments and Applications of Micro-CT“, 2011, doi: <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071910-124717>.
- [108] C. B. A Du Plessis, „Laboratory x-ray micro-computed tomography: a user guideline for biological samples“, *Univ. Oxf.*, Bd. 6, Nr. 6, 2017.
- [109] H. D. Anna Khimchenko, „Extending two-dimensional histology into the third dimension through conventional micro computed tomography“, 2016, doi: 10.1016/j.neuroimage.2016.06.005.
- [110] F. Beckmann, U. Bonse, F. Busch, und O. Günnewig, „X-ray microtomography (microCT) using phase contrast for the investigation of organic matter“, *J Comput Assist Tomogr*, Bd. 21, Nr. 4, S. 539–53, Aug. 1997, doi: 10.1097/00004728-199707000-00006.
- [111] M. T. M Eckermann, „Phase-contrast x-ray tomography of neuronal tissue at laboratory sources with submicron resolution“, *SPIE*, Bd. 7, Nr. 01, S. 1–1, 2020.
- [112] U. Bonse, F. Beckmann, und T. Biermann, „X-ray microtomography (μ CT) using interferometric phase contrast“, *AIP Conf. Proc.*, Bd. 507, Nr. 1, S. 69–75, 2000, doi: 10.1063/1.1291121.
- [113] W. K. T Tangcharoen, „Synchrotron X-ray absorption spectroscopy and magnetic characteristics studies of metal ferrites (metal = Ni, Mn, Cu) synthesized by sol-gel auto-combustion method“, 2014, doi: <https://doi.org/10.1002/pssa.201330477>.
- [114] P. Willmott, *An introduction to synchrotron radiation: Techniques and applications*. 2019.
- [115] O. B. N Chiaruttini, „An Open-Source Whole Slide Image Registration Workflow at Cellular Precision Using Fiji, QuPath and Elastix“, *Front. Comput. Sci.*, Bd. 3, 2022, doi: <https://doi.org/10.3389/fcomp.2021.780026>.
- [116] M. L. P Bankhead, „QuPath: Open source software for digital pathology image analysis“, *Sci. Rep.*, Bd. 7, S. 1-7-1–7, 2017.
- [117] M. F. R Pallenberg, „Automatic quality measurement of aortic contrast-enhanced CT angiographies for patient-specific dose optimization“, *Springer Sci. Media*, Bd. 15, Nr. 10, S. 1611–1617, 2020, doi: <https://doi.org/10.1007/s11548-020-02238-4>.
- [118] J. M. C Wang, „Predicting EGFR and PD-L1 Status in NSCLC Patients Using Multitask AI System Based on CT Images“, *Front. Media*, Bd. 13, 2022, doi: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.813072>.

- [119] Y. S. J. Sun, „Interactive Medical Image Segmentation via Point-Based Interaction and Sequential Patch Learning“, *Cornell Univ.*, 2018, doi: <https://doi.org/10.48550/arXiv.1804.1048>.
- [120] P. F. Olaf Ronneberger, „U-Net: Convolutional Networks for Biomedical Image Segmentation“, 2015, doi: https://doi.org/10.1007/978-3-319-24574-4_28.
- [121] M. de B. H. Kervadec, „On the dice loss gradient and the ways to mimic it“, *Arxiv*, 2023, doi: <https://doi.org/10.48550/arXiv.2304.04319>.
- [122] D. Hale, „Fast local cross-correlations of images“, gehalten auf der SEG International Exposition and Annual Meeting, SEG, 2006, S. SEG-2006.
- [123] M. P. Heinrich, B. W. Papież, J. A. Schnabel, und H. Handels, „Multispectral image registration based on local canonical correlation analysis“, gehalten auf der Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention–MICCAI 2014: 17th International Conference, Boston, MA, USA, September 14-18, 2014, Proceedings, Part I 17, Springer, 2014, S. 202–209.
- [124] Y. Fu, Y. Lei, T. Wang, W. J. Curran, T. Liu, und X. Yang, „Deep learning in medical image registration: a review“, *Phys. Med. Biol.*, Bd. 65, Nr. 20, S. 20TR01, 2020.
- [125] I. Goodfellow u. a., „Generative adversarial networks“, *Commun. ACM*, Bd. 63, Nr. 11, S. 139–144, 2020.
- [126] K. Armanious, C. Jiang, S. Abdulatif, T. Küstner, S. Gatidis, und B. Yang, „Unsupervised medical image translation using cycle-MedGAN“, gehalten auf der 2019 27th European signal processing conference (EUSIPCO), IEEE, 2019, S. 1–5.
- [127] D. Rueckert, L. I. Sonoda, C. Hayes, D. L. Hill, M. O. Leach, und D. J. Hawkes, „Nonrigid registration using free-form deformations: application to breast MR images“, *IEEE Trans. Med. Imaging*, Bd. 18, Nr. 8, S. 712–721, 1999.
- [128] S. Baloch, F. Ghazali, N. Mir, F. Farrukh, H. Ismail, und M. Y. Qadri, „Hardware realization of locally normalized cross correlation algorithm“, gehalten auf der The 2014 2nd International Conference on Systems and Informatics (ICSAI 2014), IEEE, 2014, S. 378–382.
- [129] R. Raffin, „Free form deformations or deformations non-constrained by geometries or topologies“, in *Deformation Models: Tracking, Animation and Applications*, Springer, 2012, S. 49–74.
- [130] A. V. Dalca, G. Balakrishnan, J. Guttag, und M. R. Sabuncu, „Unsupervised learning of probabilistic diffeomorphic registration for images and surfaces“, *Med. Image Anal.*, Bd. 57, S. 226–236, 2019.
- [131] Ch. Wittekind, F. Bootz, und H.-J. Meyer, Hrsg., *TNM Klassifikation maligner Tumoren*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2004. doi: 10.1007/978-3-662-10566-5.
- [132] L. H. Sobin, „TNM: principles, history, and relation to other prognostic factors“, *Cancer*, Bd. 91, Nr. 8 Suppl, S. 1589–1592, Apr. 2001, doi: 10.1002/1097-0142(20010415)91:8+<1589::aid-cnrcr1170>3.0.co;2-k.
- [133] D. Kang u. a., „Exploration of the relationship between tumor-infiltrating lymphocyte score and histological grade in breast cancer“, *BMC Cancer*, Bd. 24, Nr. 1, S. 318, März 2024, doi: 10.1186/s12885-024-12069-0.
- [134] „Posit“, Posit. Zugriffen: 10. Dezember 2024. [Online]. Verfügbar unter: <https://www.posit.co/>
- [135] J. Verzani, „Getting Started with RStudio“, Sep. 2011. Zugriffen: 10. Dezember 2024. [Online]. Verfügbar unter: <https://www.semanticscholar.org/paper/Getting-Started-with-RStudio-Verzani/d95214e011117f9c73322b8aa4f35b6892c36e78>
- [136] M. A. Andresen, „R (Statistical Software)“, in *The Encyclopedia of Research Methods in Criminology and Criminal Justice*, John Wiley & Sons, Ltd, 2021, S. 865–866. doi: 10.1002/9781119111931.ch167.
- [137] M. Schneider und M. Schneider, „Darstellung von Daten“, *Datenanalyse Für Naturwissenschaftler Med. Ingenieure*, S. 29–46, 2020.

- [138] „Spearman’s rank correlation coefficient.“, *BMJ*, Bd. 362, S. k4131, Sep. 2018, doi: 10.1136/bmj.k4131.
- [139] D. Ohr, „Lineare Regression: Modellannahmen und Regressionsdiagnostik“, *Handb. Sozialwissenschaftlichen Datenanalyse*, S. 639–675, 2010.
- [140] S. Lange und R. Bender, „Lineare Regression und Korrelation“, *DMW-Dtsch. Med. Wochenschr.*, Bd. 132, Nr. S 01, S. e9–e11, 2007.
- [141] „MITOS GmbH — X-ray Inspection Services“. Zugegriffen: 21. November 2024. [Online]. Verfügbar unter: <https://www.mitos.de/en/services.html>
- [142] „Exciscope“, Exciscope. Zugegriffen: 21. November 2024. [Online]. Verfügbar unter: <https://exciscope.com/>
- [143] „TOMCAT - X02DA: Tomographic Microscopy | BL: SLS/TOMCAT | PSI“. Zugegriffen: 21. November 2024. [Online]. Verfügbar unter: <https://www.psi.ch/en/sls/tomcat>
- [144] D. Paganin, S. C. Mayo, T. E. Gureyev, P. R. Miller, und S. W. Wilkins, „Simultaneous phase and amplitude extraction from a single defocused image of a homogeneous object“, *J. Microsc.*, Bd. 206, Nr. 1, S. 33–40, 2002.
- [145] F. Marone und M. Stampanoni, „Regridding reconstruction algorithm for real-time tomographic imaging“, *J. Synchrotron Radiat.*, Bd. 19, Nr. 6, S. 1029–1037, 2012.
- [146] S. Flenner u. a., „Pushing the temporal resolution in absorption and Zernike phase contrast nanotomography: enabling fast *in situ* experiments“, *J. Synchrotron Radiat.*, Bd. 27, Nr. 5, S. 1339–1346, Sep. 2020, doi: 10.1107/S1600577520007407.
- [147] „ImFusion - ImFusion Labels“. Zugegriffen: 21. November 2024. [Online]. Verfügbar unter: <https://www.imfusion.com/products/imfusion-labels>
- [148] A. Gustschin u. a., „High-resolution and sensitivity bi-directional x-ray phase contrast imaging using 2D Talbot array illuminators“, *Optica*, Bd. 8, Nr. 12, S. 1588–1595, Dez. 2021, doi: 10.1364/OPTICA.441004.
- [149] M. Lustig, Q. Feng, Y. Payan, A. Gefen, und D. Benayahu, „Noninvasive Continuous Monitoring of Adipocyte Differentiation: From Macro to Micro Scales“, *Microsc. Microanal. Off. J. Microsc. Soc. Am. Microbeam Anal. Soc. Microsc. Soc. Can.*, Bd. 25, Nr. 1, S. 119–128, Feb. 2019, doi: 10.1017/S1431927618015520.
- [150] O. Ronneberger, P. Fischer, und T. Brox, „U-Net: Convolutional Networks for Biomedical Image Segmentation“, in *Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention – MICCAI 2015*, N. Navab, J. Hornegger, W. M. Wells, und A. F. Frangi, Hrsg., Cham: Springer International Publishing, 2015, S. 234–241. doi: 10.1007/978-3-319-24574-4_28.
- [151] L. de Boer u. a., „Method for coregistration of optical measurements of breast tissue with histopathology: the importance of accounting for tissue deformations.“, *J. Biomed. Opt.*, Bd. 24, Nr. 7, S. 1–12, Juli 2019, doi: 10.1117/1.JBO.24.7.075002.
- [152] „Digital Pathology (DX) • 3DHISTECH“. Zugegriffen: 10. März 2025. [Online]. Verfügbar unter: <https://www.3dhistech.com/solutions/digital-pathology-dx/>
- [153] „Histomography – The Third Dimension For Histology“. Zugegriffen: 10. März 2025. [Online]. Verfügbar unter: <https://histomography.com/>
- [154] C. Carla, F. Daris, B. Cecilia, B. Francesca, C. Francesca, und F. Paolo, „Angiogenesis in Head and Neck Cancer: A Review of the Literature“, *Journal of Oncology*, Bd. 2012, Nr. 1. S. 358472, 2012. [Online]. Verfügbar unter: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1155/2012/358472>
- [155] N. Ferrara und S. Bunting, „Vascular endothelial growth factor, a specific regulator of angiogenesis.“, *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, Bd. 5, Nr. 1, S. 35–44, Jan. 1996, doi: 10.1097/00041552-199601000-00008.
- [156] D. Belotti, D. Pinessi, und G. Tarabozetti, „Alternative Vascularization Mechanisms in Tumor Resistance to Therapy.“, *Cancers*, Bd. 13, Nr. 8, Apr. 2021, doi: 10.3390/cancers13081912.

- [157] K. I. E. M. Wijffels *u. a.*, „Vascular architecture and hypoxic profiles in human head and neck squamous cell carcinomas“, *Br. J. Cancer*, Bd. 83, Nr. 5, S. 674–683, Sep. 2000, doi: 10.1054/bjoc.2000.1325.
- [158] I. Krämer und H.-P. Lipp, „Bevacizumab, a humanized anti-angiogenic monoclonal antibody for the treatment of colorectal cancer.“, *J. Clin. Pharm. Ther.*, Bd. 32, Nr. 1, S. 1–14, Feb. 2007, doi: 10.1111/j.1365-2710.2007.00800.x.
- [159] M. Hoffmann, A. Hoopes, B. Fischl, und A. V. Dalca, „Anatomy-specific acquisition-agnostic affine registration learned from fictitious images“, gehalten auf der Medical imaging 2023: Image processing, SPIE, 2023, S. 1246402.
- [160] A. V. Dalca, J. Guttag, und M. R. Sabuncu, „Anatomical priors in convolutional networks for unsupervised biomedical segmentation“, gehalten auf der Proceedings of the IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition, 2018, S. 9290–9299.
- [161] J. A. Maintz und M. A. Viergever, „A survey of medical image registration“, *Med. Image Anal.*, Bd. 2, Nr. 1, S. 1–36, 1998.
- [162] J. Flusser, J. Boldys, und B. Zitová, „Moment forms invariant to rotation and blur in arbitrary number of dimensions“, *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.*, Bd. 25, Nr. 2, S. 234–246, 2003.
- [163] A. Kazerouni *u. a.*, „Diffusion models in medical imaging: A comprehensive survey“, *Med. Image Anal.*, Bd. 88, S. 102846, 2023.
- [164] A. W. Butch und M. H. Nahm, „Functional properties of human germinal center B cells.“, *Cell. Immunol.*, Bd. 140, Nr. 2, S. 331–344, Apr. 1992, doi: 10.1016/0008-8749(92)90200-9.
- [165] G. R. Arroyo, J. C. Hernaiz-Leonardo, M. Marvin-Huergo, und M. S. Dávalos-Fuentes, „Types of Head and Neck Malignancy“, in *Head and Neck Cancer: Hallmarks of the Inflammation Ecosystem*, Bentham Science Publishers, 2021, S. 28–76.
- [166] A. A. Razek und B. Y. Huang, „Soft tissue tumors of the head and neck: imaging-based review of the WHO classification.“, *Radiogr. Rev. Publ. Radiol. Soc. N. Am. Inc.*, Bd. 31, Nr. 7, S. 1923–1954, Dez. 2011, doi: 10.1148/rg.317115095.
- [167] M. Magnano, *Lymphnode metastasis in head and neck squamous cells carcinoma: multivariate analysis of prognostic variables*. 1999.
- [168] Y. Fu, J. A. Nagy, A. M. Dvorak, und H. F. Dvorak, „Tumor Blood Vessels“, 2008.
- [169] „Nicht kleinzelliges Bronchialkarzinom – CT-Texturanalyse als prognostischer Marker“, *RöFo - Fortschritte Auf Dem Geb. Röntgenstrahlen Bildgeb. Verfahr.*, Bd. 188, Nr. 05, S. 432–433, Apr. 2016, doi: 10.1055/s-0042-102261.
- [170] „Oberfläche von Glioblastomen als Biomarker für das Überleben“, *RöFo - Fortschritte Auf Dem Geb. Röntgenstrahlen Bildgeb. Verfahr.*, Bd. 191, Nr. 02, S. 111–111, Feb. 2019, doi: 10.1055/a-0755-0487.
- [171] K. Bauer, „Räumliche Darstellung der Keimzentrumsvasculatur und ihr Bezug zu den Keimzentrumsplasmazellen“, Doctoral thesis, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, 2023. doi: 10.6094/UNIFR/233284.
- [172] A. Mintjes, „Räumliche Verteilungsmuster von regulatorischen und komplementfaktorpositiven Zellen in Patienten mit nicht-neoplastischer Lymphadenopathie bei CVID“, 2024.
- [173] S. Unger *u. a.*, „Ill-Defined Germinal Centers and Severely Reduced Plasma Cells are Histological Hallmarks of Lymphadenopathy in Patients with Common Variable Immunodeficiency“, *J. Clin. Immunol.*, Bd. 34, Nr. 6, S. 615–626, Aug. 2014, doi: 10.1007/s10875-014-0052-1.
- [174] N. Romberg *u. a.*, „Patients with common variable immunodeficiency with autoimmune cytopenias exhibit hyperplastic yet inefficient germinal center responses“, *J. Allergy Clin. Immunol.*, Bd. 143, Nr. 1, S. 258–265, Jan. 2019, doi: 10.1016/j.jaci.2018.06.012.

- [175] A. M. Haberman und M. J. Shlomchik, „Reassessing the function of immune-complex retention by follicular dendritic cells“, *Nat. Rev. Immunol.*, Bd. 3, Nr. 9, S. 757–764, Sep. 2003, doi: 10.1038/nri1178.
- [176] M. Seidl u. a., „Morphology of Immunomodulation in Breast Cancer Tumor Draining Lymph Nodes Depends on Stage and Intrinsic Subtype“, *Sci. Rep.*, Bd. 8, Nr. 1, S. 5321, März 2018, doi: 10.1038/s41598-018-23629-3.
- [177] A. T. Ruffin u. a., „B cell signatures and tertiary lymphoid structures contribute to outcome in head and neck squamous cell carcinoma“, *Nat. Commun.*, Bd. 12, Nr. 1, S. 3349, Juni 2021, doi: 10.1038/s41467-021-23355-x.
- [178] M. Lauss, M. Donia, I. M. Svane, und G. Jönsson, „B Cells and Tertiary Lymphoid Structures: Friends or Foes in Cancer Immunotherapy?“, *Clin. Cancer Res.*, Bd. 28, Nr. 9, S. 1751–1758, Mai 2022, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-21-1130.
- [179] P. Lopez u. a., „T cell migration potentiates HIV infection by enhancing viral fusion and integration“, *Cell Rep.*, Bd. 38, Nr. 8, S. 110406, Feb. 2022, doi: 10.1016/j.celrep.2022.110406.
- [180] R. A. Gould u. a., „Multi-Scale Biomechanical Remodeling in Aging and Genetic Mutant Murine Mitral Valve Leaflets: Insights into Marfan Syndrome“, *PLOS ONE*, Bd. 7, Nr. 9, S. e44639, Sep. 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0044639.
- [181] J. Sarkkinen u. a., „Ectopic germinal centers in the thymus accurately predict prognosis of myasthenia gravis after thymectomy“, *Mod. Pathol.*, Bd. 35, Nr. 9, S. 1168–1174, Sep. 2022, doi: 10.1038/s41379-022-01070-2.
- [182] L. Barnes, „Pathological and Genetics Head and Neck Tumours“, *World Health Organaization Classif. Tumours*, 2005.
- [183] F. Rosas, E. Orozco-Hernández, A. Méndez, F. Barajas, und M. León-Bautista, *The heterogeneity of Human Papilloma Virus genotypes in the oropharyngeal cavity, anus, and urogenital sites*. 2022.
- [184] M.-T. FERNÁNDEZ-FIGUERAS u. a., „Predictors of Local Invasion in Infiltrative Basal Cell Carcinoma: Tumour Budding Outperforms the WHO Subtyping“, *Acta Derm. Venereol.*, Bd. 104, S. 40172, Juli 2024, doi: 10.2340/actadv.v104.40172.
- [185] D. Jones u. a., „Solid stress impairs lymphocyte infiltration into lymph-node metastases“, *Nat. Biomed. Eng.*, Bd. 5, Nr. 12, S. 1426–1436, Dez. 2021, doi: 10.1038/s41551-021-00766-1.
- [186] J. H. Lee u. a., „Human glioblastoma arises from subventricular zone cells with low-level driver mutations“, *Nature*, Bd. 560, Nr. 7717, S. 243–247, Aug. 2018, doi: 10.1038/s41586-018-0389-3.
- [187] N. Singh u. a., „Differentially expressed full-length, fusion and novel isoforms transcripts-based signature of well-differentiated keratinized oral squamous cell carcinoma“, *Oncotarget*, Bd. 11, Nr. 34, S. 3227–3243, Aug. 2020, doi: 10.18632/oncotarget.27693.
- [188] M. Alotaibi, V. Valova, H. Olze, und A. Coordes, „Survival of head and neck cancer using HPV and Smoking: Meta-analysis“, S. s-0040-1711546, Mai 2020, doi: 10.1055/s-0040-1711546.
- [189] O. Mete und B. M. Wenig, „Update from the 5th Edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck Tumors: Overview of the 2022 WHO Classification of Head and Neck Neuroendocrine Neoplasms“, *Head Neck Pathol.*, Bd. 16, Nr. 1, S. 123–142, März 2022, doi: 10.1007/s12105-022-01435-8.

7. Danksagung

Diese Arbeit wurde am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Düsseldorf angefertigt, als Teilprojekt des Kooperationsprojektes HORUS (BMBF-Förderkennzeichen: 13GW0571).

Ich danke Herrn Dr. med. Maximilian Seidl für die Übernahme des ersten Berichterstatters. Ich danke Frau Prof. Dr. Henrike Heise für die Übernahme der zweiten Berichterstatterin während meiner Promotion. Weiterhin danke ich Frau Prof. Dr. Esposito für die Erlaubnis der Nutzung des Instituts und der Räumlichkeiten.

Außerdem danke ich meiner technischen Assistenz Eva Schorn für ihre Arbeit und Unterstützung während der Zeit. Ein weiterer Dank geht an all meine Kolleg:innen während meiner Promotionszeit. Danke an Muhannad Al Kallaa, Kim Sommer, Maurice Sagorsky, Raka Aziz, Kira Vieth, Stefanie Wylezalek, Khadija Sayyad, Sandra Biskup und Olga Felda für Euer Dasein und Eure emotionale Unterstützung!

Ich danke meinem Ehemann Stefan Stehl, der mich in jeglicher Situation immer unterstütze. Auch möchte ich meinem Pferd Zarceno danken, der mir immer einen emotionalen Ausgleich verschafft hat. Außerdem möchte ich meinen Freund:innen Alexander Radermacher, Marah Schwingen, Lisa Juhran und allen weiteren Freund:innen danken, die mir zur Seite standen!

Meiner Band „Toluidine“ gilt außerdem Dank für den kreativen Ausgleich und die großartigen Bandproben. Diese Arbeit hat die Namensgebung der Band wesentlich geprägt!

Meiner Familie Stehl, meiner Schwiegerfamilie Lewandowski und all meinen Freunden, die mich während dieser Zeit begleiteten, danke ich für die stetige Unterstützung.

Außerdem möchte ich meinen Kolleg:innen aus dem Kooperationsprojekt HORUS danken. Namentlich erwähnen möchte ich an dieser Stelle Junan Chen, Dr. Matthias Wiecek und Julia Rackerseder von ImFusion GmbH und Dr. Andreas Weber vom Universitätsklinikum Freiburg. Vielen Dank für Eure Unterstützung! Ein Dank geht an alle Kolleg:innen von ImFusion GmbH, vom Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Freiburg, vom Fraunhofer Ernst-Mach-Institut und von Dorner IT GmbH.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst habe, dass ich sie zuvor an keiner anderen Hochschule und in keinem anderen Studiengang als Prüfungsleistung eingereicht habe und dass ich keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Alle Stellen der Arbeit, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen oder aus anderweitigen fremden Äußerungen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.



M. Sc. Verena Stehl

Düsseldorf, den 22.07.2025