

Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Alexander Berghaus

**Der Einsatz des Holmium:YAG-Lasers
in der Laserlithotripsie von Speichelsteinen -
eine *Ex-vivo*-Untersuchung**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnheilkunde
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Monika Lisa Müller, geb. Domes
aus Memmingen

2015

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatterin: PD Dr. med. Pamela Zengel

Mitberichterstatter: PD Dr. med. Georgios Psychogios

Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Florian Schrözlmaier

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 26.03.2015

Meinem Großvater gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG	1
1.1 Sialolithiasis	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Lokalisation	1
1.1.3 Ätiopathogenese	2
1.1.4 Klinik	3
1.1.5 Diagnostik	3
1.2 Therapiemöglichkeiten	4
1.2.1 Aktuelle Behandlungskonzepte	4
1.2.2 Laserlithotripsie	6
2 ZIELSETZUNG	10
3 MATERIAL UND METHODEN	11
3.1 Materialien und Geräte	11
3.1.1 Chemikalien	11
3.1.2 Gebrauchsgegenstände	11
3.1.3 Geräte	13
3.1.4 Optische Dokumentationsgeräte	13
3.1.5 Software	14
3.2 Verwendete Konkremente	14
3.2.1 Herkunft	14
3.2.2 Gewichtsbestimmung	14
3.2.3 Vermessung	15
3.2.4 Volumen- und Dichtebestimmung	15
3.3 Methoden zur Fluoreszenzbestimmung	15
3.3.1 Fluoreszenzphotografie	15
3.3.2 Fluoreszenzspektroskopie	16
3.4 Dual Energy CT	17
3.5 Laserexperimentelle Methoden	19
3.5.1 Lasersystem	19
3.5.2 Versuchsaufbau	21
3.5.3 Bestimmung der Ablationsschwelle	22
3.5.4 Fragmentierung	23
3.6 FT-Raman-Spektroskopie	24
3.7 FT-Infrarot-Spektroskopie	26
3.8 Histologische Aufarbeitung	27

3.9 Statistik	29
4 ERGEBNISSE	30
4.1 Fluoreszenz der Konkreme	30
4.2 Ergebnisse der Bildgebung mittels Dual Energy CT	31
4.3 Laserlithotripsie	33
4.3.1 Gruppeneinteilung	33
4.3.2 Ergebnisse der Fragmentierung	34
4.3.3 Auswirkung der Pulsenergie auf die Zertrümmerungsart	36
4.3.4 Abhängigkeit der Ablationsrate vom Behandler	37
4.4 Raman-Spektren der Konkreme	38
4.5 Infrarotspektren der Konkreme	41
4.6 Korrelationen zwischen physikalisch-chemischen, optischen und radiologischen Parametern	43
4.7 Faktoren mit praktischer Relevanz für die Fragmentierung	47
4.7.1 Zusammenhang zwischen Fragmentierungsrate und physikalisch-chemischen, optischen sowie radiologischen Eigenschaften der Konkreme	47
4.7.2 Zusammenhang zwischen Zertrümmerungsart und physikalisch-chemischen, optischen sowie radiologischen Eigenschaften der Konkreme	49
4.8 Laserpulseffekte auf das Speichelganggewebe	51
5 DISKUSSION	53
5.1 Spektroskopisch bestimmte Zusammensetzung der Konkreme	53
5.2 Anwendung fluoreszenzgestützter Verfahren zur Speichelsteinanalyse	55
5.3 Relevanz der Dual Energy CT für Diagnostik und Therapie	58
5.4 Eignung des Holmium:YAG-Lasers für die Speichelstein-Lithotripsie	60
6 ZUSAMMENFASSUNG	67
7 ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	69
7.1 Abbildungen	69
7.2 Tabellen	71
8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	73
9 LITERATURVERZEICHNIS	75
10 DANKSAGUNG	81

1 Einleitung

1.1 Sialolithiasis

1.1.1 Epidemiologie

Die Sialolithiasis stellt die häufigste Erkrankung der großen Kopfspeicheldrüsen im Erwachsenenalter dar. Es ist ein Häufigkeitsgipfel zwischen dem 30. und dem 70. Lebensjahr zu beobachten, wobei Männer geringfügig häufiger betroffen sind als Frauen (Teymoortash *et al.*, 2003, Martellucci *et al.*, 2013). Je nach untersuchter geografischer Region wird die Inzidenz einer symptomatischen Sialolithiasis mit 27 bis 60 Fällen pro einer Million Einwohner pro Jahr angegeben (Escudier *et al.*, 1999, Sherman *et al.*, 2000, Iro *et al.*, 2009).

1.1.2 Lokalisation

Speichelsteine können sowohl im extraglandulären als auch im intraglandulären Gangsystem von großen und sehr selten auch kleinen Speicheldrüsen entstehen (Jayasree *et al.*, 2008). Die häufigste Lokalisation ist mit über 80 Prozent das Gangsystem der Glandula submandibularis, wobei die Konkremete in mehr als der Hälfte der Fälle am Hilus, in etwa einem Drittel der Fälle im distalen Wharton-Gang und selten im intraparenchymalen Gangsystem lokalisiert sind (siehe Abbildung 1).

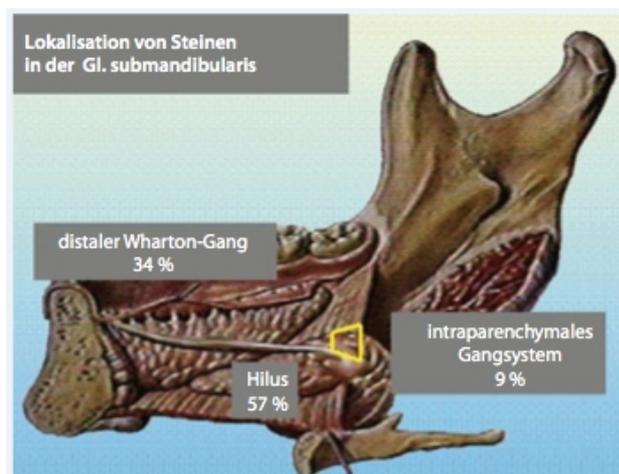


Abbildung 1: Häufigkeit und Lokalisation von Steinen in der Glandula submandibularis (Iro *et al.*, 2010).

Die Glandula parotis ist seltener betroffen. Hier befinden sich die Konkremente in etwa zwei Drittel der Fälle im distalen Stenon-Gang, in etwa einem Viertel der Fälle im intraparenchymalen Gangsystem und seltener am Hilus (siehe Abbildung 2) (Zenk *et al.*, 1999, Iro *et al.*, 2010). In der Glandula sublingualis und den kleinen Speicheldrüsen treten Steinbildungen nur sehr selten auf (Rice, 1993, Lustmann *et al.*, 1990).

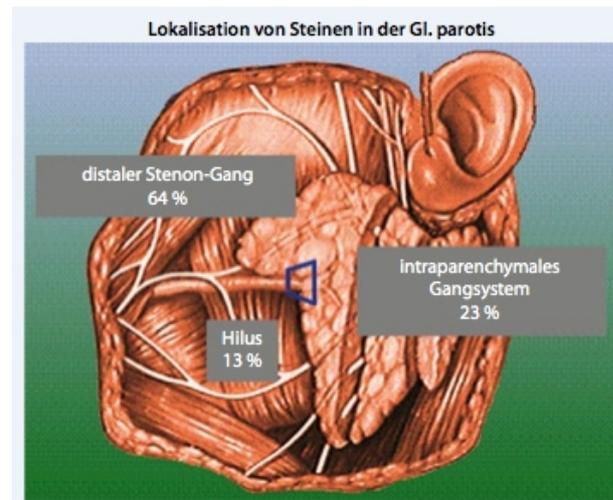


Abbildung 2: Häufigkeit und Lokalisation von Steinen in der Glandula parotis (Iro *et al.*, 2010).

1.1.3 Ätiopathogenese

Der genaue Mechanismus der Lithogenese ist noch ungeklärt. Es existieren zahlreiche Theorien, wobei im Allgemeinen von lokalen Ursachen ausgegangen wird, da es keine Hinweise für eine systemische Ätiologie gibt (Zenk *et al.*, 1999). Dabei scheint es sich bei der Sialolithiasis um eine multifaktorielle Erkrankung zu handeln, bei der sowohl die morphoanatomischen Eigenschaften des Speichelgangs als auch die Speichelzusammensetzung eine Rolle spielen (Grases *et al.*, 2003). Die hohe Anfälligkeit der Glandula submandibularis für die Entstehung von Speichelsteinen wird vor allem auf die im Vergleich relativ hohe Viskosität und Alkalität ihres Sekrets zurückgeführt. Auch die erhöhte Konzentration an Calcium und Phosphat im Submandibularis-Gangsystem scheint ätiopathogenetisch bedeutsam zu sein. Des Weiteren scheint die spezielle Anatomie des Wharton-Ganges eine Rolle zu spielen, welcher relativ lang ist, sowie in seinem ascendierenden Verlauf zwei Biegungen macht. Da der Speichel hierbei entgegen der Richtung der Schwerkraft eine lange Wegstrecke überwinden muss, wird ein

Sekretstau begünstigt (Rice, 1993, Teymoortash *et al.*, 2003). Es existieren zudem Hinweise, dass abgelaufene Sialadenitiden einer der wichtigsten Faktoren für die Steinentstehung sind. Auf Grund einer Entzündungsreaktion kann es zu stenotischen Veränderungen am Speichelgang kommen, was wiederum eine Stase mit daraus folgender Erhöhung der Viskosität des Speichels zur Folge hat (Harrison *et al.*, 1997, Kasaboglu *et al.*, 2004). Zudem kommt es infolge bakterieller Infektionen zu einem Anstieg des pH-Werts, was wiederum eine geringere Löslichkeit des Calciumphosphats im Speichel zur Folge hat (Lustmann *et Shteyrer*, 1981). Die Elektrolytzusammensetzung des Speichels scheint bei Sialolithiasis-Patienten zugunsten höherer Calciumkonzentrationen verändert zu sein. Auch scheint es Zusammenhänge mit einem Defizit an Stoffen wie Magnesium, Citrat oder Phytat zu geben, welche die Kristallisation von Calciumphosphat im Speichel hemmen (Grases *et al.*, 2003, Su *et al.*, 2009). Durch das Zusammenwirken der oben genannten Faktoren kommt es zur Anreicherung und Ablagerung von lithogenen Speichelbestandteilen wie beispielsweise Glykoproteinen mit nachfolgender Mineralisierung dieser organischen Matrix durch Calciumphosphat. Anschließend entsteht durch schalenartige Apposition von organischen und anorganischen Bestandteilen zunächst ein Mikrolith, welcher in der Folge auf eine Größe von bis zu mehreren Zentimetern heranwachsen kann (Williams, 1999).

1.1.4 Klinik

Sialolithen können klinisch lange stumm bleiben. Verlegt ein Stein einen Ausführungsgang, so führt diese Gangobstruktion durch den Rückstau von Sekret zu einer schmerzhaften Schwellung der betroffenen Speicheldrüse, vor allem wenn der Speichelfluss beispielsweise durch die Nahrungsaufnahme stimuliert wird. Fällt der Sekretionsreiz weg, kommt es zu einem Rückgang der Symptomatik. Eine persistierende Obstruktion des Speichelgangs wirkt begünstigend auf eine ascendierende Infektion der Speicheldrüse. Bei schweren Verlaufsformen mit Ausbreitung der Infektion kann es zur Entstehung von Abszessen, Phlegmonen und Fisteln kommen (Siedek *et al.*, 2008). Zu den weiteren Komplikationen einer Sialolithiasis zählen strukturelle Veränderungen des Gangsystems wie Ektasien und Strikturen (Rice, 1993).

1.1.5 Diagnostik

Größere Steine des Wharton-Gangs oder der Glandula submandibularis können durch bimanuelle Palpation meist ertastet werden, während dies bei Steinen im Stenon-Gang oder in der Glandula parotis häufig nicht möglich ist. Hierbei und zur exakten Lokalisierung des Steins ist die Anwendung bildgebender Verfahren indiziert. Die

bevorzugte Untersuchungsmethode ist heutzutage die Sonographie, mit der Konkreme ab einer Größe von 1 bis 2 Millimetern in mindestens 90 Prozent der Fälle erkannt werden können (Iro *et al.*, 2010, Zengel *et al.*, 2013). Eine noch genauere Diagnose intraduktaler Steine erlaubt die Sialendoskopie. Durch die direkte Visualisierung können Größe und Beziehung des Sialoliths zum umgebenden Gewebe beurteilt werden. Die Speicheldrüsenendoskopie kann somit zur Diagnosesicherung beitragen, kann aber zugleich auch therapeutisch eingesetzt werden (Koch *et al.*, 2008).

1.2 Therapiemöglichkeiten

1.2.1 Aktuelle Behandlungskonzepte

Die Therapie der Sialolithiasis richtet sich vor allem nach Lokalisation, Größe und Anzahl der Konkreme. Des Weiteren spielt es eine Rolle, ob ein Stein mobil oder im Gangsystem impaktiert ist, zudem, ob er palpabel ist oder nicht (Iro *et al.*, 2010). Eine medikamentöse Auflösung der Steine ist nicht möglich, daher muss eine mechanische Entfernung erfolgen. Zunächst können konservative Maßnahmen wie die Gabe von Sialogoga, Drüsenmassagen und die Dilatation des Gangostiums angewandt werden (Iro *et al.*, 2003). Ist hierdurch keine suffiziente Therapie möglich, orientiert man sich an einem Stufenkonzept, wie es 2010 von der Arbeitsgruppe um Iro entwickelt wurde (siehe Abbildungen 3 und 4). Unter Berücksichtigung dieser Algorithmen kann heutzutage in bis zu 98 Prozent aller Fälle über endoskopische Steinentfernung, minimal-invasive Gangschlitzung oder extrakorporale Stoßwellenlithotripsie drüsenerhaltend therapiert werden (Iro *et al.*, 2010). Sowohl bei der Glandula submandibularis als auch bei der Glandula parotis ist eine primär endoskopisch kontrollierte Extraktion im Rahmen einer interventionellen Sialendoskopie bei mobilen Steinen bis zu einer Größe von maximal 5 Millimetern möglich. Die Steinentfernung erfolgt dabei mittels Körbchen, Faszange, Greifer oder Ballon, welche in den Arbeitskanal des Endoskops eingeführt werden. Bei mobilen Konkrementen mit einer Größe zwischen fünf und sieben Millimetern ist es möglich, diese zunächst mithilfe eines Lasers oder Mikroinstruments (z. B. Mikrobohrer, Faszange) zu fragmentieren. Im Anschluss können die Fragmente unter sialendoskopischer Kontrolle entfernt werden. Bei größeren oder impaktierten, jedoch gut palpablen Steinen der Glandula submandibularis ist die transorale Gangschlitzung die Methode der Wahl. Ist die Glandula parotis betroffen, stellt in einem solchen Fall die extrakorporale Stoßwellenlithotripsie (ESWL) das bevorzugte Verfahren dar. Hierbei wird der Stein durch von außen eingeleitete piezoelektrisch erzeugte Stoßwellen fragmentiert.

Impaktierte, nicht palpable oder endoskopisch nicht darstellbare Steine stellen auch bei der Glandula submandibularis eine Indikation zur ESWL dar. War eine mehrmalige ESWL nicht erfolgreich, so kann die Submandibulektomie als Therapie erwogen werden. Dies ist auch der Fall bei multiplen intraparenchymalen Steinen oder sehr großen Konkrementen (>10 mm), welche transoral nicht entfernt werden können. Ist die mehrmalige ESWL bei der Therapie der Glandula parotis nicht erfolgreich, kommt bei dieser Drüse alternativ eine kombiniert endoskopisch-transkutane Operation in Frage, sofern der Stein endoskopisch darstellbar ist. Die Indikation zu einer partiellen Parotidektomie stellt sich nach mehrfacher ESWL, wenn die Steine nicht endoskopisch zugänglich sind und auch eine transkutane Entfernung wegen fehlender Tastbarkeit nicht möglich ist.

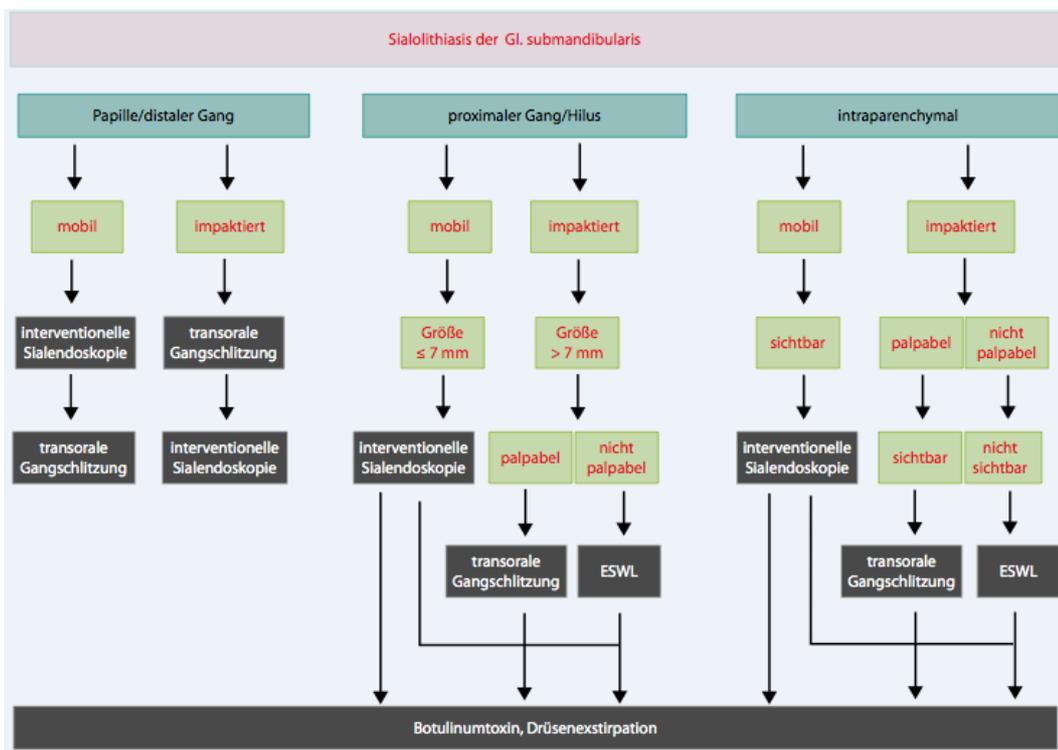


Abbildung 3: Therapiealgorithmus für die Glandula submandibularis (Iro et al., 2010).

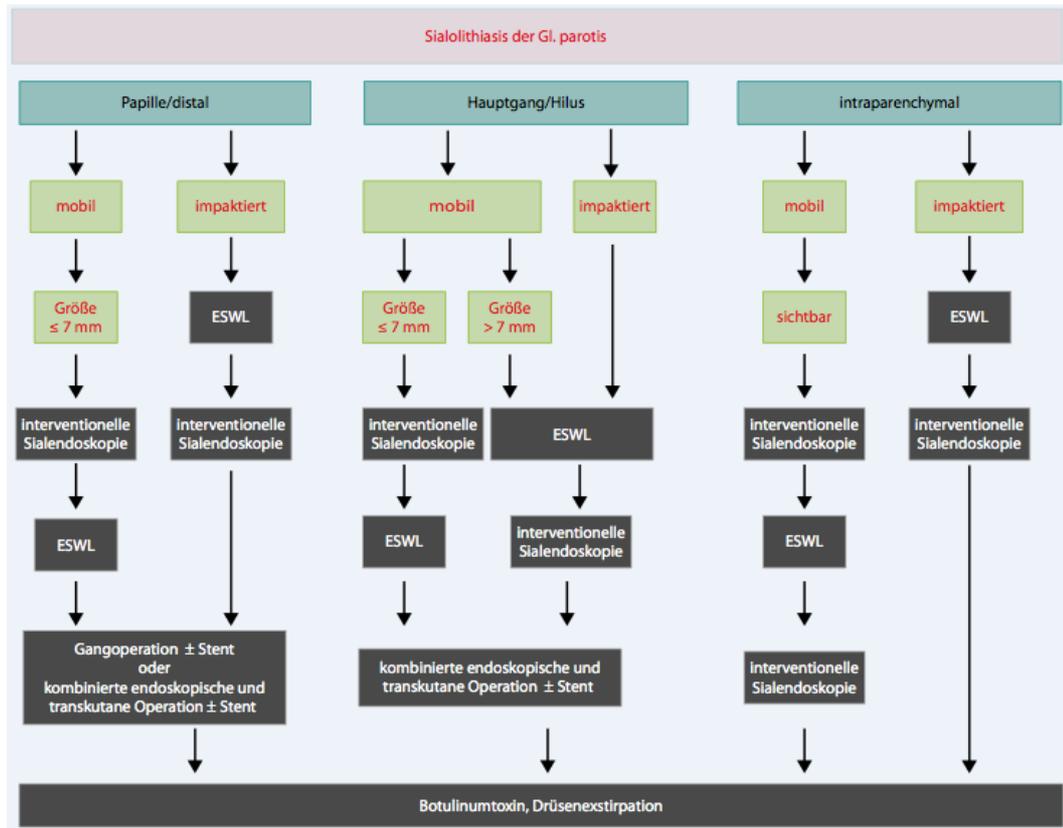


Abbildung 4: Therapiealgorithmus für die Glandula parotis (Iro et al., 2010).

1.2.2 Laserlithotripsie

In der urologischen Steintherapie ist die intrakorporale laserinduzierte Lithotripsie seit den 1980er Jahren ein etabliertes klinisches Routineverfahren (Hofstetter, 1987). Für die endoskopisch kontrollierte Fragmentierung von Speichelsteinen wurde die Lasertechnik erstmals in den 1990er Jahren angewandt. Die Tatsache, dass bis heute nur wenig publizierte Daten bezüglich der intrakorporalen Laserlithotripsie bei Speichelsteinen vorliegen, scheint vor allem mit dem kleinen Durchmesser des Speichelgangs zusammenzuhängen, woraus sich Schwierigkeiten bei der Einführung dickerer Endoskope mit Arbeitskanälen bzw. bei der Entwicklung ausreichend dünner Laserfasern ergeben können. Bis heute wurden sowohl experimentelle als auch klinische Versuche mit verschiedensten Lasertypen durchgeführt. Zur Anwendung kamen dabei der Excimerlaser (Gundlach *et al.*, 1990, Königsberger *et al.*, 1990), der CO₂-Laser (Arzoz *et al.*, 1996), der Pulsed Dye Laser (McGurk *et al.*, 1994, Ito *et al.*, 1996), der Erbium:YAG-Laser (Raif *et al.*, 2006), der Holmium:YAG-Laser (Marchal *et al.*, 2001, Siedek *et al.*, 2008, Martellucci *et al.*, 2013), der Thulium:YAG-Laser (Durbec *et al.*, 2012) und der

FREDDY-Laser (Siedek *et al.*, 2008). Die Erfolgsrate im Sinne einer Steinfreiheit oder kompletten Steinfragmentierung betrug zwischen 57 und 96 Prozent (siehe Tabelle 1). Bei großen Speichelsteinen, welche sialendoskopisch nicht zu entfernen waren, bestanden die bisherigen drüsenerhaltenden Maßnahmen in der Gangschlitzung oder der ESWL. Die Gangschlitzung ist eine überaus effektive Behandlungsmethode mit einer Erfolgsrate von über 90 Prozent, birgt jedoch im Falle der Glandula submandibularis vor allem bei Steinlokalisierung im Kniebereich des Wharton-Ganges das Risiko einer Läsion des Nervus lingualis. Bei der Glandula parotis ist wegen der Gefahr einer Stenosierung des Ausführungsganges eine transorale Gangschlitzung als primäre Therapiemaßnahme zu vermeiden. Die Erfolgsrate der ESWL beträgt bei Parotissteinen 59 bis 82 Prozent, bei Submandibularissteinen jedoch nur 14 bis 56 Prozent (Iro *et al.*, 1992, Hessling *et al.*, 1993, Kater *et al.*, 1994). Zu den wichtigsten Nebenwirkungen zählen Hämatombildungen, eine Beeinträchtigung des Hörvermögens oder die Schädigung von Zähnen und Zahnersatz. Auch ist diese Methode relativ zeitintensiv, da je nach Steingröße mehrere Sitzungen von jeweils etwa einer halben Stunde benötigt werden bis der Patient stein- und/oder beschwerdefrei ist (Iro *et al.*, 2010, Siedek *et al.*, 2008). Die intrakorporale Laserlithotripsie stellt eine im Vergleich dazu zeitsparende Alternative für die Patienten dar, wobei durch die präzise Applikation der Laserenergie über eine Lichtleiterfaser eine maximale Schonung des umgebenden Gewebes erreicht werden kann (Königsberger *et al.*, 1990). Dabei wird das Konkrement über den Ausführungsgang mit einem Sialendoskop lokalisiert, über den Arbeitskanal der Laserlichtleiter bis zum Speichelstein vorgeschoben und dieser im Anschluss unter direkter visueller Kontrolle mittels Laserenergie desintegriert. Die angestrebte Fragmentgröße sollte auf Grund des maximalen Durchmessers der Hauptausführungsgänge etwa 2 Millimeter betragen (Durbec *et al.*, 2012). Die Fragmente können anschließend mit einem Korbchen geborgen werden (siehe Abbildung 5).

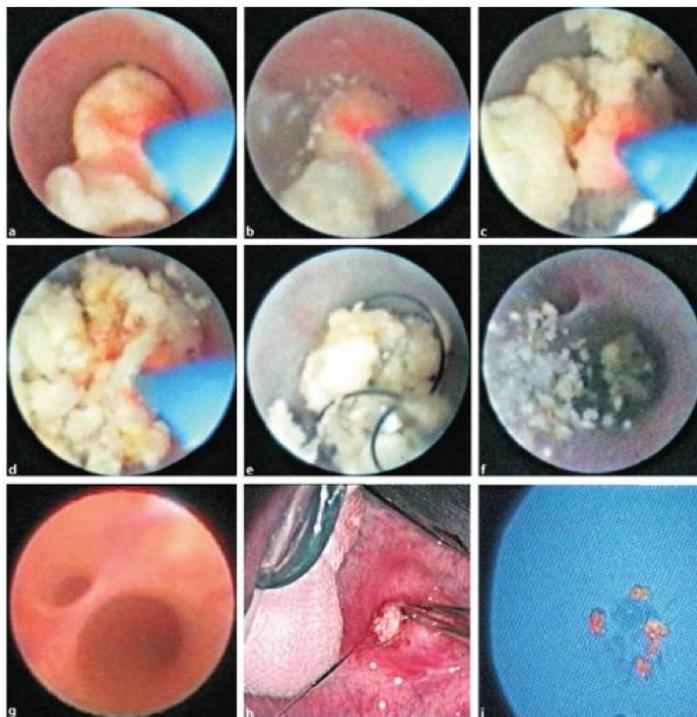


Abbildung 5: Sialendoskopisch kontrollierte Laserlithotripsie eines Speichelsteins mit Körbchenextraktion der Fragmente (Marchal et al., 2003).

Lasertyp	Fälle insgesamt	Erfolgsrate in % (= Steinfreiheit bzw. komplette Fragmentierung)	Autoren
Excimer , $\lambda = 308$ nm	13	92	Gundlach <i>et al.</i> , 1990, Königsberger <i>et al.</i> , 1990
Pulsed Dye , $\lambda = 504$ nm	28	68	McGurk <i>et al.</i> , 1994, Ito <i>et al.</i> , 1996
FREDDY , $\lambda = 532$ nm + 1064 nm	8	75	Siedek <i>et al.</i> , 2008
CO₂ , $\lambda = 10640$ nm	11	91	Arzoz <i>et al.</i> , 1996
Thulium:YAG , $\lambda = 2000$ nm	63	81	Durbec <i>et al.</i> , 2012
Holmium:YAG , $\lambda = 2100$ nm	28	96	Marchal <i>et al.</i> , 2001, Siedek <i>et al.</i> , 2008, Martellucci <i>et al.</i> , 2013
Erbium:YAG , $\lambda = 2940$ nm	21	57	Raif <i>et al.</i> , 2006

Tabelle 1: Publizierte klinische und experimentelle Daten für die Laserlithotripsie bei Sialolithiasis.

2 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der *In-vitro*-Lithotripsie von Speichelsteinen durch einen Holmium:YAG-Laser. In der Urologie wird dieser Lasertyp aufgrund seiner guten Fragmentierungsraten und seiner komplikationsarmen Anwendung seit Langem erfolgreich für die Harnstein-Lithotripsie verwendet. Für den sialendoskopischen Einsatz im Speichelgang ist der Holmium:YAG-Laser prädestiniert, da das von ihm emittierte Licht im Absorptionsspektrum von Wasser liegt und über flexible Fasern direkt vor den Speichelstein transportiert werden kann. In vorangegangenen experimentellen und klinischen Studien erwies sich der Einsatz des Holmium:YAG-Lasers bei der Behandlung der Sialolithiasis als vielversprechend.

Im Hinblick auf die unzureichende Datenlage und die kleinen Fallzahlen bezüglich der Anwendung von Lasertechnik bei der Sialolithiasis war es Ziel dieser Studie, mittels *Ex-vivo*-Untersuchungen zu bestimmen, bei welchen Lasereinstellungen eine effiziente Steinfragmentierung ohne wesentliche Schädigungen des Speichelgangs mithilfe des Holmium:YAG-Lasers möglich ist.

Zusätzlich stellte sich die Frage, ob sich die Sialolithen hinsichtlich ihrer Zusammensetzung bzw. optischen Eigenschaften unterscheiden und ob diese mit der Fragmentierung korrelieren. Dafür wurden die Steine Fluoreszenzmessungen, Raman-spektroskopischen Messungen und Infrarot-spektroskopischen Messungen unterzogen. Zudem wurden Dual Energy CT-Aufnahmen der Steine angefertigt. Mit diesem speziellen bildgebenden Verfahren können bei Urolithiasis-Patienten Harnsäuresteine von anderen Steinarten abgegrenzt werden, woraus sich therapeutische Konsequenzen ergeben, da sich die Behandlung der einzelnen Steintypen unterscheidet. Es stellte sich daher die Frage, ob auch bei Speichelsteinen anhand der Zusammensetzung eine Einteilung in verschiedene Gruppen möglich ist, welche sich sowohl hinsichtlich ihres Fragmentierungsverhaltens, als auch im Hinblick auf ihre Darstellung in der Bildgebung unterscheiden. Die Überlegung war dabei, inwieweit präoperativ abgeschätzt werden kann, ob eventuell eine Anpassung der Laserparameter an die jeweilige Steinzusammensetzung erfolgen muss bzw. ob eine Laserlithotripsie bei dem vorliegenden Speichelstein überhaupt sinnvoll ist.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien und Geräte

3.1.1 Chemikalien

Aqua dest	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Eosin G-Lösung 0,5 % (w/v)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Formalin 4 % (w/w)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumbromid (Kbr) „Uvasol“	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Mayers Hämalaunlösung	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
NaCl 0,9 % (w/v)	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Paraffin	Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland
Ringer Lösung	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

3.1.2 Gebrauchsgegenstände

Briefablage 245 x 350 x 67 mm	helit Büroprodukte, Kierspe, Deutschland
Edelstahldrahtgewebe, Maschenweite 1,5 mm	Bückmann GmbH & Co. KG, Mönchengladbach, Deutschland
EMS Smart Fiber 200 µm Einweg	E.M.S Electro Medical Systems, Nyon, Schweiz
Faltenfilter 595 ½	Schleicher&Schuell, Dassel, Deutschland
Faseroptik-Halterung	HORIBA Jobin Yvon GmbH, Unterhaching,

	Deutschland
Faseroptikbündel	HORIBA Jobin Yvon GmbH, Unterhaching, Deutschland
Hydraulische 10-to Presse	Perkin Elmer, Waltham, USA
Lichtmikroskop Axio Lab.A1	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Messzylinder 10 ml, Teilung 0,2 ml	Duran Group GmbH, Wertheim/Main, Deutschland
Messzylinder 25 ml, Teilung 0,5 ml	Duran Group GmbH, Wertheim/Main, Deutschland
Mikroreaktionsgefäß 1 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mikrotom HM355S	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Objektträger 76 x 26 mm	Engelbrecht Medizin-und Labortechnik GmbH, Edermünde, Deutschland
Optischer Glasfilter GG 435	Schott AG, Mainz, Deutschland
Paraffin-Streckbad TFB35	Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland
Paraffineinbettkassetten	Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland
Paraffineinbettssystem TES99	Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland
Präzisionswaage BP 310 S, Ablesbarkeit 0,001 g	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Schieblehre 125 mm (4 ¾ inch)	Karl Hammacher GmbH, Solingen, Deutschland
Schott Duran Becherglas 250 ml	Schott AG, Mainz, Deutschland

Swiss Boy Hebebühne 116	Rudolf Grauer AG, Degersheim, Schweiz
Tasterzirkel Einteilung 0,1 mm	Orbis Dental Handelsgesellschaft mbH, Münster, Deutschland
Vibration Mill 220 V	Perkin Elmer, Waltham, USA
Weithalsbehälter 50 ml PVC	Hünersdorff GmbH, Ludwigsburg, Deutschland

3.1.3 Geräte

flexibles Video-Endoskop	Karl Storz GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
FluoroMax-2	HORIBA Jobin Yvon GmbH, Unterhaching, Deutschland
FT-Raman-Modul FRA 106	Bruker Corporation, Billerica, USA
FT-Raman-Spektrometer IFS 66	Bruker Corporation, Billerica, USA
Holmium:YAG Laser Medilas H20	Dornier MedTech Europe GmbH, Wessling, Deutschland
Nicolet 380 FT-IR-Spektrometer	Thermo Electron Corporation, Waltham, USA
Somatom Definition Flash	Siemens Medical Solutions, Forchheim, Deutschland

3.1.4 Optische Dokumentationsgeräte

PowerShot A720 IS	Canon Deutschland GmbH, Krefeld, Deutschland
Telecam SL pal 20212020	Karl Storz GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland

3.1.5 Software

DataMax Software	HORIBA Jobin Yvon GmbH, Unterhaching, Deutschland
KnowItAll Raman Edition 9.5.	Bio-Rad Laboratories, Informatics Division, Philadelphia, USA
Omnic Software Suite	Thermo Electron Corporation, Waltham, USA
Open Office 4.0	Apache Software Foundation, Wilmington, USA
OPUS 5.5.	Bruker Corporation, Billerica, USA
SPSS Statistics 21	IBM Deutschland GmbH, Ehningen, Deutschland
Syngo MMWP VA 21	Siemens Medical Solutions, Forchheim, Deutschland

3.2 Verwendete Konkremente

3.2.1 Herkunft

Es wurden 47 humane Speichelsteine für die *In-vitro*-Versuche verwendet. Alle Konkremente entstammten der Glandula submandibularis und wurden durch Gangschlitzung gewonnen. Zum Zeitpunkt der Operation betrug das mittlere Alter der Patienten $50,9 \pm 16,5$ Jahre, wobei der älteste Patient 83,5 Jahre und der jüngste Patient 21,9 Jahre alt war. Der Anteil an männlichen Patienten war mit 68 Prozent höher als der Anteil an weiblichen Patienten mit 32 Prozent. Vor Durchführung der Experimente wurden die Konkremente in isotoner Kochsalzlösung aufbewahrt.

3.2.2 Gewichtsbestimmung

Die Konkremente wurden mit einer Sartorius Präzisionswaage im trockenen Zustand gewogen. Das Gewicht m_0 variierte von 0,017 g bis 2,553 g. Das mittlere Gewicht betrug $0,311 \pm 0,502$ g.

3.2.3 Vermessung

Der Durchmesser der Konkreme wurde mithilfe einer Schieblehre und eines Tasterzirkels bestimmt. Es wurde der größte, zweitgrößte und drittgrößte Durchmesser für jedes Konkrement ermittelt.

Die Durchmesser variierten von 2,2 bis 21,5 mm. Der mittlere Durchmesser betrug $6,6 \pm 2,8$ mm.

3.2.4 Volumen- und Dichtebestimmung

Das Volumen wurde mithilfe der Wasserverdrängung bestimmt. Hierzu wurden die Konkreme in mit destilliertem Wasser gefüllte Messzylinder gegeben. Der Wasseranstieg auf der Messskala war gleichbedeutend mit dem Volumen der Konkreme. Die Ablesegenauigkeit betrug 0,1 ml. Das ermittelte Volumen variierte von $0,1 \text{ cm}^3$ bis $1,6 \text{ cm}^3$. Das mittlere Volumen konnte mit $0,3 \pm 0,3 \text{ cm}^3$ angegeben werden. Durch Bildung des Quotienten aus Gewicht und Volumen konnte die Dichte ρ der Konkreme berechnet werden. Daraus ergab sich eine mittlere Dichte von $1,0 \pm 0,4 \text{ g/cm}^3$. Die Spannbreite reichte von $0,2 \text{ g/cm}^3$ bis $1,8 \text{ g/cm}^3$.

3.3 Methoden zur Fluoreszenzbestimmung

3.3.1 Fluoreszenzphotografie

In vielen Flüssigkeiten und Festkörpern kann nach Absorption ultravioletter Strahlung Fluoreszenz beobachtet werden. Das resultierende Fluoreszenzspektrum, welches durch Fluoreszenzintensität und Wellenlänge definiert wird, ist abhängig von der chemischen Zusammensetzung des fluoreszierenden Stoffes (Lakowicz, 2006). Die Komponenten einer Probe entscheiden also darüber, wie stark und in welcher Farbe diese fluoresziert. Die Fluoreszenzphotografie diente der qualitativen Bestimmung der Fluoreszenzintensität. Zu diesem Zweck wurden die Konkreme in einer Dunkelkammer auf schwarzem Karton platziert und mit Blau-Licht (Anregungswellenlänge $\lambda = 405 \text{ nm}$) bestrahlt. Um die Fluoreszenz sichtbar zu machen, wurden die Konkreme bei Blau-Licht-Anregung fotografiert. Zur Unterdrückung des Anregungslichtes wurde ein Langpass-Filter auf die Kamera montiert. Dieser ist nur für Wellenlängen $\lambda > 435 \text{ nm}$ durchlässig, wodurch das Anregungslicht gesperrt wird. Da das Emissions-Spektrum im Allgemeinen gegenüber

dem Absorptionsspektrum nach längeren Wellenlängen hin verschoben ist (Wedler *et* Freund, 2011), wird mithilfe des Filters nur der Anteil des Spektrums dargestellt, der bei Anregungsbeleuchtung fluoresziert.

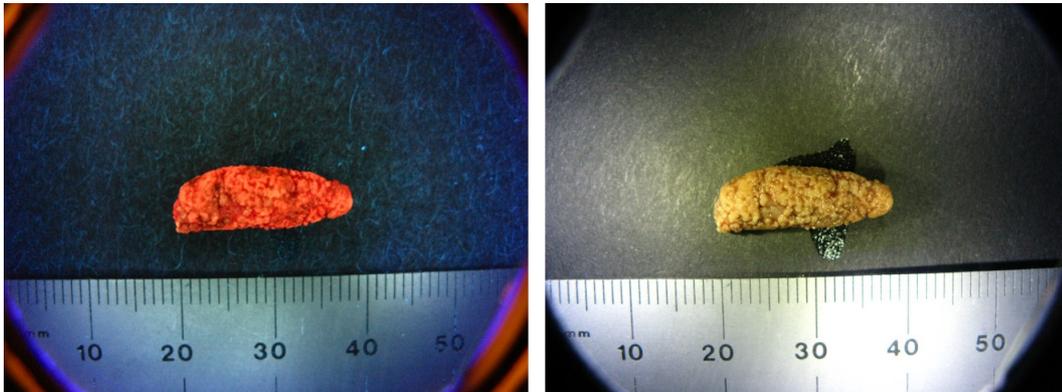


Abbildung 6: Speichelstein, links mit optischem Filter fotografiert, rechts ohne.

3.3.2 Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenz-Spektroskopie ist eine Methode zur qualitativen und quantitativen Analyse von fluoreszierenden Substanzen. Mit dem im Versuch verwendeten Spektralfluorometer können gleichzeitig Anregungs- und Emissionswellenlängen gemessen werden. Aus logistischen Gründen wurden die Messungen an einer Stichprobe von 27 Konkrementen durchgeführt. Dabei wurden die Anregungs-Emissions-Matrices (EEM) dieser Konkremeente bei 11 Anregungswellenlängen im Bereich von 400 bis 450 nm in 5-nm-Schritten registriert. Aufgrund der Größe der Konkremeente war es nicht möglich, diese in die Probenkammer innerhalb des Fluorometers einzubringen. Deshalb wurde mithilfe eines Faseroptikbündels eine externe Fluoreszenzmessung durchgeführt. Zur Ausschaltung optischer Störquellen wurden die Aufzeichnungen der Spektren bei absoluter Dunkelheit durchgeführt. Die Konkremeente wurden hierfür auf der Halterung für die Faseroptik fixiert. Über das Faseroptikbündel wurde das Anregungslicht aus dem Fluorometer auf die Oberfläche der Konkremeente geleitet. Hierbei handelt es sich um annähernd monochromatisches Licht. Dieses entsteht durch Fokussierung von Xenonlicht auf den Spalt eines Anregungsmonochromators. Die Intensität des Anregungslichts wird durch einen Referenzdetektor registriert. Die von den Proben emittierte Strahlung wurde durch dasselbe Faserbündel wieder in das Spektrometer zurückgeführt. Nach Fokussierung auf einen Emissionsmonochromator wird das emittierte Licht dort durch einen Emissionsdetektor erfasst.

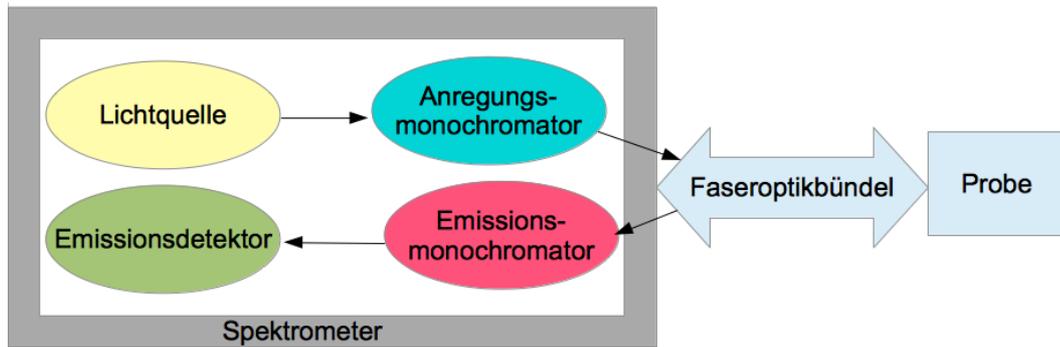


Abbildung 7: Schematischer Aufbau eines Spektralfluorometers. Über ein externes Faseroptikbündel werden gleichzeitig Anregung und Emission detektiert.

Auf diese Weise wurde für jedes Konkrement ein Matrix-Scan durchgeführt. Die Emissionsspektren der Konkremente wurden innerhalb eines Wellenlängenbereichs von $\lambda = 480$ bis 740 nm registriert. Dieser Bereich war von den Geräteeinstellungen vorgegeben, da der im Fluorometer eingebaute Filter erst für Emissionswellenlängen ab 480 nm durchlässig ist. Die Steuerung des Spektrometers erfolgte über eine serielle Schnittstelle von einem PC aus. Durch die zugehörige Software des Fluorometers wurden die gemessenen Spektren als dreidimensionale Oberflächen-Datei abgespeichert. Mithilfe von Excel wurde aus den gewonnenen Daten für jedes Konkrement eine 3D-Grafik seiner EEM erstellt. Die Fluoreszenzintensität wird dabei als Funktion von Anregungs- und Emissionswellenlängen dargestellt.

3.4 Dual Energy CT

Die Dual Energy Computed Tomography (DECT) stellt eine neue Methode zur Analyse und Differenzierung von Körpergeweben und Materialien dar. Beim Dual Energy Verfahren werden zwei zueinander orthogonal angeordnete Röntgenröhren mit zwei zugehörigen Detektoren verwendet (siehe Abbildung 8). Die Röntgenröhren werden mit unterschiedlichen Röhrenspannungen betrieben, wodurch zwei verschiedene Röntgenspektren generiert werden. Für jedes der Spektren wird ein CT-Datensatz erstellt, wobei die spektrale Information mittels Absorptionsmessungen durch die beiden Detektoren gewonnen wird. Die Differenzierung im DECT-Modus beruht auf spektralen Eigenschaften der untersuchten Materialien, das heißt auf der unterschiedlichen Schwächung der Röntgenstrahlung bei verschiedenen Photonenenergien (Johnson, 2012). Der lineare Schwächungskoeffizient der Röntgenstrahlung ist in hohem Maße von der chemischen Zusammensetzung und damit von der sog. effektiven Ordnungszahl eines Stoffes abhängig. Die Ordnungszahl entspricht der Anzahl der Protonen eines chemischen

Elements, wobei die effektive Ordnungszahl aus dem prozentualen Anteil der einzelnen enthaltenen Elemente berechnet wird. Enthält ein Stoff vor allem leichte chemische Elemente kleiner Ordnungszahl wie Wasserstoff oder Kohlenstoff, absorbiert er Röntgenstrahlung bei jeder Photoenergie in geringerem Maße als ein Stoff, welcher aus schweren Elementen höherer Ordnungszahl besteht wie Calcium oder Phosphor (Primak *et al.*, 2011). Hierdurch kann auf die chemische Zusammensetzung eines Stoffes rückgeschlossen werden, wenn dessen Röntgenabsorptionsverhalten bekannt ist. Dies ist klinisch beispielsweise relevant bei der Differenzierung von Harnsteinen, wo die Dual Energy CT eine Methode mit hoher Genauigkeit und Sensitivität darstellt (Primak *et al.*, 2011).

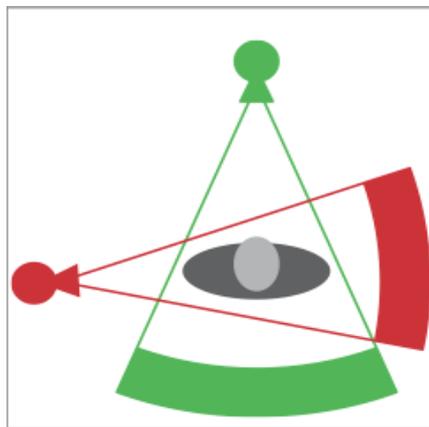


Abbildung 8: Schematische Darstellung eines Dual Energy CT mit zwei zueinander im 90°-Winkel angeordneten Röntgenröhren und Detektoren. Es werden zwei verschiedene Röhrensparnungen verwendet (Johnson, 2012).

Für die Untersuchung wurden die Konkreme in Plastikbehältnissen in vorher festgelegter Anordnung auf einem Kunststofftablett befestigt. Anschließend wurde das Tablett im Dual Energy Computertomograph positioniert. Die Proben wurden im DECT-Modus bei Röhrensparnungen von 80 kV und 140 kV gescannt. Diese Einstellung gewährleistet die geringste Überlappung der Spektren. Der verwendete Dual Energy CT-Scanner ist mit einem zusätzlichen Zinn-Filter für das 140 kV-Spektrum ausgestattet, was zu einer noch besseren Separation der 80- und 140 kV-Spektren führt (Johnson, 2012). Das Röhrenstrom-Zeit-Produkt betrug bei 80 kV 35 mAs und bei 140 kV 26 mAs. Die akquirierten Daten wurden mittels Dual Energy Software ausgelesen. Die Auswertung der Scans erfolgte an der *workstation* durch Bestimmung der Dichte der Konkreme in *Hounsfield units* (HU) und durch farb-kodierte Darstellung der Aufnahmen. Die Messung der HU wurde bei 80 kV und 140 kV vorgenommen. Zu diesem Zweck wurde eine kreisförmige *region of interest* (ROI) manuell im Bereich der höchsten Dichte

eingezeichnet. Der Rechner mittelt die Dichtewerte aller Voxel innerhalb der ROI und gibt Mittelwert und Standardabweichung an. Aus den resultierenden mittleren Hounsfield-Einheiten (x_{80} = HU bei 80 kV; x_{140} = HU bei 140 kV) wurde der Dual Energy (DE)-Index mit folgender Formel berechnet:

$$\text{DE-Index} = \frac{x_{80} - x_{140}}{x_{80} + x_{140} + 2000}$$

Wasser hat beispielsweise einen DE-Index von 0, während Knochen einen DE-Index von 0,1148 hat. Für calciumhaltige Harnsteine wurde ein DE-Index von 0,1345 berechnet (Graser *et al.*, 2008). Für die farbkodierte Darstellung wurde ein automatischer Nachbearbeitungsalgorithmus für Harnsteine verwendet. Dieser schlüsselt jedes Voxel anhand des DE-Index nach 3 Komponenten auf (Wasser, Calcium, Harnsäure). Voxel, die sich hinsichtlich ihrer spektralen Eigenschaften wie Calcium verhalten, werden mit blauer Farbe kodiert, während Voxel, die ein ähnliches spektrales Verhalten wie Harnsäure zeigen, rot kodiert werden. Dies bedeutet, dass calcifizierte Strukturen mit hoher effektiver Ordnungszahl blau dargestellt werden und Strukturen mit niedriger effektiver Ordnungszahl rot erscheinen. Mithilfe dieses Nachbearbeitungsalgorithmus kann anhand der Farbkodierung auf die chemische Zusammensetzung des Konkrements geschlossen werden.

3.5 Laserexperimentelle Methoden

3.5.1 Lasersystem

Die Lithotripsie wurde mit einem Holmium:YAG (Holmium-Yttrium-Aluminium-Granat)-Laser durchgeführt. Hierbei handelt es sich um einen gepulsten Festkörperlaser. Als Lasermedium dient ein Yttrium-Aluminium-Granat (YAG)-Kristall. Dieser Wirtskristall ist zur Erzeugung und Verstärkung der Laserstrahlung mit dreiwertigen Ionen der seltenen Erde Holmium sowie mit Chrom^{3+} und Thulium^{3+} dotiert. Das eingestrahelte Pumplicht wird von diesen Ionen absorbiert, woraufhin deren Elektronen in den angeregten Zustand übergehen, also auf ein höheres Energieniveau angehoben werden. Durch Zurückwechseln der Elektronen auf ein niedrigeres Energieniveau kommt es zur spontanen Emission von Photonen. Diese werden mittels Reflexion durch zwei Spiegel als optische Resonatoren durch das aktive Medium geleitet. Indem die emittierten Photonen auf diese Weise wieder auf angeregte Elektronen treffen, kommt es zur

stimulierten Emission weiterer Photonen. Somit kommt es zur Erhöhung der Photonenanzahl mit resultierender Lichtverstärkung. Da einer der beiden Spiegel teilweise durchlässig ist, tritt ein paralleler Laserstrahl aus (siehe Abbildung 9). Der für die Versuche verwendete Holmium:YAG-Laser emittiert Licht einer Wellenlänge von 2100 nm, welche sehr gut von Wasser absorbiert wird. Licht dieser Wellenlänge kann zudem durch Faseroptiken weitergeleitet werden, wodurch auch eine endoskopische Nutzung des Laserlichtes möglich ist (Wollin *et al.*, 1998). Haupteinsatzgebiet des Holmium:YAG-Lasers in der Medizin ist die Urologie, wo er seit vielen Jahren erfolgreich für die Lithotripsie von Harnsteinen eingesetzt wird (Sofer *et al.*, 2002).

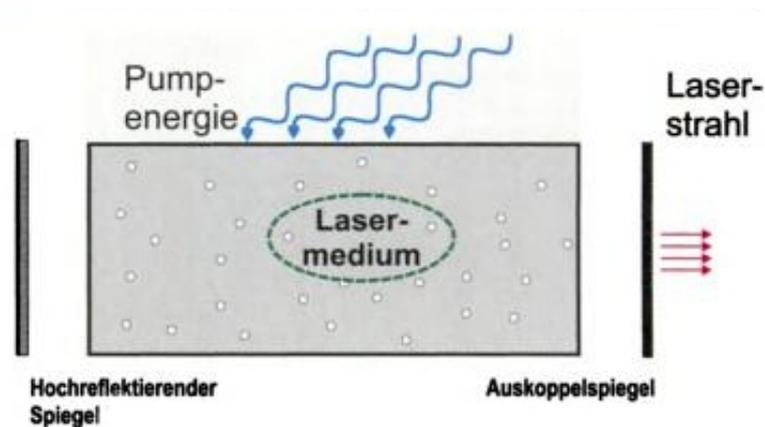


Abbildung 9: Schematischer Aufbau eines Lasers (Grevers *et al.*, 2001).

Die Fähigkeit des Holmium:YAG-Lasers zur Fragmentierung von Konkrementen beruht vor allem auf photothermischen Effekten (Chan *et al.*, 1999). Aufgrund der hohen Absorption geht bei Applikation der Laserenergie ein Teil der Laserpulsenergie durch rasche Aufheizung des umgebenden Wassers verloren, wodurch Wasserdampf und somit eine Dampfblase entsteht. Diese bildet einen Kanal zwischen Faserspitze und Konkrementoberfläche, sodass die verbleibende Laserpulsenergie auf die Oberfläche des Konkrements auftreffen kann (Moses-Effekt). Die nun ungehindert auftreffende Laserenergie wird von den Wasseranteilen im Konkrement absorbiert, dehnt sich aus was zum Aufbrechen der kristallinen Struktur führt und sprengt somit Konkrementanteile vom Stein. Zudem können aus dem Konkrement freie Elektronen freigesetzt werden, welche wiederum ein sich ausdehnendes Plasma erzeugen. Dieses induziert die Bildung einer sog. Kavitationsblase, die beim Kollaps Stoßwellen generiert, welche die Fragmentierung des Konkrements bewirken (Finley *et al.*, 2005). Die optische Eindringtiefe der Laserstrahlung des Holmium:YAG-Lasers in Wasser und Gewebe beträgt aufgrund der

hohen Absorption ca. 0,5 mm, wodurch sich der Effekt der Laserpulse auf die unmittelbare Umgebung der Faserspitze beschränkt. Daraus folgt, dass für einen optimalen Ablationseffekt die Faserspitze so nah wie möglich an der Konkrementoberfläche positioniert werden muss. Damit ist der Holmium:YAG-Laser für die Anwendung in räumlich begrenzten und mit Flüssigkeit gefüllten Organen wie Harnleiter bzw. Speichelgang prädestiniert (Dushinski *et Lingeman*, 1997). Der verwendete Holmium:YAG-Laser kann mit Pulsenergien von 400 bis 2500 mJ bei einer Repetitionsrate von 3 bis 12 Hz betrieben werden, wobei die maximale Laserleistung bei einer Pulsenergie von 2500 mJ/Puls und einer Repetitionsrate von 8 Hz 20 W beträgt. Die Pulsdauer beträgt 350 μ s. Zusätzlich zur gepulsten Laserstrahlung für die Lithotripsie verfügt der verwendete Laser über einen kontinuierlich strahlenden Pilotlaser, womit der Auftreffpunkt der Laserpulse markiert werden kann. Als Lichtwellenleiter kam eine flexible Einweg-Quarzglasfaser mit 200 μ m Kerndurchmesser zum Einsatz.

3.5.2 Versuchsaufbau

Beim Versuchsaufbau wurden die Gegebenheiten einer *In-vivo*-Speichelstein-Laserlithotripsie simuliert. Die Konkreme wurden in einem nach oben offenen Körbchen aus Edelstahldrahtgewebe platziert. Um zu verhindern, dass sich die Konkreme während der Beschießung bewegen, wurden diese leicht in die Maschen des flexiblen Drahtgewebes gedrückt (siehe Abbildung 10). Die Maschenweite betrug 1,5 mm. Die Größe der durch dieses Gitter fallenden Fragmente ist somit kleiner als dieser Durchmesser, so dass *in vivo* eine endoskopische Bergung aus dem Speichelgang problemlos möglich sein sollte (Siedek *et al.*, 2008). Das Drahtkörbchen wurde mithilfe von gebogenen Klammern in einem mit destilliertem Wasser gefüllten Bechergesäß fixiert (siehe Abbildung 11).



Abbildung 10: Konkrement im Drahtkörbchen.

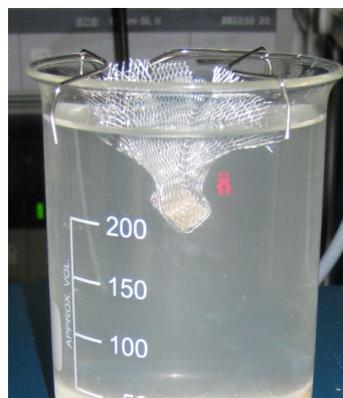


Abbildung 11: Unterwasser-Versuchsaufbau.

Die Laserenergie wurde *via* Lichtwellenleiter durch den Arbeitskanal eines flexiblen Endoskops mit eingebauter 0°-Hopkins II-Optik auf das Konkrement geleitet. Mittels einer Drei-Chip-Endoskopkamera wurde das Konkrement über einen Kamera-Controller auf einen Video-Monitor übertragen (siehe Abbildung 12). Dadurch war eine zusätzliche Sichtkontrolle während der Zertrümmerung gegeben.

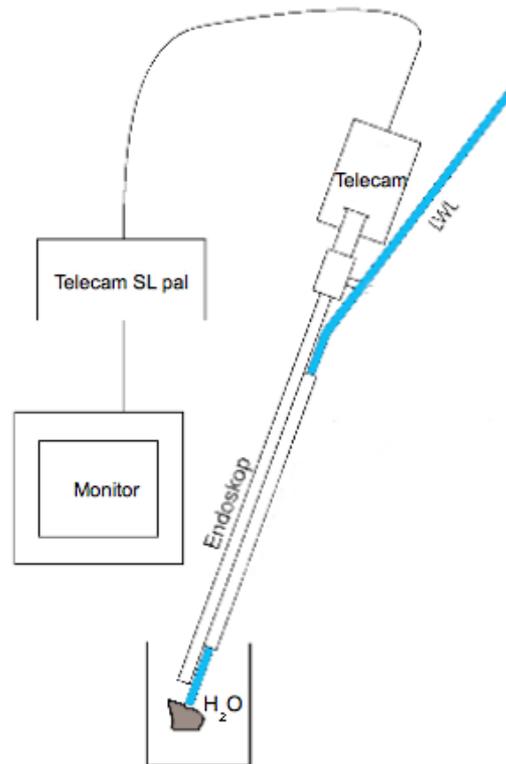


Abbildung 12: Experimenteller Aufbau (LWL = Lichtwellenleiter)

3.5.3 Bestimmung der Ablationsschwelle

Die Bestimmung der Ablationsschwelle diente dazu herauszufinden, ab welcher Pulsenergie des verwendeten Lasersystems es zu einem Abtrag am Konkrement kommt, da Pulsenergien unterhalb der Ablationsschwelle für die Laserlithotripsie ungeeignet sind. Als Ablation wurde ein sichtbarer Krater in der Größe des Faserquerschnitts am Ort der Energieapplikation definiert. Zur Bestimmung wurden drei Konkremente zufällig ausgewählt. Jedes Konkrement wurde einzeln im Versuchsaufbau platziert. Die aus dem Endoskop vorstehende Faserspitze wurde unmittelbar vor der Konkrementoberfläche positioniert (*near contact*). Einzelne Laserpulse wurden auf eine festgelegte Stelle des

Konkrements appliziert. Beginnend mit der geringsten Pulsenergie des Lasers (400 mJ, 3 Hz) wurde die Ablationsschwelle nach Abgabe von drei aufeinanderfolgenden Pulsen für jede Energiestufe bestimmt. Es zeigte sich, dass es bei allen drei Konkrementen bereits bei dieser niedrigsten Leistungsstufe zu einer sichtbaren Ablation kam.

3.5.4 Fragmentierung

Im Hinblick auf die angewandte Pulsenergie in mJ wurden die Konkreme auf drei Gruppen randomisiert. 16 Konkreme wurden mit einer Pulsenergie von 500 mJ beschossen, 16 Konkreme mit einer Pulsenergie von 1000 mJ und bei 15 Konkrementen wurde eine Pulsenergie von 1500 mJ angewandt. Die eingestellte Pulsfrequenz betrug für alle Steine 3 Hz. Die Zertrümmerung der Konkreme wurde von zwei Behandlern mit unterschiedlicher Lithotripsieerfahrung vorgenommen. Behandler 1 zertrümmerte 27 Konkreme, Behandler 2 zertrümmerte 20 Konkreme. Dazu wurde die Lichtleiterfaser in direktem Kontakt zur Konkrementoberfläche platziert. Der Auftreffpunkt der Laserpulse wurde mithilfe des Pilotlasers markiert (siehe Abbildung 13). Mit dem Fußpedal wurde der Laser aktiviert. Es wurden so lange Laserpulse auf das Konkrement abgegeben, bis alle Fragmente das Drahtgewebe vollständig passiert hatten (siehe Abbildung 14).

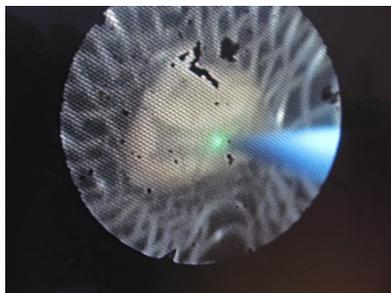


Abbildung 13: Übertragung der Lithotripsie über die Endoskopkamera auf den Monitor: Markierung des Auftreffpunktes des Lasers auf der Steinoberfläche mittels Pilotlaser.

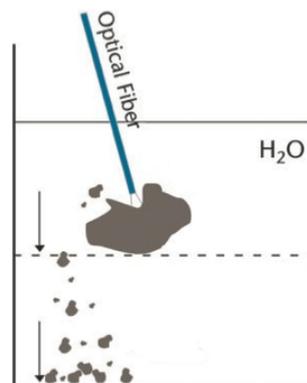


Abbildung 14: Schematische Darstellung der In-Vitro Laserlithotripsie eines Speichelsteins. Die Laserenergie wird über eine Lichtleiterfaser auf den Stein weitergeleitet. Die entstehenden Fragmente passieren den Maschendraht (Siedek et al., 2008).

Benötigte Laserlaufzeit L_{ges} in min, applizierte Energie E_{ges} in J und Pulsanzahl P_{ges} konnten am Display des Lasers abgelesen werden und wurden für jedes Konkrement

dokumentiert. Die Laserlaufzeit wird dabei aus pro Zertrümmerung benötigter Pulsanzahl und Pulsfrequenz errechnet, während die applizierte Energie das Produkt aus Pulsenergie und Pulsfrequenz darstellt. Die Zertrümmerungsart wurde anhand der persönlichen Beobachtung der Behandler notiert. Dabei wurde zwischen komplizierter und unkomplizierter Zertrümmerung unterschieden. Als kompliziert galt eine Fragmentierung bei schlechter Sicht durch starke Staubentwicklung oder bei starker Repulsion der Konkremente. Durch Bildung des Quotienten aus der Anfangsmasse m_0 eines Konkrements und applizierter Gesamtenergie E_{ges} bis zur vollständigen Zertrümmerung wurde die Ablationsrate pro Energie bestimmt. Ebenso wurde die Ablationsrate pro Laserlaufzeit und die Ablationsrate pro Puls bestimmt.

$$Ablation/Energie = \frac{m_0}{E_{ges}} \left[\frac{mg}{J} \right] \quad Ablation/Zeit = \frac{m_0}{L_{ges}} \left[\frac{mg}{min} \right]$$

$$Ablation/Puls = \frac{m_0}{n_{Puls}} \left[\frac{mg}{Puls} \right]$$

Das durch die Lithotripsie entstandene Sediment aus Fragmenten $< 1,5$ mm und pulverisierter Substanz am Boden des Bechergefäßes wurde mithilfe von Faltenfiltern aufgefangen und an der Luft getrocknet. Es diente im Anschluss als Probenmaterial für die Raman-spektrometrischen Messungen.

3.6 FT-Raman-Spektroskopie

Mit der Raman-Spektroskopie konnten in der Vergangenheit bereits erfolgreich die einzelnen Komponenten von Biomineralisaten wie Harnsteinen, aber auch Speichelsteinen identifiziert werden (Kontoyannis *et al.*, 1997, Selvaraju *et al.*, 2012, Chiu *et al.*, 2012, Jayasree *et al.*, 2008). Da es oft schwierig ist alle Komponenten eines Steins mit einer einzigen Analysemethode zu identifizieren, kann die Raman-Spektroskopie beispielsweise ergänzend zur IR-Spektroskopie bei Interpretations- und Zuordnungsproblemen verwendet werden (Hesse *et al.*, 2002, Kontoyannis *et al.*, 1997). Das Raman-Spektrum ist ein Emissionsspektrum, welches entsteht, wenn eine Substanz mit monochromatischem Licht bestrahlt wird. Dabei wird ein kleiner Anteil des eingestrahlten Lichts inelastisch gestreut (Raman-Streuung). Diese Streustrahlung weist Frequenzunterschiede zum eingestrahlten Licht auf, welche charakteristisch für die untersuchte Verbindung sind (Hesse *et al.*, 2002). Die Spektren wurden mithilfe eines Fourier-Transformation-Raman-Spektrometers mit Raman Modul aufgenommen. Aus

logistischen Gründen wurden die Messungen an einer Stichprobe von 27 Konkrementen durchgeführt. Da die Konkreme vor Aufnahme der Raman-Spektren mittels eines Holmium:YAG-Lasers lithotriptisch fragmentiert worden waren, lagen die Proben zum Teil in fragmentierter und zum Teil in pulverisierter Form vor. Das Probenmaterial wurde in Glasküvetten gefüllt, welche im Probenhalter des Raman-Spektrometers befestigt wurden. Anschließend wurden die Proben durch Verstellen der Halterung in den Bereich der stärksten Raman-Intensität justiert. Die Vermessung erfolgte in der 180°-Rückstreugeometrie, wobei von jeder Probe zwei Spektren von unterschiedlichen Stellen aufgenommen wurden. Die Lichtquelle des verwendeten FT-Raman-Spektrometers ist dabei ein diodengepumpter Nd:YAG-Laser, welcher Licht mit einer Wellenlänge von 1064 nm emittiert. Der Laserstrahl trifft, fokussiert mittels einer Linse, mit einem Durchmesser von etwa 100 µm auf die Probe. Dies entspricht der Messfläche. Ein Teil der entstehenden Streustrahlung wird über eine asphärische Linse gebündelt und in das Spektrometer geleitet. Nach Durchlaufen eines optischen Filters und eines Michelson-Interferometers trifft die Strahlung auf einen Detektor. Die hier gemessenen Intensitäten werden vom Computer ausgelesen. Das aufgenommene Interferogramm wird mittels einer Fast-Fourier-Transformation in ein Spektrum umgewandelt. Die Spektren wurden in einem Wellenzahlenbereich von 200 cm⁻¹ bis 3500 cm⁻¹ aufgezeichnet.

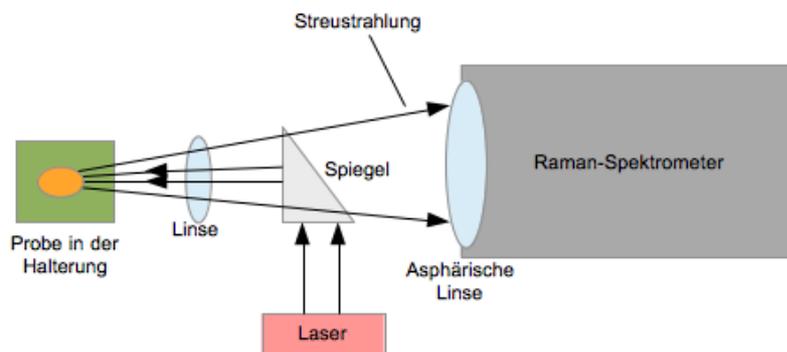


Abbildung 15: Schematischer Aufbau eines FT-Raman-Moduls. Der Laserstrahl wird über eine 180°-Rückstreugeometrie auf die Probe fokussiert. Die entstehende Streustrahlung wird in das Raman-Spektrometer geleitet.

Die erhaltenen Spektren wurden in die Datenbank *HaveItAll* Raman der Software *KnowItAll* Raman überführt und anhand der Übereinstimmung mit Datenbankspektren qualitativ ausgewertet. Zuerst wurde im Spektrenabschnitt 1150 cm⁻¹ bis 350 cm⁻¹ in der Datenbank nach korrelierenden Spektren gesucht, dann wurde der restliche Messbereich (3500 cm⁻¹ bis 1150 cm⁻¹ und 350 cm⁻¹ bis 200 cm⁻¹) hinsichtlich übereinstimmender Spektren überprüft. Dafür wurde der standardmäßig eingestellte „*correlation algorithm*“

verwendet. Die Ergebnisse wurden mit einem „*hit quality index*“ angezeigt, welcher ein Maß für die Übereinstimmung der Datenbankspektren mit den gemessenen Spektren ist. Mit der Software wurde zusätzlich eine „*mixture analysis*“ durchgeführt. Mit dieser Anwendung kann durch hypothetische Kombination der gefundenen Datenbankspektren das gemessene (Mehrkomponenten)-spektrum mathematisch nachgestellt werden. Das Ergebnis der *mixture analysis* zeigt Faktoren an, mit welchen ausgewählte Datenbankspektren multipliziert werden müssen, um addiert das gemessene Spektrum möglichst gut wiederzugeben. Die Faktoren sind so skaliert, dass sie in der Summe eins ergeben. Da die Datenbankspektren normiert sind, erhält man eine Aussage über die relativen Anteile der verschiedenen, mit der FT-Raman-Spektroskopie nachweisbaren Komponenten. Der Faktor stellt hierbei lediglich einen Vergleichswert zwischen Proben mit gleicher qualitativer Zusammensetzung dar und lässt keine Schlüsse über absolute Anteile der gefundenen Komponenten zu.

3.7 FT-Infrarot-Spektroskopie

Die Infrarot-Spektroskopie basiert auf der Absorption von Licht aus dem Spektrum einer IR-Lichtquelle, wobei die absorbierten Wellenlängen charakteristisch für die untersuchte Substanz sind. Mithilfe dieser Methode ist es möglich, Identität, Reinheit und Struktur unbekannter chemischer Verbindungen anhand spezifischer infrarotaktiver funktioneller Gruppen zu überprüfen (Hesse *et Sanders*, 1988). Die Fourier-Transformation-Technik als Weiterentwicklung der Infrarot-Spektroskopie ermöglicht eine simultane Erfassung aller Frequenzen des IR-Spektrums durch Umwandlung in ein Interferogramm. Dadurch können die Spektren in kürzester Zeit aufgezeichnet werden (Hesse *et al.*, 2002). Die Analyse mittels FTIR-Spektroskopie fand nach Zertrümmerung der Konkreme durch den Holmium:YAG-Laser an Kaliumbromid-Presslingen statt. Dazu wurden die Fragmente zuerst mithilfe eines Mörsers pulverisiert. Anschließend wurden ca. 0,02 g des pulverisierten Konkrementmaterials mit 0,5 g Kaliumbromid vermischt. Dieses Gemisch wurde in einer Schwingmühle für 25 Sekunden homogenisiert. Anschließend wurden die Presslinge in einer Hydraulik-Pressen unter Vakuum gesintert. Diese wurden dann in den Probenhalter des Spektrometers eingesetzt. Daraufhin wurden die Spektren mit dem FT-IR-Spektrometer in einem Wellenzahlenbereich von 4000- 400 cm^{-1} aufgenommen.

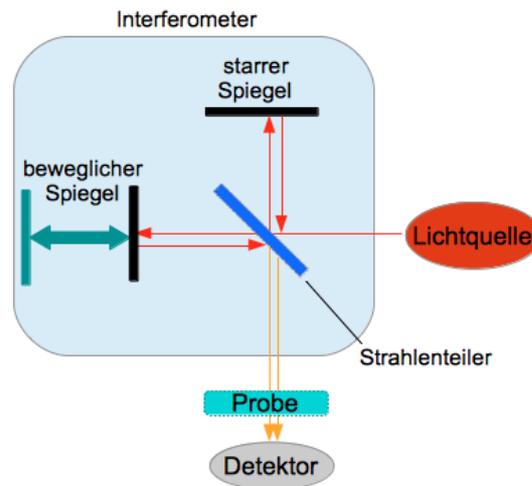


Abbildung 16: Schematischer Aufbau eines FT-IR-Spektrometers. Infrarot-Strahlung wird durch ein Michelson-Interferometer zur Interferenz gebracht und auf den Probenkörper gerichtet. Das entstehende Interferogramm wird vom Detektor registriert.

Hierbei trifft Infrarot-Strahlung aus einer Lichtquelle auf eine halbdurchlässige Platte, die als Strahlenteiler dient. Eine Hälfte des Lichts trifft auf einen starren Spiegel, die andere Hälfte wird auf einen beweglichen Spiegel abgelenkt. Durch Reflexion der Strahlung zurück zur Platte kommt es zur Interferenz der Strahlen. Die so modifizierte Strahlung wird auf die Probe fokussiert und der transmittierte Teil wird am Detektor gemessen. Vom Detektor wird das auftreffende Infrarot-Licht als Interferogramm registriert und an einen Computer weitergeleitet. Dieser wandelt die im Interferogramm aufsummierte Frequenzinformation durch Fourier-Transformation wieder in ein Spektrum um. Die Auswertung der Spektren erfolgte automatisch mit der dem Spektrometer zugehörigen Software. Bei Konkrementen aus mehreren Komponenten können damit Bestandteile mit einem Anteil von mindestens 5 bis 10 Prozent an der Gesamtzusammensetzung nachgewiesen werden. Anhand eines Spektrenatlasses (Hesse *et Sanders*, 1988) wurde die Auswertung verifiziert. Es wurden Referenzspektren zugeordnet und verglichen. Die genaue Konzentration der Stoffe kann jedoch mit dieser Methode nicht ermittelt werden, sodass Prozentangaben sich auf den relativen Anteil der ermittelten Substanz an den identifizierten Stoffgemischen beziehen.

3.8 Histologische Aufarbeitung

Für die histologische Untersuchung wurde ein etwa 1 cm langes Stück eines gesunden

Speichelgangs verwendet, welches aus einem Submandibulektomie-Präparat herauspräpariert wurde. Bis zur Durchführung des Versuchs wurde die Gewebeprobe in Ringerlösung aufbewahrt. Das Speichelgangsgewebe wurde mithilfe von vier Stecknadeln auf einem Styroporplättchen aufgespannt (siehe Abbildung 17). Im Anschluss wurden die Laserpulse aus einer Entfernung von etwa einem Millimeter zum Gewebe abgegeben. Für die auch bei der Lithotripsie verwendeten Pulsenergien 500, 1000 und 1500 mJ wurden jeweils zwei Pulse nebeneinander appliziert (siehe Abbildung 18).

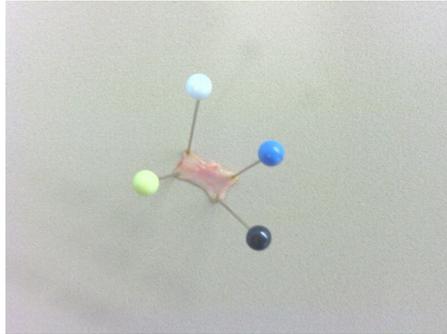


Abbildung 17: Aufgespannte Gewebeprobe vom Speichelgang der Glandula submandibularis.

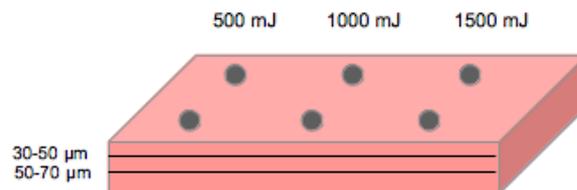


Abbildung 18: Schematische Darstellung des histologischen Präparates: erste Schnittebene in 30 bis 50 µm, zweite Schnittebene in 50 bis 70 µm Tiefe.

Es folgte die Fixierung des Gewebes in gepuffertem 4-prozentigem Formalin. Die fixierte Gewebeprobe wurde anschließend mithilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und danach in heißes Paraffin eingebettet. Nach Abkühlen des Paraffin-Blocks wurden horizontale Schnitte der Dicke 3 µm mithilfe eines Mikrotoms angefertigt. Der erste verwertbare plane Schnitt erfolgte nach Erreichen einer mittleren Gewebetiefe von 30 bis 50 µm Tiefe. Es wurden Serienschritte bis in eine Gewebetiefe von 50 bis 70 µm erstellt (siehe Abbildung 18). Nach dem Strecken der Schnitte im Wasserbad wurden diese auf Objektträger aufgezogen, getrocknet und mit der HE-Färbung angefärbt. Die fertigen histologischen Schnitte wurden anschließend unter dem Lichtmikroskop beurteilt und ausgewertet.

3.9 Statistik

Für die statistische Auswertung wurde das Programm SPSS Statistics 21 verwendet. Um Querschnitt und Streubreite eines Datenkollektivs darzustellen, wurden, wenn nicht anders angegeben, immer Mittelwert und Standardabweichung des Mittelwerts berechnet ($MW \pm SD$).

Für die Bestimmung der Stärke des statistischen Zusammenhangs zweier Merkmale wurde der Korrelationskoeffizient r nach Pearson ermittelt.

Zur Überprüfung von Unterschiedshypothesen bei zwei unabhängigen Stichproben diente der Mann-Whitney-U-Test und bei mehr als zwei unabhängigen Stichproben der Kruskal-Wallis-Test. Um die Mittelwerte von zwei unterschiedlichen Gruppen mit normalverteilten Variablen zu vergleichen und auf Signifikanz zu testen, wurde der t-Test für unabhängige Stichproben verwendet.

Um zu untersuchen, ob zwei unabhängige Merkmale assoziiert sind, wurde der χ^2 -Test nach Pearson anhand einer Kreuztabelle durchgeführt.

Das Signifikanzniveau lag stets bei 5 % ($p \leq 0,05$).

4 Ergebnisse

4.1 Fluoreszenz der Konkreme

Bei der Fluoreszenzphotografie unter Blaulicht mit einer Anregungswellenlänge von 405 nm zeigten 34 Konkreme grüne Fluoreszenz (siehe Abbildung 19), 13 Konkreme fluoreszierten rot (siehe Abbildung 20).

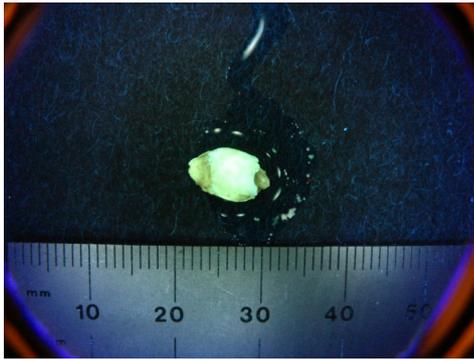


Abbildung 19: Beispiel für ein grün-gelb fluoreszierendes Konkrem.



Abbildung 20: Beispiel für ein rot fluoreszierendes Konkrem.

Anhand der dreidimensionalen Darstellung der Matrixscans der Fluoreszenzspektroskopie konnte bei auf den Fotos grün fluoreszierenden Konkremen der Grundtrend beobachtet werden, dass die Fluoreszenzintensität unabhängig von der Anregungswellenlänge mit zunehmender Emissionswellenlänge abnimmt. Maxima der Fluoreszenzintensität konnten bei diesen Konkremen bei Emissionswellenlängen von 480 bis 580 nm im gesamten Anregungswellenlängenbereich beobachtet werden (siehe Abbildung 21). Dies entspricht einer Fluoreszenz im blau-grünen, grünen und grün-gelben Bereich des sichtbaren Lichts. Die EEM-Grafiken der auf den Fotos rot fluoreszierenden Konkreme zeigten Maxima der Emission im Wellenlängenbereich zwischen 640 und 700 nm für alle verwendeten Anregungswellenlängen. Dies entspricht einer Fluoreszenz im orangen bis roten Bereich des sichtbaren Lichts. Zusätzlich waren bei einigen dieser Konkreme Maxima im Emissionswellenlängenbereich von 540 bis 580 nm bei Anregungswellenlängen von 440 bis 450 nm zu erkennen, was einer Fluoreszenz im grünen bis grün-gelben Bereich entspricht (siehe Abbildung 22). Die auf den Fotos dargestellte Fluoreszenz der Konkreme entspricht der Fluoreszenzintensität bei einer Anregungswellenlänge von 405 nm in den Matrixscans. Jedoch geben die Konkreme ihr Lichtspektrum als eine Kombination der unterschiedlichen Spektralfarben ab. Die Farbwahrnehmung wird zusätzlich beeinflusst durch Faktoren wie die verwendete Kamera und die Verarbeitung der Spektren durch den menschlichen Sehsinn.

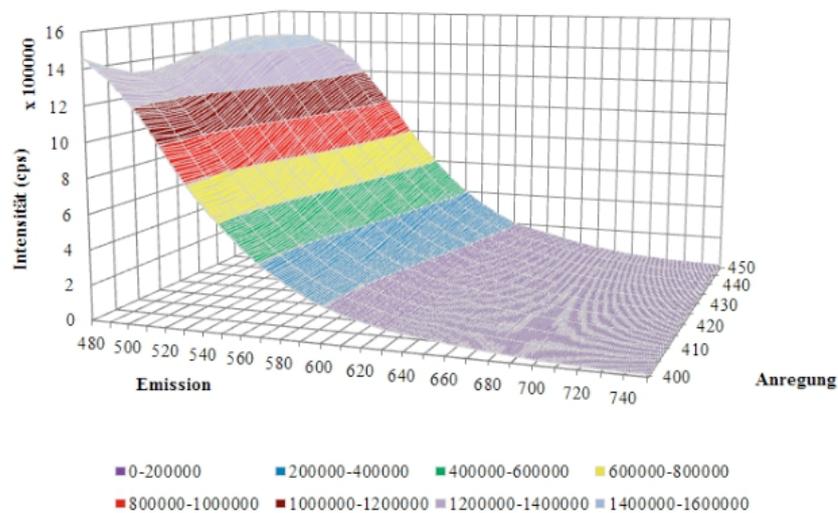


Abbildung 21: 3D-Darstellung der EEM eines grün fluoreszierenden Konkrements. Fluoreszenzintensität (counts per second $\times 10000$, farblich unterteilt) als Funktion von Anregungs- und Emissionswellenlängen (in nm): Maxima im Emissionswellenlängenbereich von 480 bis 580 nm.

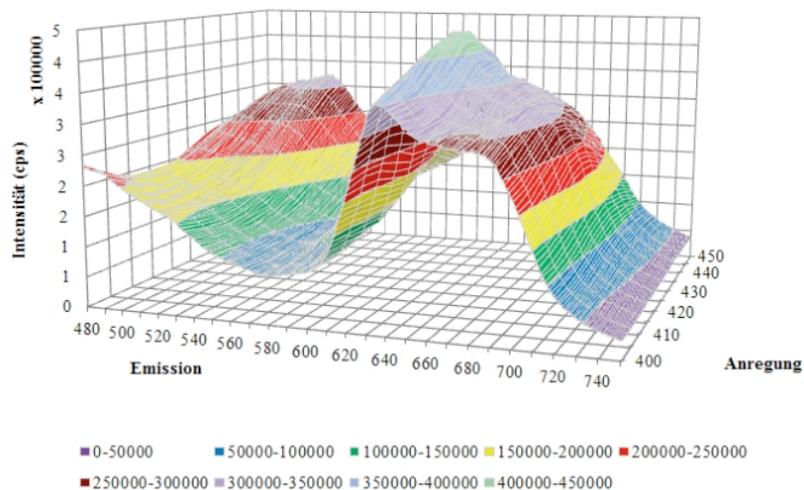


Abbildung 22: 3D-Darstellung der EEM eines rot fluoreszierenden Konkrements. Fluoreszenzintensität (counts per second $\times 10000$, farblich unterteilt) als Funktion von Anregungs- und Emissionswellenlängen (in nm): Maxima bei Emissionswellenlängen von 540-580 nm sowie bei 640-700 nm.

4.2 Ergebnisse der Bildgebung mittels Dual Energy CT

Bei 80 kV variierten die Dichtewerte von 46 Konkrementsen zwischen 924 HU und

2858,9 HU bei einem mittleren Dichtewert von $1642,5 \pm 477,5$ HU. Die Dichtewerte bei 140 kV bewegten sich für diese Konkreme zwischen 438 HU und 1542,3 HU bei einem mittleren Dichtewert von $850,8 \pm 267,4$ HU.

Die Berechnung des DE-Index dieser Konkreme ergab Werte zwischen 0,1180 und 0,2190 bei einem mittleren DE-Index von $0,1726 \pm 0,0217$.

Bei einem Konkrem konnte eine Abweichung der Werte beobachtet werden: bei 80 kV wurde hier ein Dichtewert von 74,5 HU gemessen, bei 140 kV ein Wert von 53,3 HU. Der berechnete DE-Index war mit 0,0100 weitaus niedriger als der mittlere DE-Index der anderen Konkreme.

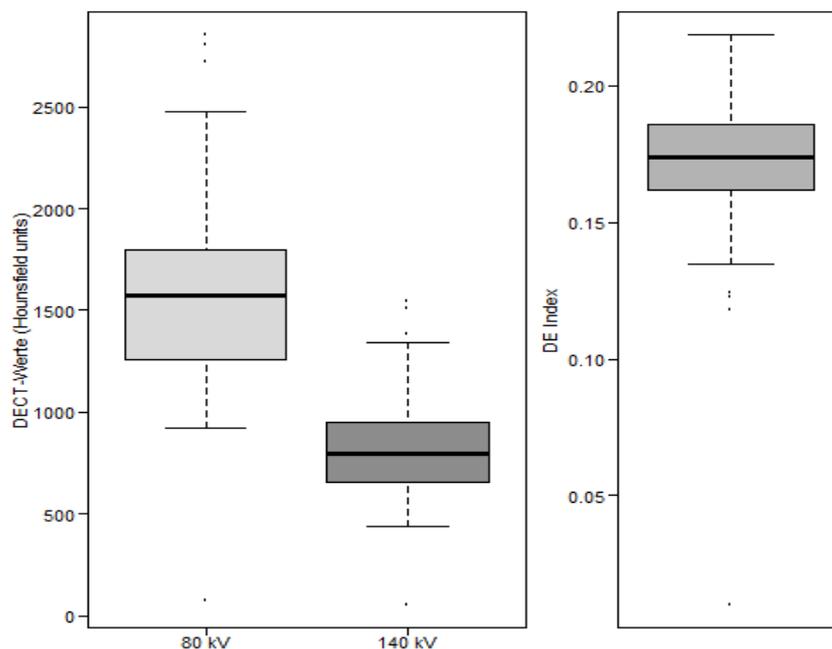


Abbildung 23: DECT-Dichtewerte (in Hounsfield units) bei den Röhrenspannungen 80 und 140 kV sowie DE-Index der Konkreme.

In der dreidimensionalen Rekonstruktion stellten sich die Konkreme homogen blau dar, was der Farbkodierung für calciumhaltige Konkreme bzw. für calcifizierte Strukturen mit hoher effektiver Ordnungszahl entspricht (siehe Abbildung 24). Mithilfe des verwendeten DE-Algorithmus für Harnsteine war hier keine farbliche Unterscheidung der Konkreme möglich.

Im koronaren Schnittbild waren bei dem Konkrem mit dem niedrigen DE-Index rote Pixel zu erkennen (siehe Abbildung 25). Dies entspricht der Farbkodierung des Algorithmus für Harnsäure bzw. für Strukturen mit niedriger effektiver Ordnungszahl.

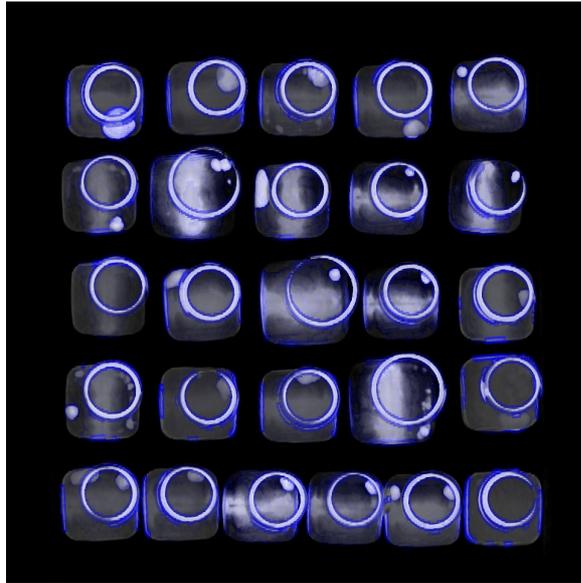


Abbildung 24: 3-D-rekonstruiertes, farbkodiertes Topogramm der ersten Aufnahmeserie. Die Speichelsteine, welche sich am Boden von Plastikgefäßen befinden, stellen sich homogen blau-weiß dar.

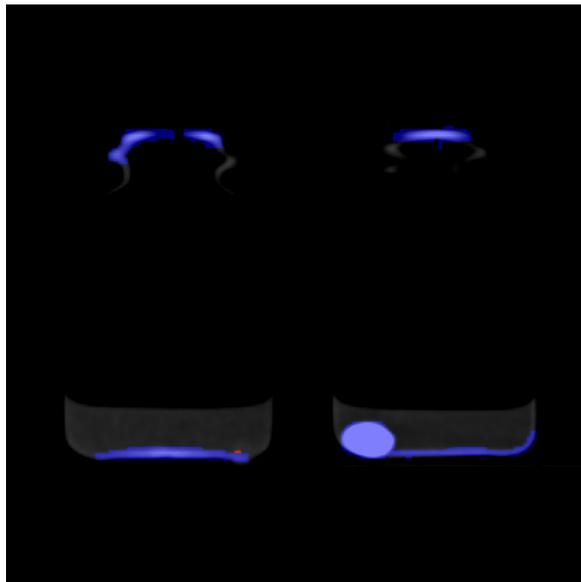


Abbildung 25: Farbkodiertes Dual Energy Schnittbild, basierend auf dem DE-Index der Steine: rechts ein Stein, welcher sich aufgrund seiner spektralen Eigenschaften blau darstellt, links ein Stein, dessen spektrale Eigenschaften zu einer roten Kodierung führen.

4.3 Laserlithotripsie

4.3.1 Gruppeneinteilung

Für die Lithotripsie wurden die Konkremeute bezüglich der angewendeten Pulsenergie

auf drei Gruppen randomisiert. Vor Beginn der Laserlithotripsie wurde überprüft, ob ein signifikanter Unterschied in der Dichte ρ der Konkreme zwischen den Gruppen besteht, da dieser Faktor mutmaßlich den Erfolg der Lithotripsie beeinflusst. Mithilfe des Kruskal-Wallis-Tests konnten jedoch keine signifikanten Gruppenunterschiede gefunden werden ($p = 0,100$).

	Pulsenergie 500 mJ/Puls	Pulsenergie 1000 mJ/Puls	Pulsenergie 1500 mJ/Puls
n Konkreme	16	16	15
ρ [g/cm³]	0,8 ± 0,4	1,1 ± 0,4	1,1 ± 0,4

Tabelle 2: Dichte ρ der Konkreme in den drei Behandlungsgruppen.

4.3.2 Ergebnisse der Fragmentierung

Mit dem Holmium:YAG-Laser konnte die Zertrümmerung aller 47 Konkreme in Fragmente $< 1,5$ mm erfolgreich durchgeführt werden. Die mittlere Anzahl der abgegebenen Pulse pro Zertrümmerung unterschied sich nicht signifikant zwischen den drei genutzten Pulsenergien ($p = 0,920$). Da die abgelesene Laserlaufzeit von Pulsanzahl und Pulsfrequenz abhängt, konnte auch hinsichtlich der durchschnittlich benötigten Laserlaufzeit kein signifikanter Unterschied zwischen den Pulsenergien beobachtet werden ($p = 0,924$). Allerdings wurden bei einer Pulsenergie von 1500 mJ/Puls tendenziell etwas mehr Pulse pro Zertrümmerung bei einer im Mittel auch etwas längeren Laserlaufzeit benötigt als bei 500 und 1000 mJ/Puls. Die durchschnittlich abgegebene Energie hängt von der genutzten Pulsenergie und der Pulsanzahl ab. Bei einer Pulsenergie von 500 mJ/Puls war sie daher etwa halb so groß wie bei einer Pulsenergie von 1000 mJ/Puls, während sie bei 1500 mJ/Puls etwas mehr als doppelt so viel betrug (siehe Tabelle 3).

	Pulsenergie 500 mJ/Puls	Pulsenergie 1000 mJ/Puls	Pulsenergie 1500 mJ/Puls
n Konkremente	16	16	15
n Pulse	1023 ± 1093	1066 ± 1438	1528 ± 2293
L_{ges} [min]	5,7 ± 6,1	5,9 ± 8,0	8,5 ± 12,7
E_{ges} [J]	511 ± 546	1066 ± 1438	2292 ± 3439

Tabelle 3: Ergebnisse der Laserlithotripsie in Abhängigkeit der verwendeten Pulsenergie. Angegeben sind jeweils benötigte mittlere Pulsanzahl, durchschnittliche Laserlaufzeit L_{ges} und abgegebene mittlere Laserenergie E_{ges} .

Für einen direkten Vergleich der Ablationsraten der drei verwendeten Pulsenergien wurde der Zusammenhang zwischen Pulsenergie und Ablationsrate pro Puls überprüft. Hierbei konnte festgestellt werden, dass die durchschnittliche Ablationsrate pro Puls bei einer Pulsenergie von 1000 mJ/Puls etwa doppelt so groß war wie bei einer Pulsenergie von 500 mJ/Puls ($p = 0,030$). Bei einer Pulsenergie von 1500 mJ/Puls war die Ablationsrate pro Puls fast zweieinhalb mal so groß wie bei 500 mJ/Puls ($p = 0,016$). Zwischen einer Pulsenergie von 1000 mJ/Puls und 1500 mJ/Puls bestand hingegen kein signifikanter Unterschied: Die mittlere Ablationsrate bei 1500 mJ/Puls war nur um etwa 15 Prozent größer als bei 1000 mJ/Puls ($p = 0,600$).

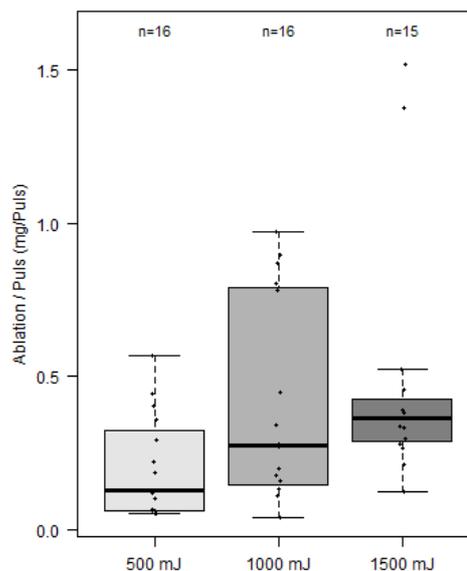


Abbildung 26: Ablationsrate pro Puls (in mg/Puls) in Abhängigkeit der Pulsenergie.

Die Ablationsrate pro Laserlaufzeit ist abhängig von der benötigten Pulsanzahl. Es konnte festgestellt werden, dass der durchschnittliche Abtrag pro Zeiteinheit bei einer Pulsenergie von 1000 mJ/Puls ungefähr doppelt so groß war wie bei 500 mJ ($p = 0,030$). Die Ablationsrate pro Laserlaufzeit bei 1500 mJ/Puls war annähernd zweieinhalbmal so hoch wie bei 500 mJ/Puls ($p = 0,016$). Vergleicht man die Ablationsraten pro Zeit von 1000 mJ/Puls und 1500 mJ/Puls, so war bei 1500 mJ/Puls der Abtrag pro Minute nur um 15 Prozent größer als bei 1000 mJ/Puls ($p = 0,600$).

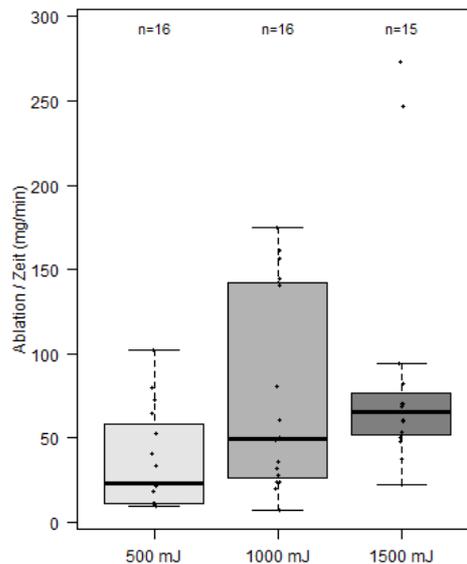


Abbildung 27: Ablationsrate pro Laserlaufzeit (in mg/min) in Abhängigkeit der Pulsenergie.

4.3.3 Auswirkung der Pulsenergie auf die Zertrümmerungsart

Bei insgesamt 20 Konkrementen wurde der Fragmentierungsprozess von den Behandlern als unkompliziert empfunden. Hier wurde die Sicht durch keine oder nur eine geringe Staubeentwicklung beeinträchtigt und es kam zu keinem starken Wegspringen der Fragmente bei der Energieapplikation. Die Zertrümmerung von 27 Konkrementen wurde von den Behandlern als kompliziert eingestuft. Dies war der Fall, wenn eine starke Repulsion von Fragmenten die Positionierung der Laserfaser erschwerte oder es durch eine starke Staubeentwicklung zu einer Sichtbehinderung kam. Es zeigte sich, dass sich die Zertrümmerungsart zwar nicht signifikant zwischen den drei verwendeten Pulsenergien unterscheidet ($p = 0,115$), jedoch tendenziell umso mehr Schwierigkeiten bei der Steinzertrümmerung auftraten, je höher die genutzte Pulsenergie war. Bei einer Pulsenergie von 500 mJ/Puls traten nach Ansicht der Behandler bei 37,5 Prozent der

Konkrete Schwierigkeiten bei der Fragmentierung auf. War eine Laserenergie von 1000 mJ/Puls eingestellt, wurden 62,5 Prozent der Konkreme als kompliziert zu zertrümmern eingestuft. Bei einer Pulsenergie von 1500 mJ/Puls wurde die Zerstörung von 73 Prozent der Konkreme als kompliziert empfunden.

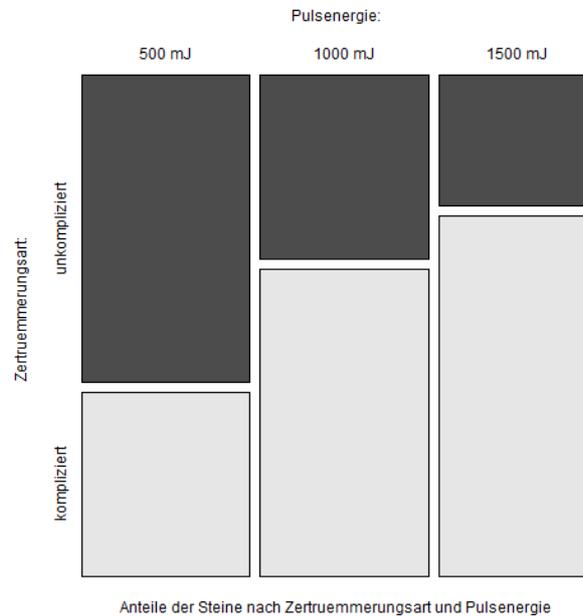


Abbildung 28: Zertruemmerungsart der Konkreme in Abhängigkeit der genutzten Pulsenergie.

4.3.4 Abhängigkeit der Ablationsrate vom Behandler

Um die Ablationsrate in Abhängigkeit vom jeweiligen Behandler vergleichen zu können, wurde zunächst überprüft, ob sich die Gruppen hinsichtlich der Dichte ρ der Konkreme unterscheiden. Mithilfe des Kruskal-Wallis-Tests konnten keine signifikanten Gruppenunterschiede gefunden werden ($p = 0,056$). Die Steine wurden bei beiden Behandlern gleichmäßig auf die unterschiedlichen Pulsenergien aufgeteilt.

	erfahrener Behandler	unerfahrener Behandler
n Konkremente	20	27
ρ [g/cm ³]	1,1 ± 0,4	0,9 ± 0,4

Tabelle 4: Dichte ρ der Konkreme in den zwei Behandlungsgruppen.

Bei dem Lithotripsie-erfahrenen Behandler war der durchschnittliche Abtrag pro Joule in etwa dreimal so groß wie bei dem unerfahrenen Behandler. Damit erzielte der geübte Behandler eine signifikant höhere Ablationsrate als der ungeübte ($p < 0,001$) (siehe Abbildung 29).

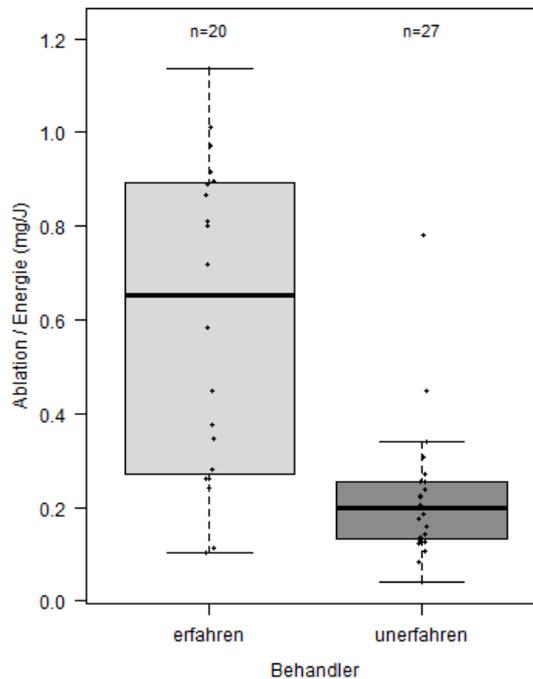


Abbildung 29: Ablationsrate pro Energie (in mg/J) in Abhängigkeit vom Behandler.

4.4 Raman-Spektren der Konkremente

Die Spektren der 27 untersuchten Sialolithen zeigten untereinander bis auf ein Konkrement keine nennenswerten Unterschiede. Es konnten Maxima der Raman-Intensität bei einer Raman-Verschiebung von 1000 cm^{-1} bis 900 cm^{-1} und im Wellenzahlenbereich von 3000 cm^{-1} bis 2800 cm^{-1} beobachtet werden (siehe Abbildung 30). Bei der Datenbanksuche nach korrelierenden Spektren wurden zwei gut zu den gemessenen Spektren passende Datenbankspektren, also zwei Spektren mit hohem *hit quality index*, gefunden. Im Spektren-Abschnitt von 1150 cm^{-1} bis 350 cm^{-1} zeigte sich eine hohe Übereinstimmung mit dem Datenbank-Spektrum von Carbonatapatit. Der ausgeprägte *peak* bei 962 cm^{-1} entspricht hierbei der charakteristischen Valenzschwingung von Phosphat (siehe Abbildung 31). Im Spektren-Abschnitt von 3500 cm^{-1} bis 1150 cm^{-1} war eine gute Korrelation mit dem Datenbankspektrum von Keratin zu beobachten (siehe Abbildung 32).

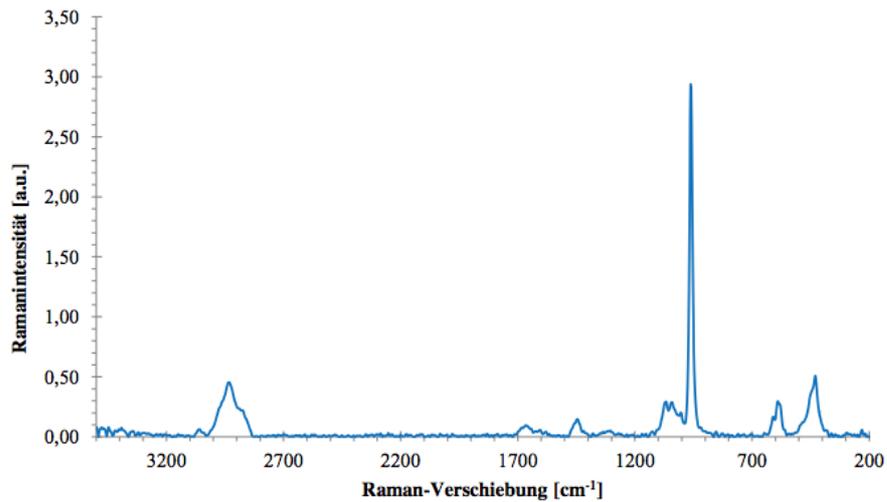


Abbildung 30: Charakteristisches Raman-Spektrum einer Probe (Darstellung der Ramanintensität innerhalb eines Wellenzahlenbereichs von 3500 cm⁻¹ bis 200 cm⁻¹; a.u.= arbitrary units).

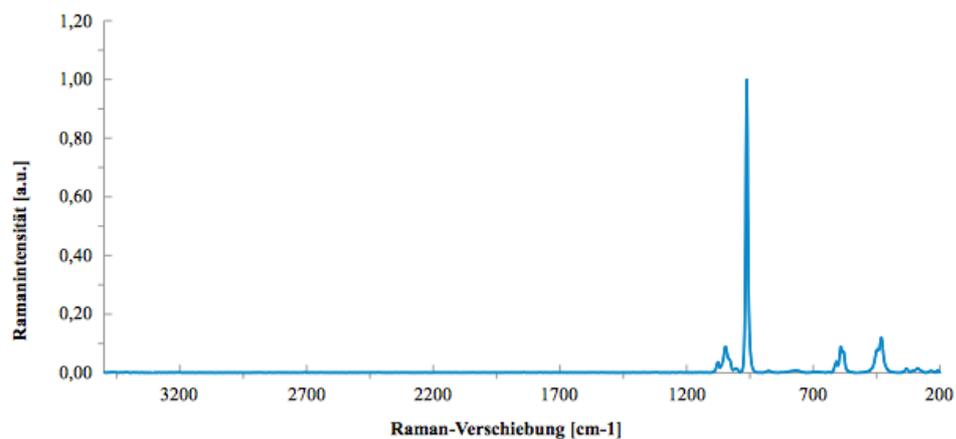


Abbildung 31: Datenbankspektrum von Carbonatapatit; charakteristischer peak bei 1000 cm⁻¹ bis 900 cm⁻¹ (Darstellung der Ramanintensität innerhalb eines Wellenzahlenbereichs von 3500 cm⁻¹ bis 200 cm⁻¹; a.u.= arbitrary units).

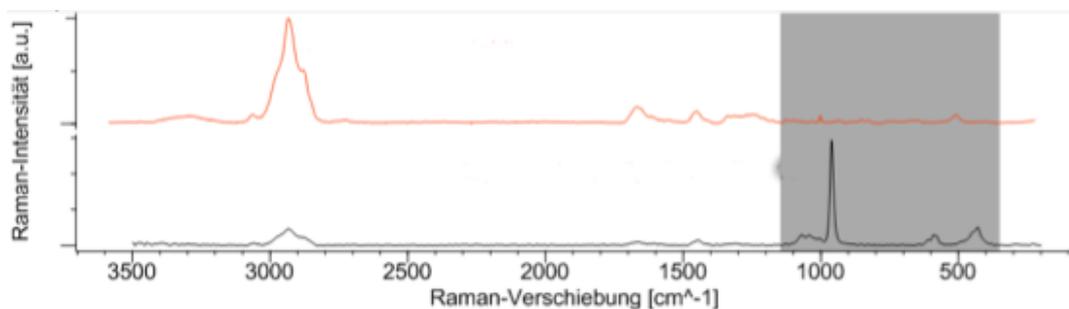


Abbildung 32: Ergebnis der Datenbanksuche für den Spektrenbereich von 3500 bis 1150 cm⁻¹ und 350 bis 200 cm⁻¹. Oben in orange ist das Datenbankspektrum von Keratin zu erkennen, darunter in schwarz das gemessene Spektrum. Der Suchbereich ist weiß hinterlegt (Darstellung der Ramanintensität innerhalb eines Wellenzahlenbereichs von 3500 cm⁻¹ bis 200 cm⁻¹; a.u.= arbitrary units).

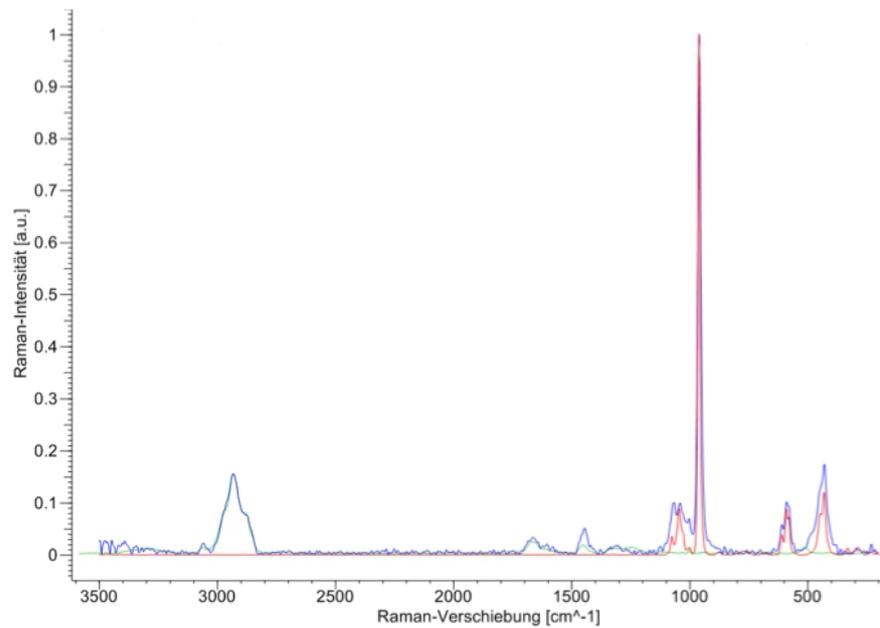


Abbildung 33: Überlagerung der Datenbank-Spektren von Carbonatapatit (rot) und Keratin (grün) mit einem gemessenen Spektrum (blau) (Darstellung der Ramanintensität innerhalb eines Wellenzahlenbereichs von 3500 cm^{-1} bis 200 cm^{-1} ; a.u.= arbitrary units).

Auch bei Überlagerung der gemessenen Spektren mit den Datenbank-Spektren von Carbonatapatit und Keratin zeigte sich eine gute Übereinstimmung der Banden (siehe Abbildung 33). Bei der *mixture analysis* der Datenbankspektren variierte der Faktor für das Datenbankspektrum von Carbonatapatit von 0,40 bis 0,89. Der mittlere Wert des Faktors betrug 0,73. Der Faktor für das Datenbankspektrum von Keratin variierte von 0,11 bis 0,60 bei einem mittleren Faktorenwert von 0,27. Je größer der Faktor des Datenbankspektrums ist, desto größer ist der Anteil der Substanz im Vergleich zu Spektren mit kleineren Faktoren.

Bei der bereits in der Dual Energy CT-Analyse auffälligen Probe konnte kein Carbonatapatit im Raman-Spektrum gefunden werden (siehe Abbildung 34). Allerdings war dieses Spektrum mehr verrauscht und daher schlechter auszuwerten als die anderen aufgenommenen Spektren. Die Raman-Ergebnisse zeigten, dass sich die Zusammensetzung von 26 untersuchten Konkrementen in qualitativer Hinsicht kaum unterscheidet. Durch Vergleich mit normierten Datenbankspektren konnte Carbonatapatit als anorganischer Bestandteil und Keratin als organische Komponente nachgewiesen werden. Im Spektrum einer Probe konnte nur Keratin nachgewiesen werden.

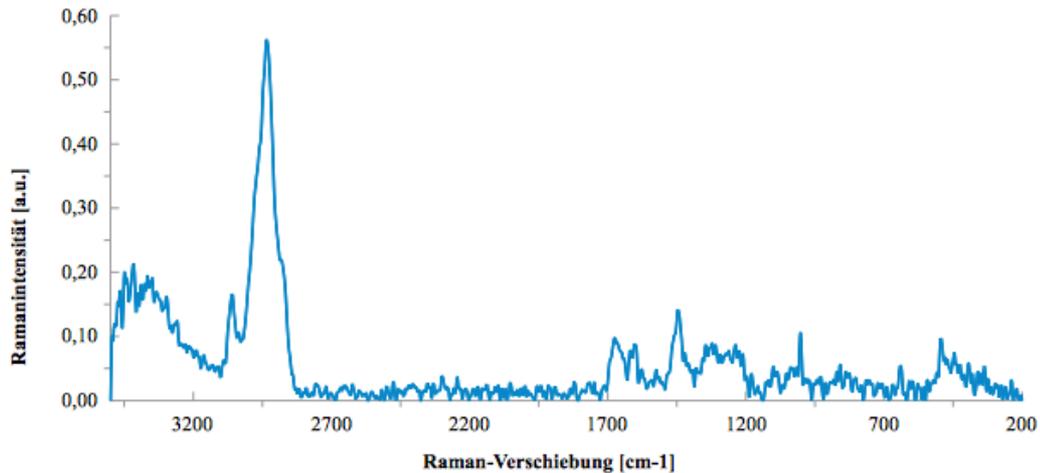


Abbildung 34: Spektrum einer Probe ohne charakteristischen peak für Carbonatapatit (Darstellung der Ramanintensität innerhalb eines Wellenzahlenbereichs von 3500 cm^{-1} bis 200 cm^{-1} ; a.u. = arbitrary units).

4.5 Infrarotspektren der Konkreme

Von den 47 infrarotspektroskopisch untersuchten Proben zeigten 46 eine Zusammensetzung aus mineralischen Komponenten. Dabei wurde im Spektrum aller 46 Konkreme eine 75- bis 95-prozentige Carbonatapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)(\text{CO}_3\text{OH})_6(\text{OH})_2$)-Komponente gefunden. Bei 37 von 46 Konkremen wurde zusätzlich eine 5- bis 25-prozentige Weddellit (Calciumoxalat-Dihydrat $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)-Komponente gefunden. Struvit (Magnesium-Ammoniumphosphat-Hexahydrat $(\text{NH}_4)\text{Mg}[\text{PO}_4] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) konnte zusätzlich zu Carbonatapatit als 5 bis 15-prozentige Komponente in 9 von 46 Konkremen nachgewiesen werden. Damit war mittels der Infrarot-Spektroskopie bei 46 Konkremen der Nachweis von zwei verschiedenen Zweikomponentengemischen möglich. 37 der untersuchten Proben enthielten demnach Carbonatapatit und Weddellit in unterschiedlichen Relationen (siehe Abbildung 35). Im Gemischtspektrum ist der Weddellit-Anteil an den Banden bei 1640, 1327 und 769 cm^{-1} zu erkennen. Der Carbonatapatit-Anteil ist bei dieser Zusammensetzung an den Banden bei 1044, 602 und 567 cm^{-1} zu erkennen. Bei 9 Konkremen konnten Carbonatapatit und Struvit in variierenden Anteilen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 36). Den Hinweis auf Struvit liefert die ab 2300 cm^{-1} abnehmende Transmission, die Banden bei 1032, 873 und 601 cm^{-1} liefern bei dieser Komposition die wichtigsten Hinweise für Carbonatapatit. Bei einer Probe konnte dem aufgenommenen Spektrum kein Referenzspektrum einer mineralischen Substanz zugeordnet werden (siehe Abbildung 37).

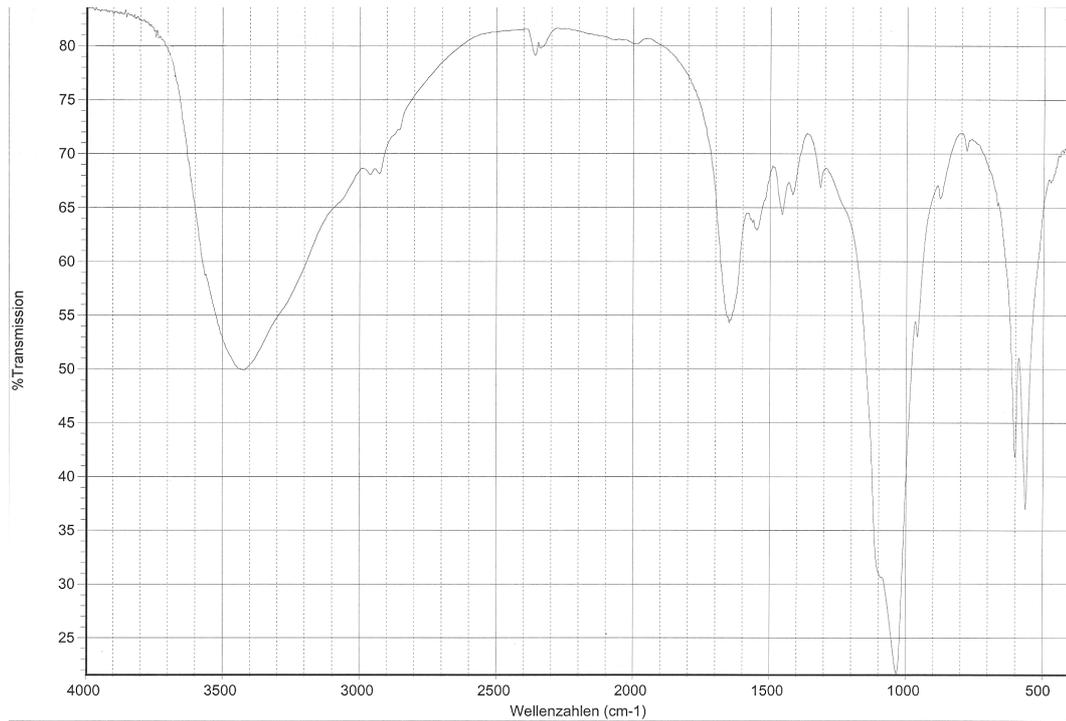


Abbildung 35: Beispielhaftes Infrarot-Spektrum einer Probe, bei welcher die Komponenten Carbonatapatit und Weddellit nachgewiesen werden konnten (Darstellung des Transmissionsspektrums als Funktion der Wellenzahl innerhalb eines Bereichs von 4000 cm^{-1} bis 400 cm^{-1} ; Transmission = Eingangsintensität/Ausgangsintensität in %).

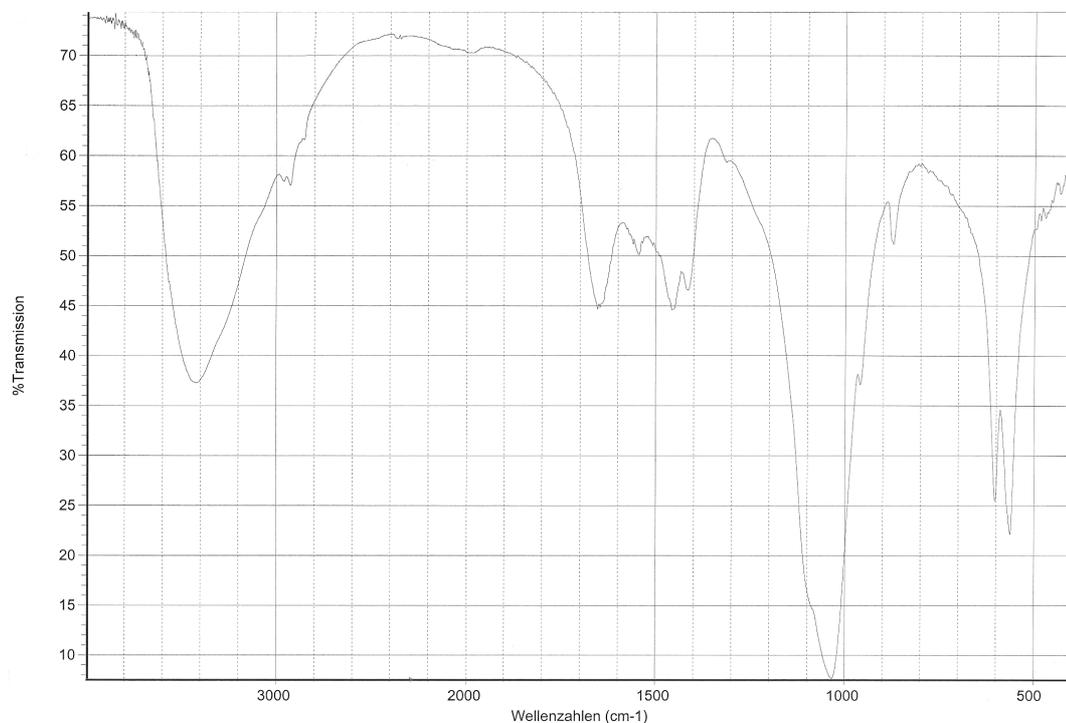


Abbildung 36: Infrarot-Spektrum einer Probe, bei welcher Carbonatapatit und Struvit als Bestandteile gefunden wurden (Darstellung des Transmissionsspektrums als Funktion der Wellenzahl innerhalb eines Bereichs von 4000 cm^{-1} bis 400 cm^{-1} ; Transmission = Eingangsintensität/Ausgangsintensität in %).

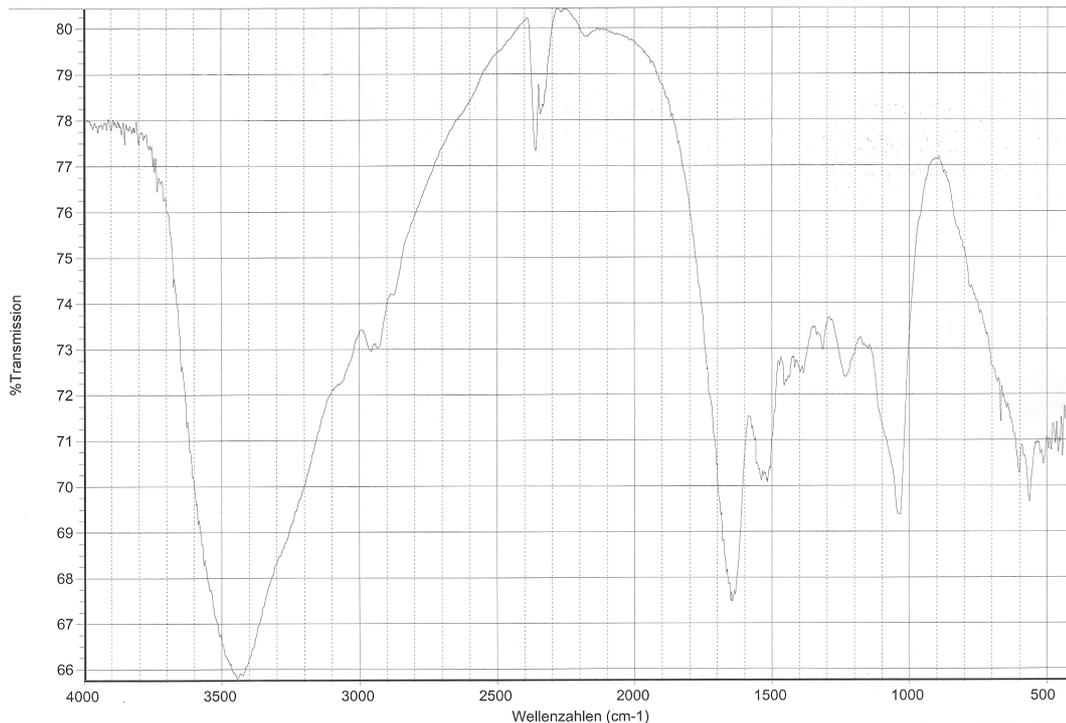


Abbildung 37: Infrarot-Spektrum einer Probe, welcher keine mineralischen Bestandteile zugeordnet werden konnten (Darstellung des Transmissionspektrums als Funktion der Wellenzahl innerhalb eines Bereichs von 4000 cm^{-1} bis 400 cm^{-1} ; Transmission = Eingangintensität/Ausgangintensität in %).

4.6 Korrelationen zwischen physikalisch-chemischen, optischen und radiologischen Parametern

Es zeigte sich, dass die rot fluoreszierenden Konkreme im Durchschnitt einen signifikant höheren Raman-Faktor für Carbonatapatit haben als die grün fluoreszierenden Konkreme ($p = 0,020$). Da sich die Raman-Faktoren gegenseitig bedingen, hatten die grün fluoreszierenden Konkreme im Mittel einen signifikant höheren Raman-Faktor für Keratin als die rot fluoreszierenden ($p = 0,020$).

	rote Fluoreszenz	grüne Fluoreszenz
Raman-Faktor Carbonatapatit	$0,82 \pm 0,07$	$0,64 \pm 0,24$
Raman-Faktor Keratin	$0,18 \pm 0,07$	$0,35 \pm 0,24$

Tabelle 5: Zusammenhang zwischen Fluoreszenz und Raman-Faktoren der Konkreme.

Konkremente, die nach den Ergebnissen der Infrarot-Spektroskopie Carbonatapatit und

Weddellit enthielten, unterschieden sich hinsichtlich ihrer Fluoreszenz nicht signifikant von Konkrementen, die Carbonatapatit und Struvit enthielten ($p = 0,662$).

	rote Fluoreszenz [% der Konkreme]te]	grüne Fluoreszenz [% der Konkreme]te]
Carbonatapatit/Weddellit	32	68
Carbonatapatit/Struvit	22	78

Tabelle 6: Zusammenhang zwischen Fluoreszenz der Konkreme und Ergebnissen der IR-Spektroskopie.

Zwischen rot und grün fluoreszierenden Konkrementen war kein signifikanter Unterschied bezüglich der berechneten Dichte zu beobachten ($p = 0,880$).

	rote Fluoreszenz	grüne Fluoreszenz
berechnete Dichte ρ [g/cm ³]	$1,0 \pm 0,5$	$1,0 \pm 0,4$

Tabelle 7: Zusammenhang zwischen Fluoreszenz und berechneter Dichte ρ der Konkreme.

Es ließ sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen den am DECT-Bild gemessenen Dichtewerten bei 80 und 140 kV und den Werten der Raman-Faktoren für Carbonatapatit nachweisen ($p = 0,003$ bzw. $p = 0,007$). Hierbei waren die *Hounsfield units* umso größer, je höher der Faktor für Carbonatapatit war ($r = 0,556$ bzw. $r = 0,510$). Da die Werte der Raman-Faktoren für Carbonatapatit und Keratin sich gegenseitig bedingen, korrelierten die Werte der Raman-Faktoren für Keratin um dieselben Werte negativ mit den DECT-Dichtewerten (80 kV: $p = 0,003$ $r = -0,556$; 140 kV: $p = 0,007$ $r = -0,510$).

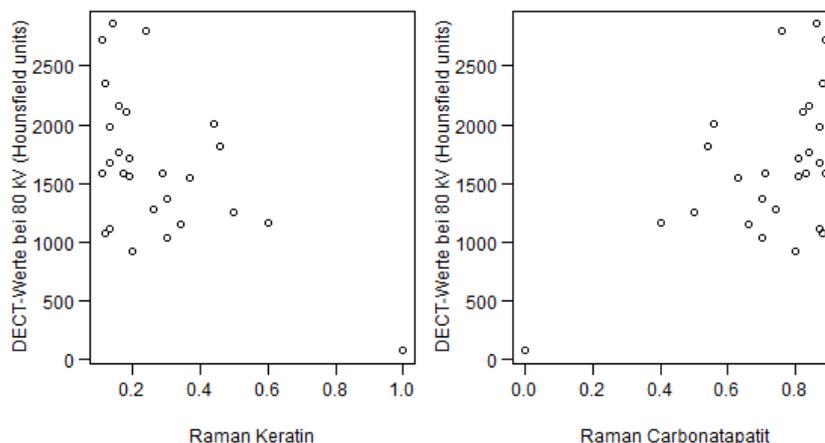


Abbildung 38: Zusammenhang zwischen Raman-Faktoren der Konkreme und DECT-Werten (in Hounsfield units) bei 80 kV

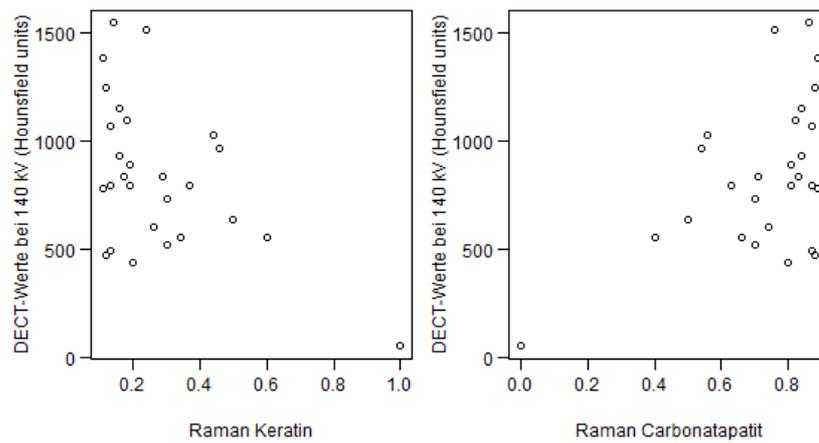


Abbildung 39: Zusammenhang zwischen Raman-Faktoren der Konkremente und DECT-Werten (in Hounsfield units) bei 140 kV

Die im DECT-Bild bei 80 und 140 kV gemessenen Dichtewerte der Carbonatapatit und Weddellit enthaltenden Konkremente unterschieden sich nicht signifikant von den gemessenen Dichtewerten der Carbonatapatit und Struvit enthaltenden Konkremente ($p = 0,133$ bzw. $p = 0,130$).

	DECT-Werte bei 80 kV [HU]	DECT-Werte bei 140 kV [HU]
Carbonatapatit/Weddellit	1590,1 ± 457,0	821,2 ± 257,1
Carbonatapatit/Struvit	1857,8 ± 526,8	972,4 ± 289,9

Tabelle 8: Zusammenhang zwischen DECT-Werten und Ergebnissen der FTIR-Spektroskopie.

Die aus Gewicht und Volumen berechnete Dichte ρ der Konkremente korrelierte signifikant mit den Ergebnissen der Dichtemessung an den DECT-Bildern bei 80 und 140 kV ($p < 0,001$ bzw. $p = 0,001$). Dabei zeigte sich eine Zunahme der *Hounsfield units* mit zunehmender Dichte der Konkremente ($r = 0,490$ bzw. $r = 0,455$) (siehe Abbildung 40 und 41).

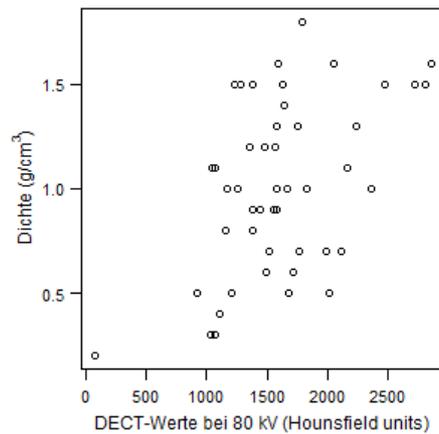


Abbildung 40: Zusammenhang zwischen DECT-Werten bei 80 kV (in Hounsfield units) und Dichte ρ (in g/cm^3) der Konkremente.

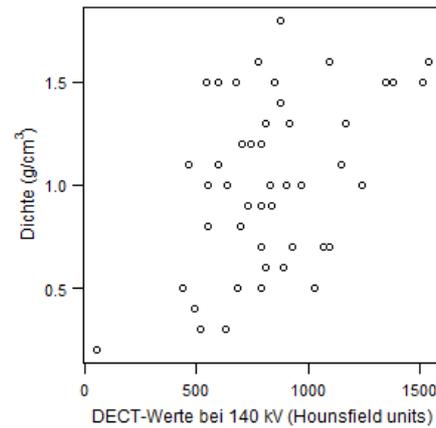


Abbildung 41: Zusammenhang zwischen DECT-Werten bei 140 kV (in Hounsfield units) und Dichte ρ (in g/cm^3) der Konkremente.

Konkremente, die Carbonatapatit und Weddellit enthielten, unterschieden sich hinsichtlich ihrer berechneten Dichte nicht signifikant von Konkrementen, die Carbonatapatit und Struvit enthielten ($p = 0,624$).

	berechnete Dichte ρ [g/cm^3]
Carbonatapatit/Weddellit	$1,0 \pm 0,4$
Carbonatapatit/Struvit	$1,1 \pm 0,4$

Tabelle 9: Zusammenhang zwischen berechneter Dichte ρ der Konkremente und Ergebnissen der IR-Spektroskopie.

Zwischen der berechneten Dichte der Konkremente und den Werten der Raman-Faktoren konnte kein Zusammenhang nachgewiesen werden (Carbonatapatit: $p = 0,080$ $r = 0,343$; Keratin: $p = 0,080$ $r = -0,343$) (siehe Abbildung 42).

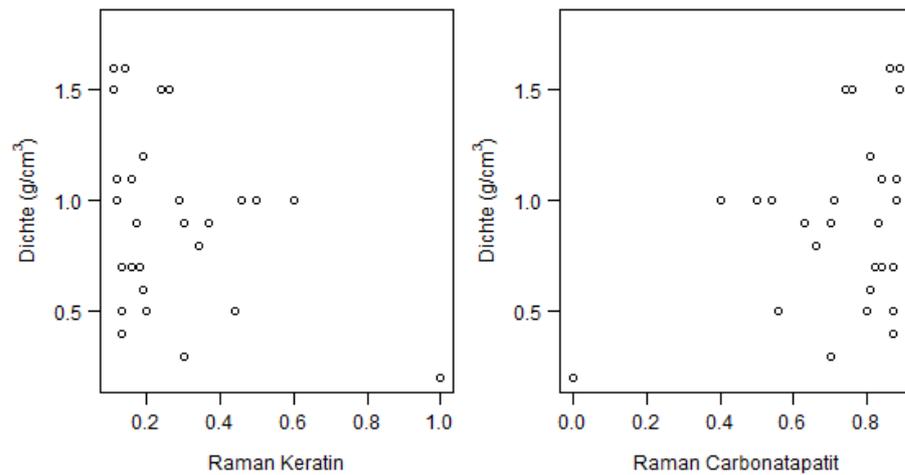


Abbildung 42: Zusammenhang zwischen Raman-Faktoren und Dichte ρ (in g/cm^3) der Konkreme.

Es zeigte sich, dass die Raman-Faktoren für Carbonatapatit mit den Werten der FTIR-Spektroskopie für Carbonatapatit korrelieren ($r = 0,406$; $p = 0,040$).

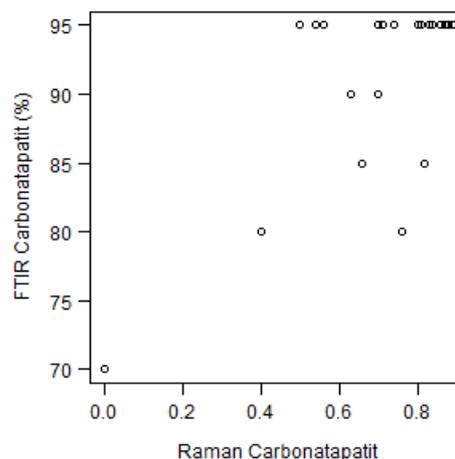


Abbildung 43: Zusammenhang zwischen der Höhe der Raman-Faktoren für Carbonatapatit und prozentualen Carbonatapatit-Anteil der Konkreme in der FTIR-Spektroskopie.

4.7 Faktoren mit praktischer Relevanz für die Fragmentierung

4.7.1 Zusammenhang zwischen Fragmentierungsrate und physikalisch-chemischen, optischen sowie radiologischen Eigenschaften der Konkreme

Zwischen rot und grün fluoreszierenden Konkremen konnte kein signifikanter

Unterschied bezüglich der Ablationsrate gefunden werden ($p = 0,055$).

	rote Fluoreszenz	grüne Fluoreszenz
Ablation/Energie [mg/J]	$0,2 \pm 0,2$	$0,4 \pm 0,3$

Tabelle 10: Zusammenhang zwischen Ablationsrate pro Energie und Fluoreszenz der Konkremeente.

Zwischen den Werten der Raman-Faktoren für Carbonatapatit ($r = 0,335/p = 0,088$) und Keratin ($r = -0,335/p = 0,088$) und der Ablationsrate pro J konnte keine Korrelation beobachtet werden.

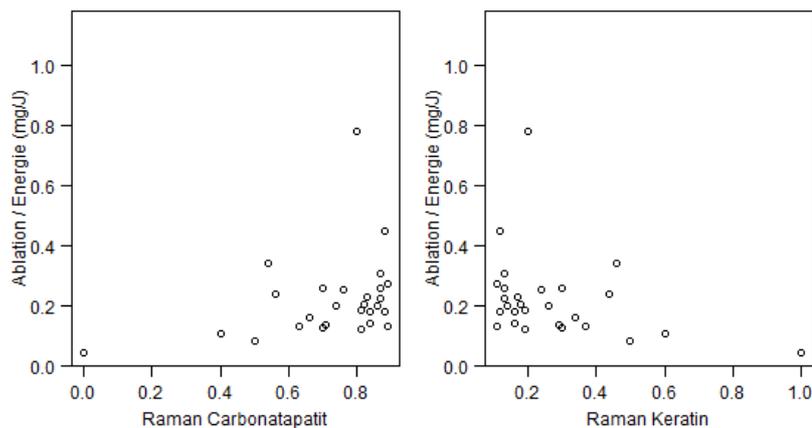


Abbildung 44: Zusammenhang zwischen Raman-Faktoren der Konkremeente und Ablationsrate pro Energie (in mg/J).

Die Carbonatapatit und Weddellit enthaltenden Konkremeente unterschieden sich bezüglich der Ablationsrate pro J nicht signifikant von den Carbonatapatit und Struvit enthaltenden Konkremeenten ($p = 0,245$).

	Carbonatapatit/Weddellit	Carbonatapatit/Struvit
Ablation/Energie [mg/J]	$0,4 \pm 0,3$	$0,5 \pm 0,3$

Tabelle 11: Zusammenhang zwischen Ablationsrate pro Energie und Ergebnissen der IR-Spektroskopie.

Die aus Gewicht und Volumen berechnete Dichte der Konkremeente korrelierte nicht mit der Ablationsrate pro J des Lasers ($r = 0,201/p = 0,175$) (siehe Abbildung 45).

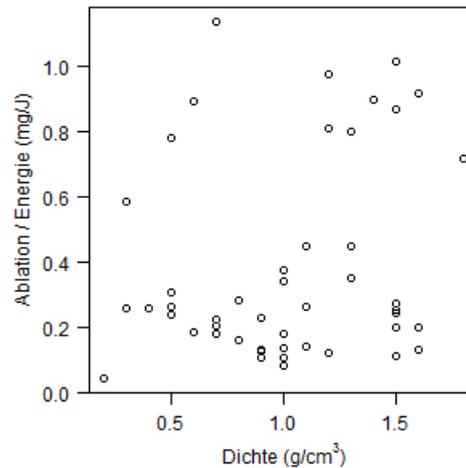


Abbildung 45: Zusammenhang zwischen Dichte ρ (in g/cm^3) der Konkreme und Ablationsrate pro Energie (in mg/J).

Auch die aus den DECT-Aufnahmen ermittelten Dichtewerte bei 80 kV ($r = -0,046 / p = 0,761$) und 140 kV ($r = -0,049 / p = 0,742$) korrelierten nicht mit der Fragmentierungsrate pro J.

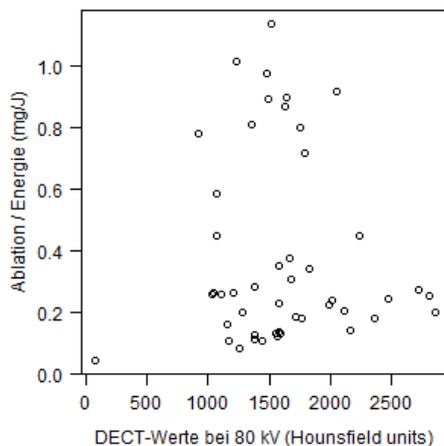


Abbildung 46: Zusammenhang zwischen DECT-Werten (in Hounsfield units) der Konkreme bei 80 kV und Ablationsrate pro Energie (in mg/J).

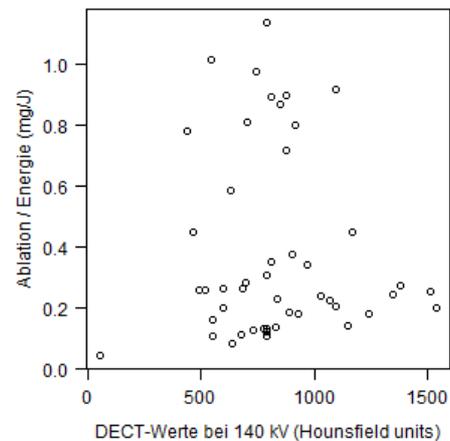


Abbildung 47: Zusammenhang zwischen DECT-Werten (in Hounsfield units) der Konkreme bei 140 kV und Ablationsrate pro Energie (in mg/J).

4.7.2 Zusammenhang zwischen Zertrümmerungsart und physikalisch-chemischen, optischen sowie radiologischen Eigenschaften der Konkreme

Zwischen rot und grün fluoreszierenden Konkremen konnte hinsichtlich der

Zertrümmerungsart kein signifikanter Unterschied beobachtet werden ($p = 0,095$).

	Zertrümmerungsart unkompliziert [n Konkremente]	Zertrümmerungsart kompliziert [n Konkremente]
rote Fluoreszenz	3	10
grüne Fluoreszenz	17	17

Tabelle 12: Zusammenhang zwischen beobachteter Zertrümmerungsart und Fluoreszenz der Konkremente.

Die Dichtewerte aus dem DECT bei 80 kV und 140 kV und die beobachtete Zertrümmerungsart zeigten keinen signifikanten Zusammenhang ($p = 0,168$).

	Zertrümmerungsart unkompliziert	Zertrümmerungsart kompliziert
Dichte bei 80 kV [HU]	1485,7 ± 361,0	1700,5 ± 609,5
Dichte bei 140 kV [HU]	774,4 ± 197,1	877,9 ± 338,5

Tabelle 13: Zusammenhang zwischen beobachteter Zertrümmerungsart und DECT-Dichtewerten der Konkremente bei 80 und 140 kV.

Ebenso konnte keine Abhängigkeit der beobachteten Zertrümmerungsart von der berechneten Dichte ρ der Konkremente beobachtet werden ($p = 0,177$).

	Zertrümmerungsart unkompliziert	Zertrümmerungsart kompliziert
berechnete Dichte ρ [g/cm ³]	0,9 ± 0,4	1,1 ± 0,4

Tabelle 14: Zusammenhang zwischen beobachteter Zertrümmerungsart und berechneter Dichte ρ der Konkremente.

Zwischen den Faktoren der Raman-Spektroskopie für Carbonatapatit und Keratin und der Zertrümmerungsart zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang ($p = 0,629$; $p = 0,629$) (siehe Tabelle 15).

	Zertrümmerungsart unkompliziert	Zertrümmerungsart kompliziert
Raman-Faktor Carbonatapatit	0,76 ± 0,12	0,71 ± 0,22
Raman-Faktor Keratin	0,24 ± 0,12	0,28 ± 0,22

Tabelle 15: Zusammenhang zwischen beobachteter Zertrümmerungsart und Raman-Faktoren der Konkremente.

Carbonatapatit und Weddellit enthaltende Konkremente unterschieden sich hinsichtlich der Zertrümmerungsart nicht signifikant von Carbonatapatit und Struvit enthaltenden Konkrementen ($p = 0,123$).

	Zertrümmerungsart unkompliziert [n Konkremente]	Zertrümmerungsart kompliziert [n Konkremente]
Carbonatapatit/Weddellit	38	62
Carbonatapatit/Struvit	66	33

Tabelle 16: Zusammenhang zwischen beobachteter Zertrümmerungsart und Ergebnissen der IR-Spektroskopie.

4.8 Laserpulseffekte auf das Speichelganggewebe

Das histologische Schnittbild in 30 bis 50 μm Tiefe zeigte in dem Bereich, wo die Laserpulse mit einer Energie von 500 mJ/Puls appliziert worden waren, keine erkennbaren Schäden. Dies bedeutet, dass eine durch Wechselwirkung mit dieser Laserenergie hervorgerufene eventuelle Läsion weniger tief als 30 bis 50 μm ins Gewebe eindringt. Sowohl bei einer Energie von 1000 mJ/Puls als auch bei einer Energie von 1500 mJ/Puls waren in dieser Schnittebene deutliche Ablationskrater zu erkennen (siehe Abbildung 48).

In der Schnittebene von 50 bis 70 μm Tiefe waren die Ablationslöcher der mit 1000 mJ/Puls applizierten Laserpulse gerade noch erkennbar. Die durch Laserpulse mit einer Energie von 1500 mJ/Puls hervorgerufenen Läsionen zeigten nur eine minimale Verkleinerung im Vergleich zur ersten Schnittebene (siehe Abbildung 49). Dies deutet darauf hin, dass die Nutzung einer Laserenergie von 1000 mJ/Puls ungefähr 70 μm tiefe Einschusslöcher im Gewebe hinterlässt, während bei einer applizierten Pulsenergie von 1500 mJ/Puls der Gewebeschaden deutlich über 70 μm hinausgeht.

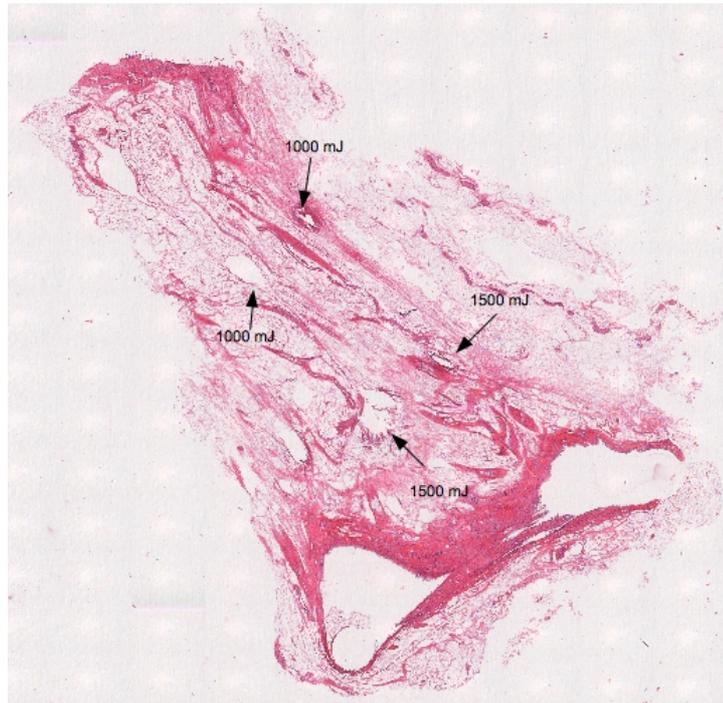


Abbildung 48: Schnittebene in 30 bis 50 μm Tiefe: deutlich erkennbare Läsionen nach Beschiessung des Gewebes mit 1000 und 1500 mJ.

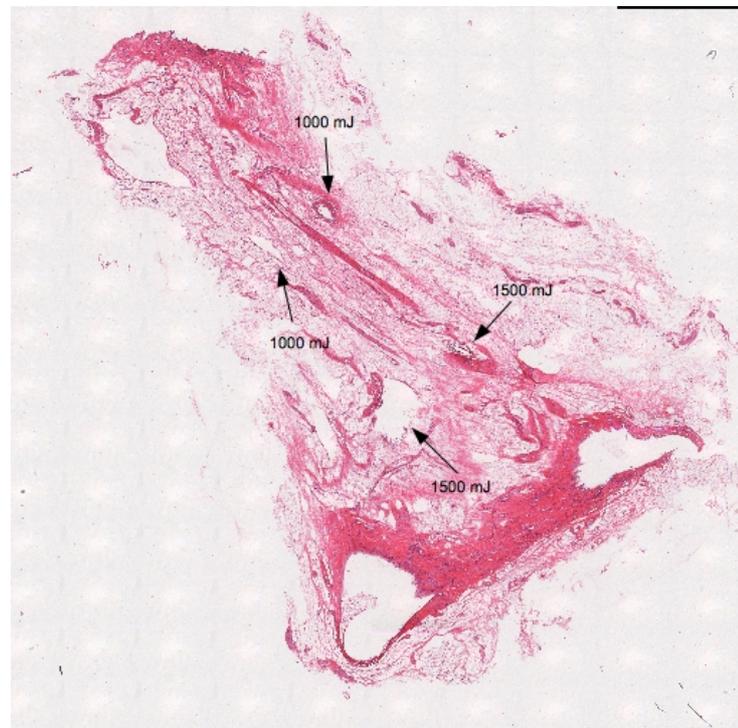


Abbildung 49: Schnittebene in 50 bis 70 μm Tiefe: minimale Verkleinerung der Einschusslöcher im Vergleich zur Schnittebene in 30-50 μm Tiefe.

5 Diskussion

5.1 Spektroskopisch bestimmte Zusammensetzung der Konkremente

Um zu untersuchen, ob sich die Konkremente hinsichtlich ihrer Zusammensetzung unterscheiden, wurden diese mittels Raman- und Infrarot-Spektroskopie analysiert. Die Raman-Spektroskopie zeigte, dass sich 26 der 27 untersuchten Konkremente in Bezug auf ihre Zusammensetzung qualitativ kaum unterscheiden. Durch Vergleich mit Spektren aus einer Datenbank konnten die Raman-Spektren dieser Steine sowohl dem Mineral Carbonatapatit als auch dem Strukturprotein Keratin zugeordnet werden. Für jeden dieser Bestandteile wurde ein Wichtungsfaktor angegeben, welcher eine Aussage über den relativen Anteil der jeweiligen Komponente im Vergleich zu anderen Proben mit gleicher qualitativer Zusammensetzung macht, wobei die Summe der Faktoren immer eins ergibt. Das Verhältnis von Carbonatapatit zu Keratin betrug im Mittel ungefähr 3:1. Im Raman-Spektrum des Konkrements, welches in der DECT auffällig niedrige Dichtewerte gezeigt hatte, wurde bei der Datenbanksuche lediglich eine Übereinstimmung mit dem Spektrum von Keratin gefunden. Auch dem Infrarot-Spektrum dieses Konkrements konnte kein Referenzspektrum einer mineralischen Substanz zugeordnet werden, was ein Hinweis auf eine Zusammensetzung komplett aus organischen Bestandteilen sein dürfte. Die restlichen mittels der Infrarot-Spektroskopie untersuchten Konkremente unterschieden sich hinsichtlich ihrer Zusammensetzung kaum. Als Hauptkomponente wurde bei allen 46 Konkrementen wie auch bei der Raman-Spektroskopie Carbonatapatit identifiziert. Bei 37 Konkrementen wurde als Mischpartner das Mineral Weddellit im Spektrum nachgewiesen, bei 9 Konkrementen konnte zusätzlich das Mineral Struvit gefunden werden.

Mit beiden spektroskopischen Untersuchungsmethoden konnte somit ein Konkrement identifiziert werden, welches sich hinsichtlich seiner chemischen Zusammensetzung von den restlichen Steinen dahingehend unterschied, dass es keine anorganischen Bestandteile zu enthalten schien. Dieses Konkrement hob sich auch in der Bildgebung mittels DECT durch im Vergleich sehr niedrige Dichtewerte von den anderen Konkrementen ab. Laut den Ergebnissen der Raman-Spektroskopie enthielt dieses Konkrement einen hohen Anteil an Keratin, mittels der Infrarot-Spektroskopie konnte kein passendes Spektrum einer anorganischen Substanz gefunden werden. Die Ergebnisse der Raman-Spektroskopie basieren auf einer möglichst guten Übereinstimmung der gemessenen Spektren mit Spektren aus einer Datenbank. Da in der verwendeten Datenbank nur eine

begrenzte Anzahl an Referenzspektren enthalten ist, besteht die Möglichkeit einer ebenso guten oder besseren Übereinstimmung mit Spektren anderer Substanzen, welche nicht in dieser Datenbank enthalten sind. Die Dichtewerte aus der DECT lieferten ebenfalls Hinweise dafür, dass es sich bei dem betreffenden Konkrement um einen nicht mineralisierten Sekretpfropf aus eingedicktem Speichel handeln könnte. Mögliche Bestandteile wären in diesem Fall im Speichel enthaltene Muzine, welche bei Anreicherung und Ablagerung als Nidus für eine Calcifikation dienen können. In vorangegangenen Studien konnten bezüglich organischer Komponenten obligate Speichelbestandteile wie Glycoproteine und Mucopolysaccharide, aber auch Kollagenartige Proteinstrukturen, das antimikrobiell wirksame Peptid Defensin, Zelldetritus, Komponenten von Nahrungsbestandteilen und Bakterienfragmente in Speichelsteinen gefunden werden (Anneroth *et al.*, 1975, Szalma *et al.*, 2012). Keratin, ein schwefelhaltiges Strukturprotein, welches beim Menschen in Haaren, Nägeln und der Haut vorkommt, wurde bisher noch nicht in Sialolithen gefunden. Jedoch gelang bereits der Nachweis von verschiedenen schwefelhaltigen Aminosäuren wie Tyrosin, Phenylalanin und Hydroxyprolin sowie von Disulfidgruppen in Speichelsteinen (Triantafyllou *et al.*, 2006, Jayasree *et al.*, 2008). Disulfidgruppen sind in der Aminosäure Cystin enthalten, welche ein charakteristischer Bestandteil der Aminosäuresequenz von Keratin ist. Die anderen gefundenen Aminosäuren kommen ebenfalls in Keratin, aber auch in anderen Strukturproteinen wie Kollagen oder Elastin vor (Strnad *et al.*, 2011).

Der Großteil der Konkremeinte bestand laut den Ergebnissen der spektroskopischen Analysemethoden aus anorganischen Bestandteilen. Während mit der Raman-Spektroskopie nur Carbonatapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)(\text{CO}_3\text{OH})_6(\text{OH})_2$) gefunden wurde, konnten mithilfe der IR-Spektroskopie zusätzlich die Mischpartner Weddellit (Calciumoxalat-Dihydrat $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) und Struvit (Magnesium-Ammoniumphosphat-Hexahydrat $(\text{NH}_4)\text{Mg}[\text{PO}_4] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) nachgewiesen werden. Zwischen der Höhe des Raman-Faktors für Carbonatapatit und dem mittels der IR-Spektroskopie ermittelten prozentualen Carbonatapatit-Anteil konnte eine signifikante Korrelation beobachtet werden. Mit zwei unterschiedlichen Analysemethoden gelang also der Nachweis derselben Substanz, was für die Reliabilität dieser Untersuchungsverfahren spricht. Calciumphosphat in Form von Carbonatapatit oder Hydroxylapatit wurde bereits in früheren Studien mithilfe verschiedenster Analysemethoden als Hauptbestandteil von Speichelsteinen ermittelt (Frame *et Smith*, 1986, Teymoortash *et al.*, 2003, Siedek *et al.*, 2008, Jayasree *et al.*, 2008). Die Formation dieser Mineralien wird durch eine hohe Calciumkonzentration bei gleichzeitig erhöhtem pH-Wert des Speichels begünstigt, da es durch Abnahme der Löslichkeit von Calcium und Phosphat im Speichel zur Präzipitation von Apatitkristallen

kommt (Su *et al.*, 2010, Williams, 1999). Als Ursache für eine Alkalisierung des Speichel-pH-Werts werden bakterielle Infektionen vermutet (Lustmann *et Shteyrer*, 1981). Weitere bei früheren Untersuchungen gefundene anorganische Bestandteile waren Whitlockit, Brushit und Octacalciumphosphat (Strübel *et Rzepka-Glinder*, 1989, Burstein *et al.*, 1979). Weddellit wurde bisher nur im Rahmen einer einzigen Studie als Komponente eines Speichelsteins nachgewiesen (Yamamoto *et al.*, 1983). Es handelt sich hierbei um ein seltenes Mineral, welches zu den Calciumoxalaten gehört. Etwa zwei Drittel aller Harnsteine bei Erwachsenen enthalten Calciumoxalat in Form von Weddellit (Calciumoxalat-Dihydrat) oder Whewellit (Calciumoxalat-Monohydrat). Man geht im urologischen Bereich bei diesen Steinarten von einer multifaktoriellen Genese aus, wobei eine Hypercalciurie sowie eine Hyperoxalurie möglicherweise eine wichtige Rolle spielen (Tiselius, 2003, Hautmann, 1986). Die Ursache für das Auftreten einer calciumoxalathaltigen Mineralform als Mischpartner zu Carbonatapatit in Speichelsteinen ist bisher ungeklärt. In Betracht zu ziehen wäre beispielsweise ein Zusammenhang mit dem häufigen Genuss von Nahrungsmittel mit einem hohen Gehalt an Oxalsäure, wie Spinat, Rhabarber oder Kakao. Yamamoto *et al.* stellten die These auf, dass es sich bei Weddellit in Speichelsteinen genauso wie im Fall von Brushit um eine initiale Form der Calciumablagerung handeln könnte, welche erst mit der Zeit zu Apatit umgewandelt wird (Yamamoto *et al.*, 1983). Struvit als mineralischer Bestandteil von Sialolithen wurde zum ersten Mal im Rahmen der vorliegenden Studie nachgewiesen. Hierbei handelt es sich um ein ebenfalls relativ seltenes Mineral aus Magnesium, Ammonium und Phosphat. Einzeln wurden diese Substanzen bereits in Speichelsteinen gefunden (Hiraide *et Nomura*, 1980, Vavrina *et al.*, 1994). Urologische Struvit-Steine entstehen im Rahmen von Harnwegsinfektionen mit ureasebildenden Bakterienstämmen. Voraussetzung für ihre Bildung ist ein alkalischer pH-Wert sowie eine hohe Ammoniumkonzentration im Urin (Sökeland *et Rübber*, 2008). Möglicherweise führt auch bei der Entstehung von Speichelsteinen eine Erhöhung des Speichel-pH-Werts bei vermehrtem Vorhandensein der entsprechenden Ionen zur Bildung von Struvitkristallen.

5.2 Anwendung fluoreszenzgestützter Verfahren zur Speichelsteinanalyse

Mithilfe der Fluoreszenzphotografie konnte bei Anregung mit UV-Licht eine Fluoreszenz der Konkremeinte sowohl im grünen als auch im roten Spektralbereich beobachtet werden. Die korrespondierenden Spektren der EEM-Messungen zeigten Emissionsmaxima der Fluoreszenzintensität zwischen 480 und 580 nm sowie zwischen 640 und 700 nm bei Anregungswellenlängen zwischen 400 und 450 nm. Ähnliche

Messwerte ergaben Fluoreszenzmessungen an subgingivalem Zahnstein: hierbei zeigten sich ausgeprägte Fluoreszenzbanden in einem Emissionswellenlängenbereich zwischen 530 und 730 nm, welche die größte Intensität bei Anregungswellenlängen zwischen 400 und 420 nm hatten (Buchalla *et al.*, 2004). Jayasree *et al.* konnten in fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen an Speichelsteinen Maxima der Fluoreszenzintensität um 450 nm registrieren, allerdings bei Anregungswellenlängen zwischen 280 und 325 nm (Jayasree *et al.*, 2008). Emissionsbanden mit einem Maximum bei ungefähr 450 nm konnten auch bei Messungen an humanem Dentin beobachtet werden und wurden Strukturproteinen zugeschrieben (Alfano *et al.*, 1981). Regt man gesundes Dentin mit UV-Licht (405 nm) an, fluoresziert dieses gelb-grün. Bei bakteriell infiziertem, kariösem Dentin kann unter UV-Licht rote Autofluoreszenz beobachtet werden (Lennon *et al.*, 2006). Diese wird durch Porphyrinverbindungen verursacht, welche von Mundhöhlen- und Kariesbakterien synthetisiert werden. Es handelt sich hierbei vor allem um Protoporphyrin IX und Coproporphyrin (König *et al.*, 2000). Porphyrine sind organisch-chemische Farbstoffe, welche an zahlreichen Prozessen wie z.B. Sauerstoff- und Elektronentransport beteiligt sind. Die emittierte Fluoreszenz dieser Verbindungen liegt zwischen 600 und 750 nm mit einem Emissionsmaximum um 635 nm bei einer Anregungswellenlänge von 405 nm (Wagnières *et al.*, 1998). Bei einigen der untersuchten Konkreme wurden Emissionsmaxima innerhalb dieses Wellenlängenbereichs gemessen, was auf das Vorhandensein von Porphyrin produzierenden Bakterien auf deren Oberfläche hinweisen könnte. Bei subgingivalem Zahnstein wurden Porphyrinderivate als Hauptursache für dessen Fluoreszenzverhalten verantwortlich gemacht (Buchalla *et al.*, 2004). Teymoortash *et al.* fanden in einer Studie zur Pathogenese von Speichelsteinen mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion in allen untersuchten Konkrementen bakterielle DNS, hauptsächlich von oral vorkommenden Streptokokken-Arten (Teymoortash *et al.*, 2002). In Analogie zum Dentin könnten demnach bakteriell nicht kontaminierte Steine grün und bakteriell besiedelte Konkreme rot fluoreszieren.

Eine weitere Erklärung für die unterschiedlichen Fluoreszenzeigenschaften der untersuchten Konkreme könnte ihre chemische Zusammensetzung liefern. In den von uns durchgeführten Raman-spektroskopischen Versuchen hatten unter UV-Licht rot fluoreszierende Konkreme im Durchschnitt einen signifikant höheren Raman-Faktor für Carbonatapatit als grün fluoreszierende Konkreme. Grün fluoreszierende Konkreme hatten hingegen im Mittel einen signifikant höheren Raman-Faktor für Keratin als die rot fluoreszierenden. Da die Werte der Raman-Faktoren sich gegenseitig

bedingen, könnte dies darauf hinweisen, dass entweder die als Carbonatapatit identifizierte Substanz rot oder die als Keratin identifizierte Substanz grün fluoresziert. Der Emissionsgipfel von Keratin liegt bei einem Anregungslicht von 400 nm um 470 nm (Stereborg *et al.*, 1994). Ähnliches Fluoreszenzverhalten zeigen die Strukturproteine Kollagen IV und Elastin. Ihre Emissionsmaxima liegen bei einer Anregungswellenlänge von 370 nm um 460 nm und bei einer Anregungswellenlänge von 440 nm um 520 nm (Kollias, 1998). Diese emittierten Wellenlängen entsprechen einer blauen bis grünen Farbe des sichtbaren Lichts. Möglich wäre also, dass eine grüne Fluoreszenz der Konkreme auf einen hohen Anteil an Proteinen an ihrer Gesamtzusammensetzung hindeutet. Dies deckt sich auch mit der Beobachtung der grünen Fluoreszenz von humanem Dentin, welches einen hohen Anteil an Strukturproteinen enthält. Ob und inwiefern sich der Anteil an anorganischen Bestandteilen wie Carbonatapatit auf die Fluoreszenz der Konkreme auswirkt, ist unklar.

Mithilfe der Infrarotspektroskopie konnten nur die anorganischen Bestandteile der Konkreme identifiziert werden, wobei zwischen einer Komposition aus Carbonatapatit und Weddellit und einer Zusammensetzung aus Carbonatapatit und Struvit differenziert werden konnte. Hinsichtlich des Fluoreszenzverhaltens bestand kein signifikanter Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen. Es muss jedoch erwähnt werden, dass die mit diesem Verfahren ermittelten Anteile von Weddellit und Struvit an der Gesamtzusammensetzung wahrscheinlich zu gering sind, um sich auf das Fluoreszenzverhalten der Steine auszuwirken. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass zwischen den anorganischen Bestandteilen der Konkreme und deren Fluoreszenzverhalten kein Zusammenhang besteht. Bei einem Konkremment konnte dem aufgenommenen Infrarot-Spektrum kein Referenzspektrum einer mineralischen Substanz zugeordnet werden, was darauf hinweisen könnte, dass dieses komplett aus organischen Bestandteilen besteht. Im Raman-Spektrum dieser Probe konnte nur Keratin nachgewiesen werden. Die unter UV-Licht beobachtete grüne Fluoreszenz dieses Konkremments könnte auf einen hohen Anteil an Strukturproteinen hinweisen. Es scheint also wahrscheinlich, dass die Fluoreszenzeigenschaften der untersuchten Konkreme durch organische Bestandteile wie Proteine oder bakterielle Stoffwechselprodukte wie Porphyrinverbindungen hervorgerufen wurden.

Die Tatsache, dass alle Konkreme unter UV-Licht Autofluoreszenz zeigten, könnte der erleichterten Auffindung von Sialolithen im Speichelgangsystem im Sinne einer Fluoreszenzendoskopie dienen. Dafür könnte man die Konkreme mithilfe einer in die Endoskoplichtquelle integrierten UV-Licht-Quelle zur Fluoreszenz anregen und diese

somit möglicherweise schneller und besser visualisieren. Dies könnte insbesondere bei von Schleimhaut überwachsenen Konkrementen hilfreich sein. Da gesunde Mundschleimhaut unter UV-Licht satt-grüne Autofluoreszenz zeigt, wäre vor allem bei rot, aber auch bei bläulich-grün fluoreszierenden Konkrementen eine bessere Erkennbarkeit möglich. Die Fluoreszenzendoskopie wird unter anderem erfolgreich für die Früherkennung (prä-)maligner Veränderungen im oberen Aerodigestivtrakt eingesetzt, wofür ein eigens für den HNO-Bereich entwickeltes Autofluoreszenz-Endoskopie-System (D-light-AF System, Storz, Tuttlingen, Germany) zur Verfügung steht (Arens *et al.*, 2007). Dieses könnte beispielsweise auch im Rahmen der interventionellen Sialendoskopie zum Einsatz kommen.

5.3 Relevanz der Dual Energy CT für Diagnostik und Therapie

Bei Versuchen an Harnsteinen kann mittels der Dual Energy Computertomographie zwischen Harnsäuresteinen und anderen Steinarten differenziert werden. Dies ist insofern von Bedeutung, als Harnsäuresteine im Sinne einer chemischen Litholyse behandelt werden können, während bei anderer Zusammensetzung der Steine meist eine mechanische Entfernung nötig ist (Strittmatter *et al.*, 2013). Innerhalb der Nicht-Harnsäuresteine ist eine weitere Unterscheidung zwischen Calcium- und Cystinsteinen möglich (Graser *et al.*, 2008, Primak *et al.*, 2011). Zwischen den calciumhaltigen Steinarten (Carbonatapatit, Hydroxylapatit, Calciumoxalat-Dihydrat, Calciumoxalat-Monohydrat) kann nicht unterschieden werden und auch die Abgrenzung von Struvit- und Brushit-Steinen ist schwierig. Da die effektiven Ordnungszahlen dieser Steintypen sich kaum unterscheiden, kommt es hier zu einer Überlappung der DE-Indices (Thomas *et al.*, 2010, Qu *et al.*, 2011). Es stellte sich die Frage, ob eine Differenzierung zwischen verschiedenen Steinarten auch bei Speichelsteinen möglich ist und ob sich die Unterschiede auf die Lithotripsie der Konkreme durch den Holmium:YAG-Laser auswirken. Allerdings ergab bereits die Analyse mittels Infrarot-Spektroskopie, dass fast alle Konkreme hauptsächlich aus Calcium und Phosphat bestehen. Zusätzlich zum Hauptbestandteil Carbonatapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)(\text{CO}_3\text{OH})_6(\text{OH})_2$) wurden entweder geringe Anteile an Weddellit (Calciumoxalat-Dihydrat $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) oder an Struvit (Magnesium-Ammoniumphosphat-Hexahydrat $(\text{NH}_4)\text{Mg}[\text{PO}_4] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) gefunden. Bei einem Konkrement konnte dem aufgenommenen IR-Spektrum kein Referenzspektrum einer mineralischen Substanz zugeordnet werden, was als Hinweis auf eine Zusammensetzung komplett aus organischen Bestandteilen zu werten ist. Die Ergebnisse der IR-Spektroskopie konnten mittels der Dual Energy Computertomographie bestätigt

werden. Die bei 80 und 140 kV gemessenen Dichtewerte in HU entsprachen bei den 46 hauptsächlich aus Carbonatapatit bestehenden Konkrementen in etwa den Dichtewerten, die von Graser *et al.* auch bei calcifizierten Harnsteinen gemessen worden waren. Ebenso war der berechnete mittlere DE-Index dieser Konkremente ähnlich dem DE-Index, der für calciumhaltige Harnsteine bestimmt worden war (Graser *et al.*, 2008). Carbonatapatit und Weddellit enthaltende Konkremente unterschieden sich bezüglich der Dichtewerte bei 80 und 140 kV nicht signifikant von Carbonatapatit und Struvit enthaltenden Konkrementen. Dies ist, wie bereits erwähnt, darauf zurückzuführen, dass die verschiedenen Komponenten sich in Bezug auf ihre effektive Ordnungszahl kaum unterscheiden.

Das Konkrement, welchem sich in der IR-Spektroskopie kein mineralisches Spektrum zuordnen ließ, hatte bei der Dichtemessung an den DECT-Bildern im Vergleich zu den anderen Konkrementen sehr niedrige Dichtewerte (80 kV: 74,5 HU, 140 kV: 53,5 HU) und einen niedrigen berechneten DE-Index (0,0100). Ähnliche Werte konnten von Stolzmann *et al.* bei einem Harnsäurestein gemessen werden (80 kV: 70 HU, 140 kV: 64 HU). Der DE-Index ist ähnlich dem Wert, welcher von Graser *et al.* für reine Harnsäuresteine berechnet wurde ($0,0051 \pm 0,0036$) (Stolzmann *et al.*, 2008, Graser *et al.*, 2008). Dies ist ein Hinweis darauf, dass das entsprechende Konkrement aus einem Material mit einer ähnlich niedrigen effektiven Ordnungszahl wie Harnsäure ($C_5H_4N_4O_3$) besteht. Möglich wäre, dass es sich hierbei um einen nicht mineralisierten Sekretpfropf aus eingedicktem Speichel handelt. Im Speichel enthaltene Proteine könnten für eine vergleichbare effektive Ordnungszahl verantwortlich sein, da diese aus denselben chemischen Elementen wie Harnsäure bestehen (C, O, H, N). Mithilfe der Raman-Spektroskopie wurde bei diesem Konkrement nur Keratin und kein Carbonatapatit im Spektrum gefunden. Es zeigte sich, dass die Dichtewerte im DECT umso niedriger sind, je höher der Raman-Faktor für Keratin eines Konkrements ist. Da sich die Raman-Faktoren, wie bereits erwähnt, gegenseitig bedingen, waren die DECT-Dichtewerte hingegen umso höher, je höher der Raman-Faktor eines Konkrements für Carbonatapatit war. Dies weist darauf hin, dass es bei zunehmendem organischem Anteil an der Gesamtzusammensetzung eines Konkrements zu einer Abnahme der Dichtewerte im DECT-Bild kommt bzw. dass die DECT-Dichtewerte mit zunehmendem anorganischem Anteil steigen.

Auch zwischen der aus Volumen und Gewicht berechneten Dichte ρ der Steine und den Dichtewerten im DECT konnte eine signifikante Korrelation beobachtet werden. Bei einem Harnstein gegebener Zusammensetzung hängt die Abschwächung der Röntgenstrahlung linear von der Dichte ρ des Steins ab, welche mit der Porosität variiert.

Da vorhandene Poren bei Harnsteinen *in vivo* mit Urin gefüllt sind, ergibt sich für besonders poröse Steine im CT-Bild eine Abschwächung der Röntgenstrahlung ähnlich der von Urin und damit eine niedrige CT-Zahl (Primak *et al.*, 2011). Die Konkreme der vorliegenden Studie wurden in Kochsalzlösung gelagert. Möglich wäre beispielsweise, dass einige Konkreme poröser waren als andere, wodurch sich in deren Poren bei Durchführung der Dual Energy Computertomographie insgesamt mehr Flüssigkeit befand. Da Wasser eine CT-Zahl von Null hat, hätten poröse Steine dadurch einen niedrigeren Dichtewert im DECT als kompakte Steine.

In der farbkodierten Darstellung wurden die nach den Ergebnissen der IR-Spektroskopie hauptsächlich aus Carbonatapatit bestehenden Konkreme einheitlich blau dargestellt. Dies entspricht der Kodierung für calcifizierte Strukturen. Allerdings ist der verwendete DE-Algorithmus dahingehend limitiert, dass nicht zwischen verschiedenartigen calciumhaltigen Konkremen unterschieden werden kann, so dass nicht ersichtlich wird, ob ein Konkremet beispielsweise zusätzlich Struvit oder Weddellit enthält. Bei dem wahrscheinlich komplett aus organischen Bestandteilen bestehenden Konkremet waren in der farbkodierten Darstellung rote Pixel zu erkennen. Dies entspricht der Kodierung des verwendeten Algorithmus für Harnsäure oder Strukturen mit ähnlich niedriger effektiver Ordnungszahl (Primak *et al.*, 2011).

Mithilfe des Dual Energy CT-Verfahrens gelang in der vorliegenden Studie die Differenzierung zwischen calcifizierten Speichelsteinen und einem höchstwahrscheinlich nur aus organischen Stoffen bestehenden Konkremet. Allerdings erscheint der Nutzen dieser Methode bei der Diagnostik von Speichelsteinen fraglich, da es sich bei diesen bezüglich der chemischen Zusammensetzung im Gegensatz zu Harnsteinen insgesamt um eine relativ homogene Gruppe zu handeln scheint. Auch konnte kein Zusammenhang zwischen der Ablationsrate bzw. Zertrümmerungsart durch den Holmium:YAG-Laser und den DECT-Dichtewerten gefunden werden, so dass eine therapeutische Konsequenz nicht gegeben ist.

5.4 Eignung des Holmium:YAG-Lasers für die Speichelstein-Lithotripsie

Die endoskopische Laserlithotripsie hat die Entfernung urologischer Steine revolutioniert. Seit Einführung dieser Behandlungsmethode in den 1980er Jahren ist bei einer Urolithiasis nur noch in seltenen Fällen ein offener chirurgischer Eingriff nötig (Gautier *et al.*, 1990). Die Tatsache, dass dieses Verfahren eine Steinentfernung ohne Eröffnung oder Entfernung des betreffenden Organs ermöglicht, macht es auch für die Behandlung

der Sialolithiasis attraktiv. Hierfür wurde die endoskopisch kontrollierte Laserlithotripsie erstmals in den 1990er Jahren eingesetzt. Die ersten Versuche wurden von Königsberger *et al.* und Gundlach *et al.* mit einem gepulsten Excimerlaser durchgeführt und hatten eine Erfolgsrate im Sinne einer Steinfreiheit von über 90 Prozent (Königsberger *et al.*, 1990, Gundlach *et al.*, 1990). Es folgten Versuche mit dem Pulsed Dye- und dem CO₂-Laser, wobei Erfolgsraten von 68 Prozent bzw. 91 Prozent erzielt werden konnten. Die Behandlung mit den genannten Lasertypen war jedoch zum Teil sehr zeitaufwändig und mit einem hohen Risiko der Gewebeschädigung verbunden, so dass diese keine weitere Anwendung fanden (McGurk *et al.*, 1994, Ito *et al.*, 1996, Arzoz *et al.*, 1996). Basierend auf den guten Erfahrungen aus der Urologie wurden in den 2000er Jahren der Erbium:YAG-Laser und der Holmium:YAG-Laser erstmals für die Anwendung bei Sialolithiasis getestet (Marchal *et al.*, 2001, Raif *et al.*, 2006, Siedek *et al.*, 2008). Beim Erbium:YAG-Laser konnte zwar keine Gewebeschädigung beobachtet werden, allerdings betrug die Erfolgsrate im Sinne einer kompletten Steinfragmentierung nur 57 Prozent. Zudem gestaltete sich die endoskopische Weiterleitung der Erbium:YAG-Laserstrahlung als technisch schwierig (Raif *et al.*, 2006). Der Holmium:YAG-Laser wurde zur interventionellen Sialendoskopie erstmals 2001 von Marchal *et al.* verwendet. In vier Fünftel der Fälle konnte dabei eine komplette Befreiung des Speichelgangsystems von Sialolithen erreicht werden (Marchal *et al.*, 2001). Siedek *et al.* verglichen in einer *Ex-vivo*-Studie einen Holmium:YAG-Laser mit einem FREDDY-Laser. Der FREDDY-Laser zeigte hierbei insgesamt signifikant höhere Ablationsraten, allerdings misslang die Lithotripsie bei zwei von acht Steinen. Zudem bestand durch die explosionsartige Zertrümmerung der Steine in relativ große Fragmente das Risiko einer Gewebläsion. Der Holmium:YAG-Laser zeigte niedrigere Fragmentierungsraten als der FREDDY-Laser, es konnten jedoch alle sieben Versuchssteine erfolgreich zertrümmert werden. Die Steine wurden hierbei auf sanfte Weise zu Staub und kleineren Fragmenten zermahlen (Siedek *et al.*, 2008). 2013 testeten Martellucci *et al.* einen Holmium:YAG-Laser im Rahmen einer klinischen Studie an 16 Sialolithiasis-Patienten. Die Fragmentierung der Steine war hier in allen Fällen, bei geringer Komplikationsrate möglich (Martellucci *et al.*, 2013). Ähnlich gute Ergebnisse bei der sialendoskopisch gesteuerten intrakorporalen Lithotripsie konnten von Durbec *et al.* mit einem Thulium:YAG-Laser erzielt werden, allerdings kam es hierbei in 12,7 Prozent der Fälle zu Perforationen des Speichelgangs. Zudem handelte es sich hierbei mit einer durchschnittlich benötigten Zeit von 69 Minuten um eine relativ zeitaufwändige Prozedur (Durbec *et al.*, 2012).

Bei großen oder tief im Speichelgangsystem lokalisierten Speichelsteinen konnte die

Erfolgsrate bei der Extraktion durch Nutzung eines Holmium:YAG-Lasers von 35 Prozent auf 90 Prozent verbessert werden (Durbec *et al.*, 2012, Marchal *et al.*, 2001, Siedek *et al.*, 2008, Martellucci *et al.*, 2013). Mit der Aussicht auf eine mögliche routinemäßige Anwendung dieses Lasertyps bei der Behandlung von Sialolithiasis-Patienten wurden im Rahmen der vorliegenden Studie die Wirkungsweise und Effizienz dieses Lasertyps bei der *Ex-vivo*-Fragmentierung von 47 Speichelsteinen untersucht. Dafür wurden die Konkreme in drei Gruppen eingeteilt und mit drei unterschiedlichen Pulsenergien zertrümmert. Dabei gelang die Zertrümmerung aller Konkreme. Da der maximale Durchmesser der Hauptausführungsgänge 2 bis 3 mm beträgt, dürfen die entstehenden Fragmente für eine endoskopische Entfernung diesen Durchmesser nicht überschreiten (Siedek *et al.*, 2008). Wie die Ergebnisse dieser Studie zeigen, ist es mit dem Holmium:YAG-Laser problemlos möglich, derartige Fragmentgrößen zu erreichen: die bei der *Ex-vivo*-Lithotripsie anfallenden Fragmente hatten eine Größe von maximal < 1,5 mm, ein Großteil der Steinmasse wurde pulverisiert. Um zu untersuchen, bei welcher genutzten Pulsenergie die Fragmentierung am effizientesten möglich ist, wurden die Ablationsraten je Puls und die zeitabhängigen Ablationsraten verglichen. Bei einer Pulsenergie von 500 mJ/Puls war die pulsabhängige Ablationsrate mit 0,2 mg pro Puls signifikant geringer als bei 1000 mJ/Puls und 1500 mJ/Puls. Hier wurden pulsabhängige Ablationsraten von 0,4 mg pro Puls bzw. 0,5 mg pro Puls erzielt. Auch bei den zeitabhängigen Ablationsraten war der durchschnittliche Abtrag pro Minute bei 1000 und 1500 mJ/Puls mit 74,4 mg pro Minute bzw. 87,0 mg pro Minute signifikant größer als bei 500 mJ/Puls mit 36,6 mg pro Minute. Allerdings bestand sowohl bei der Ablationsrate pro Puls als auch bei der Ablationsrate pro Zeit kein signifikanter Unterschied zwischen 1000 und 1500 mJ/Puls. Bezüglich der Effizienz des Lasers bei der Speichelstein-Lithotripsie scheint es also sinnvoll zu sein, die Konkreme mit einer Pulsenergie von 1000 mJ/Puls zu fragmentieren, da bei dieser Pulsenergie gegenüber 500 mJ/Puls ein signifikant höherer Abtrag sowohl pro Einzelpuls als auch pro Zeiteinheit erzielt werden konnte. Eine weitere Erhöhung der Pulsenergie auf 1500 mJ/Puls erscheint dagegen wenig sinnvoll, da hierbei keine signifikante Steigerung der Abtragsleistung gegenüber einer Pulsenergie von 1000 mJ/Puls zu beobachten war. Zudem konnte beobachtet werden, dass bei einer Energie von 1500 mJ/Puls trotz höherer Ablationsraten tendenziell mehr Pulse und eine längere Laserlaufzeit für die Zertrümmerung nötig waren als bei 1000 mJ/Puls und 500 mJ/Puls. Dies könnte mit der relativ starken Repulsion der Konkreme bei Applikation dieser Pulsenergie zusammenhängen. Möglicherweise zeigten dabei einige Pulse keine Wirkung, da durch den starken Rückstoß kein naher Kontakt zum Stein hergestellt werden konnte und die Laserenergie durch die Absorption im Wasser keine

Wirkung mehr an der Steinoberfläche entfalten konnte. Auch bei Anwendung des Holmium:YAG-Laser für die Harnstein-Lithotripsie konnte beobachtet werden, dass die Repulsion mit der verwendeten Energie zunimmt (Lee *et al.*, 2003). Bezüglich der Zertrümmerungsart der Konkremente konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Pulsenergien gefunden werden. Jedoch führten zum einen die stärkere Repulsion der Fragmente und zum anderen eine stärkere Staubentwicklung mit daraus resultierender Sichtbehinderung dazu, dass die Zertrümmerung durch die Behandler tendenziell als umso komplizierter bewertet wurde, je höher die genutzte Laserenergie war.

Für die Beurteilung, welche Pulsenergie sinnvollerweise bei der Lithotripsie von Speichelsteinen zum Einsatz kommen sollte, müssen jedoch neben der Effizienz auch immer eventuelle Nebenwirkungen der Laserenergie, besonders am Weichgewebe, berücksichtigt werden. Hierfür wurde untersucht, inwiefern sich eine direkte Applikation von Laserpulsen mit den drei verschiedenen Pulsenergien histologisch an Speichelganggewebe bemerkbar macht. Wurden Laserpulse mit einer Energie von 500 mJ/Puls auf das Gewebe appliziert, konnten weder in einer Schnitttiefe von 30 bis 50 μm noch in einer Tiefe von 50 bis 70 μm Zeichen einer Gewebeschädigung gefunden werden. Wurden Laserpulse mit einer Pulsenergie von 1000 mJ/Puls appliziert, konnten Läsionen in einer Tiefe von 30 bis 50 μm gefunden werden, die jedoch in einer Tiefe von 50 bis 70 μm kaum noch nachweisbar waren. Dahingegen waren die durch eine Pulsenergie von 1500 mJ/Puls hervorgerufenen Gewebläsionen sowohl bei 30 bis 50 μm als auch bei 50 bis 70 μm Schnitttiefe deutlich zu erkennen. Die Epitheldicke im Bereich des Mundbodens beträgt ungefähr 100 μm (Prestin *et al.*, 2012). Nimmt man eine ähnliche Epitheldicke für das Speichelganggewebe an, so befinden sich die durch eine Applikation von Laserpulsen mit einer Energie von 1000 mJ/Puls hervorgerufenen Läsionen noch intraepithelial. Da bei einer applizierten Pulsenergie von 1500 mJ/Puls der Durchmesser der Läsionen in der Schnittebene von 50 bis 70 μm jedoch noch relativ groß war, kann man davon ausgehen, dass der entstandene Gewebeschaden bei Nutzung dieser Energie weit über 70 μm hinausgeht und damit eventuell bis in die *Lamina propria* hineinreicht. Hinsichtlich eventueller Nebenwirkungen scheint demnach bei einer Pulsenergie von 500 mJ/Puls das geringste Risiko einer iatrogenen Gewebläsion während der Lithotripsie zu bestehen. Dahingegen scheint bei genutzten Pulsenergien von 1000 und 1500 mJ/Puls die Gefahr größer zu sein, das an den Sialolith angrenzende Gewebe im Rahmen der Fragmentierung desselben zu schädigen. Obwohl das Risiko einer Speichelgangverletzung durch die Wahl einer niedrigeren Pulsenergie möglicherweise beeinflusst werden kann, ist es in jedem Fall unabdingbar, dass die sialendoskopisch gesteuerte Laserlithotripsie unter strikter

Zielführung auf den Stein und kontinuierlicher Spülung des Speichelgangs durchgeführt wird, um jegliche Schädigung des Gewebes durch den Laser oder durch wegspringende Steinfragmente zu verhindern. Dies ist wichtig, da thermische oder mechanische Schäden an Lumina im Rahmen der Wundheilung zu Strikturen führen können (Strutz *et Mann*, 2010, Hu *et al.*, 2014). Auch die interventionelle Sialendoskopie birgt die Gefahr einer Verletzung bzw. Perforation des Speichelgangs mit dem Risiko einer späteren Stenose. Die Manövrierung des Endoskops im Speichelgang ist technisch anspruchsvoll und erfordert daher viel Erfahrung (Marchal *et al.*, 2001). Um das Risiko einer Speichelgangläsion durch mangelhafte Technik bei der Laserlithotripsie zu minimieren, könnte man beispielsweise ein *Wetlab*-Training anbieten, in dem HNO-Ärzte sich mit der Funktionsweise und lithotriptischen Anwendung des Lasers vertraut machen können. In der vorliegenden Studie konnte beobachtet werden, dass sich Training auf diesem Gebiet auch signifikant auf die erzielte Fragmentierungsrate auswirkt. Ein Teil der Konkreme wurde durch einen Lithotripsie-erfahrenen Behandler zertrümmert, ein Teil durch einen ungeübten Behandler. Dabei war die Fragmentierungsrate bei dem geübten Behandler mit 0,6 mg/J etwa dreimal so hoch wie bei dem unerfahrenen Behandler mit 0,2 mg/J. Dies ist eine auch unter ökonomischen Gesichtspunkten interessante Beobachtung, da durch vorheriges Training mit dem Laser möglicherweise auch intraoperativ die für den Eingriff benötigte Zeit verkürzt werden kann. Im Rahmen eines solchen Trainings könnte beispielsweise auch die Anwendung der fluoreszenzgestützten Detektion von Sialolithen demonstriert werden.

Zwischen der spektroskopisch bestimmten Zusammensetzung der Konkreme und den Fragmentierungsraten durch den Holmium:YAG-Laser konnte kein Zusammenhang beobachtet werden. Dies deckt sich mit der Beobachtung von Siedek *et al.*, welche ebenfalls keine Korrelation zwischen der Komposition von Sialolithen und den Ablationsraten durch einen Holmium:YAG-Laser finden konnten (Siedek *et al.*, 2008). Die Fähigkeit des Holmium:YAG-Lasers, Steine jeglicher Zusammensetzung problemlos fragmentieren zu können, wurde bereits im Rahmen von Versuchen an Harnsteinen beschrieben und ist unter anderem für die Beliebtheit dieses Lasertyps im urologischen Bereich verantwortlich (Grasso, 1996). Zwischen dem Fluoreszenzverhalten der Konkreme unter UV-Licht und den Ablationsraten durch den Laser konnte ebenfalls kein Zusammenhang festgestellt werden. Bei grün fluoreszierenden Konkrementen wurden jedoch tendenziell etwas höhere Ablationsraten erzielt als bei rot fluoreszierenden Konkrementen. Möglicherweise spielte hierbei der vermutete höhere Proteinanteil bei grün fluoreszierenden Konkrementen eine Rolle. Hinsichtlich der Dichte als mutmaßlich

den Lithotripsieerfolg beeinflussender Parameter bestand kein signifikanter Unterschied zwischen rot und grün fluoreszierenden Konkrementen. Auch zeigte sich kein Zusammenhang dieses Parameters mit der spektroskopisch bestimmten Zusammensetzung der Konkreme. Allerdings handelte es sich bei der für die Berechnung der Dichte angewandten Volumenbestimmung per Wasserverdrängung um eine relativ ungenaue Methode. Möglicherweise wären hierbei mit einer exakteren Messmethode Dichteunterschiede zwischen unterschiedlich fluoreszierenden bzw. unterschiedlich zusammengesetzten Konkrementen zu beobachten gewesen. In der vorliegenden Studie konnte allerdings kein Zusammenhang zwischen der berechneten Dichte der Konkreme und den Ablationsraten durch den Holmium:YAG-Laser beobachtet werden. Hierbei muss jedoch berücksichtigt werden, dass die im Rahmen dieser Studie genutzte niedrigste Pulsenergie 500 mJ/Puls betrug. Es ist in Erwägung zu ziehen, dass sich bei Applikation niedrigerer Pulsenergien möglicherweise sowohl die Dichte, als auch die Zusammensetzung von Speichelsteinen auf die Fragmentierungsraten auswirken. Zwischen der dokumentierten Zertrümmerungsart und der Zusammensetzung, der Dichte sowie der Fluoreszenz der Konkreme konnte kein Zusammenhang gefunden werden. Ob es bei der Laserlithotripsie zu einer starken Staubentwicklung oder verstärkter Repulsion von Steinfragmenten kommt, scheint also unabhängig davon zu sein, aus welchen Substanzen ein Speichelstein besteht. Auch scheinen sich Dichte und Fluoreszenzverhalten von Sialolithen nicht auf die beobachtete Art der Zertrümmerung auszuwirken.

Mit dem Holmium:YAG-Laser war also bei den im Rahmen dieser Studie genutzten Pulsenergien die Lithotripsie von Speichelsteinen unabhängig von deren Komposition, Dichte und optischen Eigenschaften möglich. Auch beeinflussten diese Merkmale die beobachtete Zertrümmerungsart nicht. Dies bedeutet, dass seitens des durchführenden Behandlers keine Anpassung der Pulsenergie an eventuelle steinspezifische Eigenschaften nötig ist. Unter Berücksichtigung sowohl der Effizienz als auch eventueller Nebenwirkungen scheint bei der Fragmentierung von Speichelsteinen mit dem Holmium:YAG-Laser eine Pulsenergie von 1000 mJ/Puls die beste Wahl zu sein. Damit war im Rahmen dieser *Ex-vivo*-Studie eine effektive Lithotripsie bei gleichzeitig geringen beobachtbaren Nebenwirkungen am Speichelganggewebe möglich. Bei einer Pulsenergie von 500 mJ/Puls konnten zwar keinerlei Nebenwirkungen am Gewebe entdeckt werden, allerdings waren bei dieser Laserenergie die Fragmentierungsraten signifikant geringer als bei 1000 mJ/Puls. Ein hoher Grad an Effektivität ist jedoch Voraussetzung für die Anwendung der endoskopisch kontrollierten Laserlithotripsie bei Sialolithiasis, um

wiederum durch langdauernde mechanische Manipulation am Speichelgang entstehende negative Effekte zu vermeiden (Siedek *et al.*, 2008). Die Fragmentierungsraten bei einer Pulsenergie von 1500 mJ/Puls waren zwar insgesamt etwas höher als bei 1000 mJ/Puls, allerdings waren auch die durch diese Laserenergie hervorgerufenen Läsionen am Gewebe histologisch ausgedehnter. Des Weiteren konnte bei dieser Pulsenergie der Trend zu einer stärkeren Repulsion sowie Staubentwicklung bei der Zertrümmerung beobachtet werden. Dies wirkt sich möglicherweise erschwerend auf die Positionierung der Laserfaser vor dem Konkrement aus, was wiederum zu einer Verlängerung des Eingriffs führen könnte.

6 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden *Ex-vivo*-Studie wurde untersucht bei welchen Lasereinstellungen eine effiziente und zugleich nebenwirkungsarme Fragmentierung von Speichelsteinen mit dem Holmium:YAG-Laser möglich ist. Zudem sollte geklärt werden, inwiefern Parameter wie die Steinzusammensetzung oder die Erfahrung des Behandlers auf dem Gebiet der Laserlithotripsie die Fragmentierungsraten beeinflussen. Die Konkremente wurden im Hinblick auf die jeweilig genutzte Laserpulsenergie auf drei Gruppen aufgeteilt (500 mJ/Puls, 1000 mJ/Puls, 1500 mJ/Puls). Die Fragmentierung erfolgte durch zwei Behandler mit unterschiedlicher Lithotripsieerfahrung. Laserpulse mit den drei verschiedenen Pulsenergien wurden auch auf Speichelganggewebe appliziert, welches im Anschluss histologisch untersucht wurde. Für die Analyse ihrer Zusammensetzung wurden die Speichelsteine Fluoreszenz-, Raman- sowie Infrarot-spektroskopischen Messungen unterzogen. Zusätzlich wurden die Konkremente im Dual Energy CT gescannt. Die Raman- und Infrarot-spektroskopischen Messungen ergaben für nahezu alle Konkremente eine Komposition vorwiegend aus Calcium und Phosphat in Form von Carbonatapatit, während ein Konkrement aus nicht näher zu definierendem organischem Material zu bestehen schien. Diese Ergebnisse konnten mithilfe der Dual Energy Computertomographie bestätigt werden, wo sich das aus organischem Material bestehende Konkrement bezüglich der gemessenen Dichtewerte und der Farbkodierung im DECT-Bild von den calcifizierten Konkrementen unterschied. Mithilfe fluoreszenzdiagnostischer Methoden konnte zwischen rot und grün fluoreszierenden Konkrementen unterschieden werden, wobei hierbei kein Zusammenhang zu der spektroskopisch ermittelten Zusammensetzung der Konkremente hergestellt werden konnte. Mit dem Holmium:YAG-Laser war mithilfe der im Rahmen dieser Versuche genutzten Pulsenergien die Lithotripsie aller Speichelsteine unabhängig von deren Zusammensetzung problemlos durchführbar. Es konnte jedoch eine Abhängigkeit der Fragmentierungsraten von der genutzten Pulsenergie festgestellt werden: die mit Pulsenergien von 1000 mJ/Puls und 1500 mJ/Puls erzielten Fragmentierungsraten waren etwa doppelt so hoch wie die mit einer Pulsenergie von 500 mJ/Puls erzielten Fragmentierungsraten. Auch schien die Lithotripsieerfahrung der Behandler eine wichtige Rolle zu spielen: der erfahrene Behandler erzielte signifikant höhere Ablationsraten als der ungeübte Behandler. Die am Speichelganggewebe nach Applikation von Laserenergie beobachteten thermischen Schäden betrafen mit zunehmender Pulsenergie immer tiefere Gewebeareale. Bei Erhöhung der Pulsenergie kam es im Zuge der Fragmentierung zudem

vermehrt zu unerwünschten Effekten wie Repulsion kleinerer Fragmente und stärkerer Staubentwicklung.

Im Hinblick auf die klinische Anwendung des Holmium:YAG-Lasers kann aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Studie für die Fragmentierung von Speichelsteinen eine Pulsenergie von 1000 mJ/Puls empfohlen werden.

7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

7.1 Abbildungen

Abbildung 1: Häufigkeit und Lokalisation von Steinen in der Glandula submandibularis.....	1
Abbildung 2: Häufigkeit und Lokalisation von Steinen in der Glandula parotis.....	2
Abbildung 3: Therapiealgorithmus für die Glandula submandibularis.....	5
Abbildung 4: Therapiealgorithmus für die Glandula parotis.....	6
Abbildung 5: Sialendoskopisch kontrollierte Laserlithotripsie eines Speichelsteins mit Körbchenextraktion der Fragmente.....	8
Abbildung 6: Speichelstein mit/ohne optischen Filter fotografiert.....	16
Abbildung 7: Schematischer Aufbau eines Spektralfluorometers.....	17
Abbildung 8: Schematische Darstellung eines Dual Energy CT.....	18
Abbildung 9: Schematischer Aufbau eines Lasers.....	20
Abbildung 10: Konkrement im Drahtkorbchen.....	21
Abbildung 11: Unterwasser-Versuchsaufbau.....	21
Abbildung 12: Experimenteller Aufbau.....	22
Abbildung 13: Übertragung der Lithotripsie über die Endoskopkamera auf den Monitor.....	23
Abbildung 14: Schematische Darstellung der In-Vitro Laserlithotripsie eines Speichelsteins.....	23
Abbildung 15: Schematischer Aufbau eines FT-Raman-Moduls.....	25
Abbildung 16: Schematischer Aufbau eines FT-IR-Spektrometers.....	27
Abbildung 17: Aufgespannte Gewebeprobe vom Speichelgang der Glandula submandibularis.....	28
Abbildung 18: Schematische Darstellung des histologischen Präparates.....	28
Abbildung 19: Beispiel für ein grün-gelb fluoreszierendes Konkrement.....	30
Abbildung 20: Beispiel für ein rot fluoreszierendes Konkrement.....	30
Abbildung 21: 3D-Darstellung der EEM eines grün fluoreszierenden Konkrements.....	31
Abbildung 22: 3D-Darstellung der EEM eines rot fluoreszierenden Konkrements.....	31

Abbildung 23: DECT-Dichtewerte (in Hounsfield units) bei den Röhrensparnungen 80 und 140 kV sowie DE-Index der Konkremeate.....	32
Abbildung 24: 3-D-rekonstruiertes, farbkodiertes Topogramm der ersten Aufnahmeserie.....	33
Abbildung 25: Farbkodiertes Dual Energy Schnittbild, basierend auf dem DE-Index der Steine.....	33
Abbildung 26: Ablationsrate pro Puls (in mg/Puls) in Abhängigkeit der Pulsenergie.....	35
Abbildung 27: Ablationsrate pro Laserlaufzeit (in mg/min) in Abhängigkeit der Pulsenergie.....	36
Abbildung 28: Zertrümmerungsart der Konkremeate in Abhängigkeit der genutzten Pulsenergie.....	37
Abbildung 29: Ablationsrate pro Energie (in mg/J) in Abhängigkeit vom Behandler.....	38
Abbildung 30: Charakteristisches Raman-Spektrum einer Probe.....	39
Abbildung 31: Datenbankspektrum von Carbonatapatit.....	39
Abbildung 32: Ergebnis der Datenbanksuche für den Spektrenbereich von 3500 bis 1150 cm^{-1} und 350 bis 200 cm^{-1}	39
Abbildung 33: Überlagerung der Datenbank-Spektren von Carbonatapatit (rot) und Keratin (grün) mit einem gemessenen Spektrum (blau).....	40
Abbildung 34: Spektrum einer Probe ohne charakteristischen peak für Carbonatapatit.....	41
Abbildung 35: Beispielhaftes Infrarot-Spektrum einer Probe, bei welcher die Komponenten Carbonatapatit und Weddellit nachgewiesen werden konnten.....	42
Abbildung 36: Infrarot-Spektrum einer Probe, bei welcher Carbonatapatit und Struvit als Bestandteile gefunden wurden.....	42
Abbildung 37: Infrarot-Spektrum einer Probe, welcher keine mineralischen Bestandteile zugeordnet werden konnten.....	43
Abbildung 38: Zusammenhang zwischen Raman-Faktoren der Konkremeate und DECT-Werten (in Hounsfield units) bei 80 kV.....	44
Abbildung 39: Zusammenhang zwischen Raman-Faktoren der Konkremeate und DECT-Werten (in Hounsfield units) bei 140 kV.....	45
Abbildung 40: Zusammenhang zwischen DECT-Werten bei 80 kV (in Hounsfield	

units) und Dichte ρ (in g/cm ³) der Konkreme.....	46
Abbildung 41: Zusammenhang zwischen DECT-Werten bei 140 kV (in Hounsfield units) und Dichte ρ (in g/cm ³) der Konkreme.....	46
Abbildung 42: Zusammenhang zwischen Raman-Faktoren und Dichte ρ (in g/cm ³) der Konkreme.....	47
Abbildung 43: Zusammenhang zwischen der Höhe der Raman-Faktoren für Carbonatapatit und prozentualem Carbonatapatit-Anteil der Konkreme in der FTIR-Spektroskopie.....	47
Abbildung 44: Zusammenhang zwischen Raman-Faktoren der Konkreme und Ablationsrate pro Energie (in mg/J).....	48
Abbildung 45: Zusammenhang zwischen Dichte ρ (in g/cm ³) der Konkreme und Ablationsrate pro Energie (in mg/J).....	49
Abbildung 46: Zusammenhang zwischen DECT-Werten (in Hounsfield units) der Konkreme bei 80 kV und Ablationsrate pro Energie (in mg/J).....	49
Abbildung 47: Zusammenhang zwischen DECT-Werten (in Hounsfield units) der Konkreme bei 140 kV und Ablationsrate pro Energie (in mg/J).....	49
Abbildung 48: Schnittebene in 30 bis 50 μ m Tiefe.....	52
Abbildung 49: Schnittebene in 50 bis 70 μ m Tiefe.....	52

7.2 Tabellen

Tabelle 1: Publierte klinische und experimentelle Daten für die Laserlithotripsie bei Sialolithiasis.....	9
Tabelle 2: Dichte ρ der Konkreme in den drei Behandlungsgruppen.....	34
Tabelle 3: Ergebnisse der Laserlithotripsie in Abhängigkeit der verwendeten Pulsenergie.....	35
Tabelle 4: Dichte ρ der Konkreme in den zwei Behandlungsgruppen.....	37
Tabelle 5: Zusammenhang zwischen Fluoreszenz und Raman-Faktoren der Konkreme.....	43
Tabelle 6: Zusammenhang zwischen Fluoreszenz der Konkreme und	

Ergebnissen der IR-Spektroskopie.....	44
Tabelle 7: Zusammenhang zwischen Fluoreszenz und berechneter Dichte ρ der Konkreme nte.....	44
Tabelle 8: Zusammenhang zwischen DECT-Werten und Ergebnissen der FTIR- Spektroskopie.....	45
Tabelle 9: Zusammenhang zwischen berechneter Dichte ρ der Konkreme nte und Ergebnissen der IR-Spektroskopie.....	46
Tabelle 10: Zusammenhang zwischen Ablationsrate pro Energie und Fluoreszenz der Konkreme nte.....	48
Tabelle 11: Zusammenhang zwischen Ablationsrate pro Energie und Ergebnissen der IR-Spektroskopie.....	48
Tabelle 12: Zusammenhang zwischen beobachteter Zertrümmerungsart und Fluoreszenz der Konkreme nte.....	50
Tabelle 13: Zusammenhang zwischen beobachteter Zertrümmerungsart und DECT-Dichtewerten der Konkreme nte bei 80 und 140 kV.....	50
Tabelle 14: Zusammenhang zwischen beobachteter Zertrümmerungsart und berechneter Dichte ρ der Konkreme nte.....	50
Tabelle 15: Zusammenhang zwischen beobachteter Zertrümmerungsart und Raman-Faktoren der Konkreme nte.....	51
Tabelle 16: Zusammenhang zwischen beobachteter Zertrümmerungsart und Ergebnissen der IR-Spektroskopie.....	51

8 Abkürzungsverzeichnis

10-to	10 Tonnen	H ₂ O	chemische Summenformel des Wassermoleküls
3D	dreidimensional	HE	Hämatoxylin-Eosin
a.u.	<i>arbitrary unit</i>	Holmium: YAG	Holmium-Yttrium- Aluminium-Granat
C	Kohlenstoff	HU	<i>Hounsfield units</i>
cm	Zentimeter	Hz	Hertz
cm ⁻¹	Einheit der Wellenzahl	IR	Infrarot
cps	<i>counts per second</i>	J	Joule
CT	Computer- tomographie	KBr	Kaliumbromid
DE-	Dual Energy-	kV	Kilovolt
DECT	Dual Energy Computer- tomographie	L	Laserlaufzeit
dest	destilliert	LWL	Lichtwellenleiter
DNS	Desoxyribo- nukleinsäure	m	Masse
E	Energie	mAs	Milliamperesekunde
EEM	<i>excitation-emission matrix</i>	min	Minuten
Erbium:YAG	Erbium-Yttrium- Aluminium-Granat	mJ	Millijoule
ESWL	Extrakorporale Stoßwellenlitho- tripsie	ml	Milliliter
et al.	et alii (und andere)	mm	Millimeter
FREDDY	frequency-doubled double-pulse Neodym-Yttrium- Aluminium-Granat	MW	Mittelwert
G	gelblich	N	Stickstoff
g	Gramm	n	Anzahl
ges	gesamt	NaCl	Natriumchlorid
H	Wasserstoff	Nd:YAG	Neodym-Yttrium- Aluminium-Granat

nm	Nanometer
O	Sauerstoff
P	Pulse
p	Signifikanzwert
pal	<i>phase alternating line</i>
PC	<i>Personal Computer</i>
pH-Wert	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ - Ionenkonzentration
r	Korrelationskoeffizient nach Pearson
ROI	<i>region of interest</i>
SD	<i>standard deviation</i>
SL	Schaub Lorenz
UV	ultraviolett
V	Volt
W	Watt
Z	Ablationsrate
λ	Wellenlänge
μ s	Mikrosekunde
ρ	Massendichte

9 Literaturverzeichnis

Alfano RR, Yao SS: Human teeth with and without dental caries studied by visible luminescent spectroscopy. *J Dent Res* 1981, 60 (2): 120-122

Anneroth G, Eneroth CM, Isacsson G: Morphology of salivary calculi. The distribution of the inorganic component. *J Oral Pathol* 1975, 4 (5): 257-265

Arens C, Reussner D, Woenkhaus J, Leunig A, Betz CS, Glanz H: Indirect fluorescence laryngoscopy in the diagnosis of precancerous and cancerous laryngeal lesions. *Eur Arch Otolaryngol* 2007, 264 (6): 621-626

Arzoz E, Santiago A, Esnal F, Palomero R: Endoscopic intracorporeal lithotripsy for sialolithiasis. *J Oral Maxillofac Surg* 1996, 54 (7): 847-850

Berry RL: Sialadenitis and Sialolithiasis: Diagnosis and management. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am* 1995, 7 (3): 479-503

Buchalla W, Lennon AM, Attin T: Fluorescence spectroscopy of dental calculus. *J Periodontal Res* 2004, 39 (5): 327-332

Burstein LS, Boskey AL, Tannenbaum PJ, Posner AS, Mandel ID: The crystal chemistry of submandibular and parotid salivary gland stones. *J Oral Pathol* 1979, 8: 284-291

Chan KF, Vassar GJ, Pfefer TJ, Teichman JM, Glickman RD, Weintraub ST, Welch AJ: Holmium:YAG laser lithotripsy: A dominant photothermal ablative mechanism with chemical decomposition of urinary calculi. *Lasers Surg Med* 1999, 25 (1): 22-37

Chiu Y, Huang YY, Chen PA, Lu SH, Chiu AW, Chiang HK: Quantitative and multicomponent analysis of prevalent urinary calculi using Raman spectroscopy. *J Raman Spectrosc* 2012, 43 (8): 992-997

Durbec M, Dinkel E, Vigier S, Disant F, Marchal F, Faure F: Thulium:YAG laser sialendoscopy for parotid and submandibular sialolithiasis. *Lasers Surg Med* 2012, 44 (10): 783-786

Dushinski JW, Lingeman JE,: Urologic applications of the Holmium laser. *Tech Urol* 1997, 3 (2): 60-64

Escudier MP, McGurk M: Symptomatic sialoadenitis and sialolithiasis in the English population, an estimate of the cost of hospital treatment. *Br Dent J* 1999, 186 (9): 463-466

Finley DS, Petersen J, Abdelshehid C, Ahlering M, Chou D, Borin J, Eichel L, McDougall E, v. Clayman R: Effect of Holmium:YAG Laser Pulse Width on Lithotripsy Retropulsion in Vitro. *J Endourol* 2005, 19 (8): 1041-1044

Frame JW, Smith AJ: Large calculi of the submandibular salivary glands. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1968, 15: 769-771

Gautier JR, Leandri P, Rossignol G, Caissel J, Quintens H: Pulsed dye laser in the treatment of 325 calculi of the urinary tract. *Eur Urol* 1990, 18: 6-9

Graser A, Johnson TR, Bader M, Staehler M, Haseke N, Nikolaou K, Reiser MF, Stief CG, Becker CR: Dual energy CT characterization of urinary calculi: initial in vitro and clinical experience. *Invest Radiol* 2008, 43 (2): 112-119

Grases F, Satiago C, Simonet BM, Costa-Bauza A: Sialolithiasis: mechanism of calculi formation and etiologic factor. *Clin Chim Acta* 2003, 334 (1-2): 131-136

Grasso M: Experience with the holmium laser as an endoscopic lithotrite. *Urology* 1996, 48 (2): 199-206

Grevers G, Baumgartner R, Leunig A: Laser im Kopf-Hals Bereich. *Springer Berlin Heidelberg* 2001: 1-4

Gundlach P, Scherer H, Hopf J, Leege N, Muller G, Hirst L, Scholz C: Endoscopic-controlled laser lithotripsy of salivary calculi: In vitro studies and initial clinical use. *HNO* 1990, 38 (7): 247-250

Harrison JD, Epivatianos A, Bhatia SN: Role of microliths in the aetiology of chronic submandibular sialadenitis: a clinicopathological investigation of 154 cases. *Histopathology* 1997, 31 (3): 237-251

Hautmann R: What's new in urology. *Urologe A* 1986, 25 (6): 305-314

Hesse A, Sanders G: Infrarotspektren-Atlas zur Harnsteinanalyse. *Thieme Stuttgart New York* 1988: 3-20

Hesse M, Meier H, Zeeh B: Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie. *Thieme Stuttgart New York* 2002, 6: 31-36

Hessling KH, Schlick RW, Luckey R, Gratz K, Qaiyumi SA, Allhoff EP: The therapeutic value of ambulatory extracorporeal shockwave lithotripsy of salivary calculi. Results of a prospective study. *Laryngorhinootologie* 1993, 72 (3): 109-115

Hiraide F, Nomura Y: The fine surface structure and composition of salivary calculi. *Laryngoscope* 1980, 90 (1): 152-158

Hofstetter A: Laser-induced shockwave lithotripsy. *Dtsch Med Wochenschr* 1987, 112 (31-32): 1195-1196

Hu WF, Li CL, Zhang HP, Li TT, Zeng XY: An Experimental Model of Urethral Stricture in Rabbits Using Holmium Laser under Urethroscopic Direct Visualization. *Urol Int* 2014 (Epub ahead of print)

Iro H, Zenk J, Escudier MP, Nahlieli O, Capaccio P, Katz P, Brown J, McGurk M: Outcome of minimally invasive management of salivary calculi in 4,691 patients. *Laryngoscope* 2009, 119 (2): 263-268

Iro H, Zenk J, Koch M: Moderne Konzepte zur Diagnostik und Therapie der Sialolithiasis. *HNO* 2010, 58 (3): 211-217

Iro H, Zenk J: Konzepte zur Diagnostik und Therapie des Speichelsteinleidens. *Dtsch Arztebl* 2003, 100 (9): A-556/B-475/C-448

Iro H, Schneider HT, Födra C, Waitz G, Nitsche N, Heinritz HH, Benninger J, Ell C: Shockwave lithotripsy of salivary duct stones. *Lancet* 1992, 339 (8805): 1333-1336.

Ito H, Baba S: Pulsed dye laser lithotripsy of submandibular gland salivary calculus. *J Laryngol Otol* 1996, 110 (10): 942-946

Jayasree RS, Gupta AK, Vivek V, Nayar VU: Spectroscopic and thermal analysis of a submandibular sialolith of Wharton's duct resected using Nd:YAG laser. *Lasers med Sci* 2008, 23 (2): 125-131

Johnson TR: Dual- Energy CT: General Principles. *AJR* 2012, 199 (5): 3-8

Kasaboglu O, Er N, Tümer C, Akkocaoglu M: Micromorphology of sialoliths in submandibular salivary gland: a scanning electron microscope and X-ray diffraction analysis. *J Oral Maxillofac Surg* 2004, 62 (10): 1253-1258

Kater W, Meyer WW, Wehrmann T, Hurst A, Buhne P, Schlick R: Efficacy, risks, and limits of extracorporeal shock wave lithotripsy for salivary gland stones. *J Endourol* 1994, 8 (1): 21-24

Koch M, Zenk J, Iro H: Diagnostic and interventional sialoscopy in obstructive diseases of the salivary glands. *HNO* 2008, 56 (2): 139-144

Kollias N, Gillies R, Moran M, Kochevar IE, and Anderson RR: Endogenous skin fluorescence includes bands that may serve as quantitative markers of aging and photoaging. *J Invest Dermatol* 1998, 111 (5): 776-780

König K, Teschke M, Sigusch B, Glockmann E, Eick S, Pfister W: Red light kills bacteria via photodynamic action. *Cell Mol Biol* 2000, 46 (7): 1297-1303

Königsberger R, Feyh J, Goetz A, Schilling V, Kastenbauer E: Endoscopic controlled laser lithotripsy in the treatment of sialolithiasis. *Laryngorhinootologie* 1990, 69 (6): 322-323

Kontoyannis CG, Bouropoulos NC, Koutsoukos PG: Raman Spectroscopy: A tool for the quantitative analysis of mineral components of solid mixtures. The case of calcium oxalate monohydrate and hydroxyapatit. *Vib. Spectroscop* 1997, 15 (1): 53-60

Kontoyannis CG, Bouropoulos NC, Koutsoukos PG: Urinary Stone Layer Analysis of Mineral Components by Raman Spectroscopy, IR Spectroscopy, and X-ray Powder Diffraction: A Comparative Study. *Appl. Spectrosc* 1997, 51 (8): 1205-1209

Lakowicz R, Principles of Fluorescence Spectroscopy. *Springer Science + Business Media LLC New York* 2006, 3: 3

Lee H, Ryan RT, Teichman JM, Kim J, Choi B, Arakeri NV, Welch AJ: Stone retropulsion during holmium:YAG lithotripsy. *J Urol* 2003, 169 (3): 881-885

Lennon AM, Buchalla W, Brune L, Zimmermann O, Gross U, Attin T: The ability of

- selected oral microorganisms to emit red fluorescence. *Caries Res* 2006, 40 (1): 2-5
- Lustmann J, Regev E, Melamed Y: Sialolithiasis. A survey on 245 patients and a review of the literature. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1990, 19 (3): 135-138
- Lustmann J, Shteyrer A: Salivary calculi: ultrastructural morphology and bacterial etiology. *J Dent Res* 1981, 60 (8): 1386-1395
- Marchal F, Dulguerov P, Becker M, Barki G, Disant F, Lehmann W: Specificity of parotid sialendoscopy. *Laryngoscope* 2001, 111 (2): 264-271
- Martellucci S, Pagliuca G, de Vincentiis M, Greco A, Fusconi M, De Virgilio A, Gallipoli C, Gallo A: Ho:Yag laser for sialolithiasis of Wharton's duct. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2013, 148 (5): 770-774
- McGurk M, Prince MJ, Jiang ZX, King TA: Laser lithotripsy: a preliminary study on its application for sialolithiasis. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1994, 32 (4): 218-221
- Prestin S, Rothschild SI, Betz CS, Kraft M: Measurement of epithelial thickness within the oral cavity using optical coherence tomography. *Head Neck* 2012, 34 (12): 1777-1781
- Primak AN, Vrtiska TJ, Qu M, McCollough H: Kidney Stone Differentiation, In: Johnson TR, Fink C, Schönberg SO, Reiser MF: Dual Energy CT in Clinical Practice. *Med Radiol Diagn Imaging Springer Berlin Heidelberg* 2011: 177-178
- Qu M, Ramirez-Giraldo JC, Leng S, Williams JC, Vrtiska TJ, Lieske JC, McCollough CH: Dual-energy dual-source CT with additional spectral filtration can improve the differentiation of non-uric acid renal stones: an ex-vivo phantom study. *AJR Am J Roentgenol* 2011, 196 (6): 1279-1287
- Raif J, Vardi M, Nahlieli O, Gannot I: An Er:YAG laser endoscopic fiber delivery system for lithotripsy of salivary stones. *Lasers Surg Med* 2006, 38 (6): 580-587
- Rice DH: Diseases of the salivary gland. *Head and Neck surgery-Otolaryngology* (Byron JB, Harold CP, eds) J.B. Lippincot Company Philadelphia Pennsylvania 1993: 475-484
- Selvaraju R, Raja A, Thirupathi G: FT-Raman spectral analysis of human urinary stones. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2012, 99: 205-210
- Sherman JA, McGurk M: Lack of correlation between water hardness and salivary calculi in England. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2000, 38 (1): 50-53
- Siedek V, Betz CS, Hecht V, Blagova R, Vogeser M, Zengel P, Berghaus A, Leunig A, Sroka R: Laser induced fragmentation of salivary stones: an in vitro comparison of two different, clinically approved laser system. *Lasers Surg Med* 2008, 40 (4): 257-264
- Sofer M, Watterson JD, Wollin TA, Nott L, Razvi H, Denstedt JD: Holmium:YAG laser lithotripsy for upper urinary tract calculi in 598 patients. *J Urol* 2002, 167 (1): 31-34
- Sökeland J, Rübber H: Taschenlehrbuch Urologie. *Georg Thieme Verlag Stuttgart New York* 2008, 14: 344-354

Sterenborg HJCM, Motamedi M, Wagner RF, Duvic M, Thomsen S, Jacques SL: In vivo fluorescence spectroscopy and imaging of human skin tumors. *Laser Med Sci* 1994, 9: 191-201

Stolzmann P, Scheffel H, Rentsch K, Schertler T, Frauenfelder T, Leschka S, Sulser T, Marincek B, Alkadhi H: Dual-energy computed tomography for the differentiation of uric acid stones: ex vivo performance evaluation. *Urol Res* 2008, 36 (3-4): 133-138

Strittmatter F, Gratzke C, Graser A, Stief CG, Johnson TR: Imaging for diagnostics of urolithiasis including dual-energy C. *Urologe A* 2013, 52 (4): 541-545

Strnad P, Usachov V, Debes C, Gräter F, Parry DA, Omary MB: Unique amino acid signatures that are evolutionarily conserved distinguish simple-type, epidermal and hair keratins. *J Cell Sci* 2011, 124 (24): 4221-4232

Strübel G, Rzepka-Glinder V: Structure and composition of sialoliths. *J Clin Chem Clin Biochem* 1989, 27 (4): 244-250

Strutz J: Speicheldrüsen, in Strutz J, Mann W: Praxis der HNO-Heilkunde, Kopf-und Halschirurgie. *Georg Thieme Verlag KG Stuttgart* 2010: 565-581

Su YX, Zhang K, Ke ZF, Zheng GS, Chu M, Liao GQ: Increased calcium and decreased magnesium and citrate concentrations of submandibular/sublingual saliva in sialolithiasis. *Arch Oral Biol* 2010, 55 (1): 15-20

Szalma J, Böddi K, Lempel E, Sieroslawska AF, Szabo Z, Harfouche R, Olasz L, Takatsy A, Guttman A: Proteomic and scanning electron microscopic analysis of submandibular sialoliths. *Clin Oral Investig* 2013, 17 (7): 1709-1717

Teymoortash A, Buck P, Jepsen H, Werner JA: Sialolith crystals localized intraglandularly and in the Wharton's duct of the human submandibular gland: an X-ray diffraction analysis. *Arch Oral Biol* 2003, 48 (3): 233-236

Teymoortash A, Wollstein AC, Lippert BM, Peldszus R, Werner JA: Bacteria and pathogenesis of human salivary calculus. *Acta Otolaryngol* 2002, 122 (2): 210-214

Thomas C, Krauss B, Ketelsen D, Tsifliakis I, Reimann A, Werner M, Schilling D, Hennenlotter J, Claussen CD, Schlemmer HP, Heuschmid M: Differentiation of urinary calculi with dual energy CT: effect of spectral shaping by high energy tin filtration. *Invest Radiol* 2010, 45 (7): 393-398

Tiselius HG: Is precipitation of calcium phosphate an important factor for the development of calcium oxalate stones in the urinary tract?. *Front Biosci* 2003, 1 (8): 326-332

Triantafyllou A, Fletcher D, Scott J: Histological and histochemical observations on salivary microliths in ferret. *Arch Oral Biol* 2006, 51 (39): 198-205

Vavrina J, Müller W, Schlegel C: Lithotripsy in the conservative treatment of salivary stones. *Praxis (Bern. 1994)* 1997, 86 (13): 524-528

Wagnieres GA, Star WM, Wilson BC: In vivo fluorescence spectroscopy and imaging for

oncological applications. *Photochem Photobiol* 1998, 68 (5): 603-632

Wedler G, Freund H, Lehrbuch der physikalischen Chemie. *Wiley-VCH Weinheim* 2011: 670

Williams MF: Sialolithiasis. *Otolaryngol Clin North Am* 1999, 32: 819-834

Wollin TA, Denstedt JD: The holmium laser in urology. *J Clin Laser Med Surg* 1998, 16 (1): 13-20

Yamamoto H, Sakae T, Takagi M, Otake S, Hirai G: Weddellite in submandibular gland calculus. *J Dent Res* 1983, 62 (1): 16-19

Zengel P, Schrötzlmair F, Reichel C, Paprottka P, Clevert DA: Sonography: the leading diagnostic tool for diseases of the salivary glands. *Semin Ultrasound CT MR* 2013, 34 (3): 196-203

Zenk J, Constantinidis J, Kydles S, Hornung J, Iro H: Clinical and diagnostic findings of sialolithiasis. *HNO* 1999, 47 (11): 963-969

10 Danksagung

Sehr herzlich bedanken möchte ich mich bei Frau PD Dr. Pamela Zengel für die freundliche Überlassung des interessanten Themas und die hervorragende Betreuung meiner Arbeit.

Großer Dank gebührt außerdem Herrn Dr. Florian Schrözlmaier für seine überaus engagierte Unterstützung und sein jederzeit offenes Ohr für alle meine Fragen. Ich danke Ihm insbesondere für die Weitergabe seiner wissenschaftlichen Kompetenz und dafür, dass er so manchen freien Abend opferte um mit mir über statistischen Fragestellungen zu brüten.

Ein weiterer besonderer Dank gilt Herrn Dr. Ronald Sroka, der mir stets ein Ansprechpartner bei sämtlichen physikalischen Fragestellungen war. Seine Ideen, Anregungen und konstruktive Kritik haben maßgeblich zum guten Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Auch möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Laser-Forschungslabors des LIFE-Zentrums für Ihre Hilfsbereitschaft und das gute Arbeitsklima bedanken. Insbesondere danke ich Herrn Thomas Pongratz für die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Experimente und Herrn Matthias Eder für die nette, ergiebige Zeit im Laser-Forschungslabor und für die Bereitstellung der Raman-spektroskopischen Messwerte, die im Rahmen seiner Bachelorarbeit erhoben wurden.

Für die Möglichkeit der Durchführung von Infrarot-spektroskopischen Messungen bedanke ich mich recht herzlich bei Herrn Prof. Dr. Michael Vogeser sowie bei Frau Claudia Gress vom Institut für Laboratoriumsmedizin.

Ein herzlicher Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Thorsten Johnson vom Institut für klinische Radiologie für die Bereitstellung des Dual Source CT-Scanners und die Weitergabe seines Wissens im Bereich der Materialdifferenzierung mithilfe des Dual Energy-Verfahrens.

Ein ganz lieber Dank gilt Peter und Anja für Ihre kompetente Hilfe bei der statistischen Auswertung und Darstellung der Ergebnisse.

Meiner Familie, die in guten wie in schlechten Zeiten stets hinter mir steht, bin ich ganz

besonders dankbar. Ebenso danke ich meinem Mann Michael, ohne den ich computertechnisch aufgeschmissen wäre und der es stets schafft, mich auf den Boden der Tatsachen zurückzuholen. Meiner Freundin Teresa, die schon im Studium immer für mich da war, danke ich dafür, dass sie mir immer wieder gezeigt hat, dass es auch ein Leben neben der (Doktor-)Arbeit gibt.

Zum Schluss möchte ich noch meinem Großvater Josef danken, dem diese Arbeit gewidmet ist. Er hat mich stets ermutigt, diesen Weg zu gehen und wäre jetzt sicherlich stolz auf mich.

Eidesstattliche Versicherung

Müller, Monika Lisa

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Der Einsatz des Holmium:YAG-Lasers in der Laserlithotripsie von Speichelsteinen – eine *Ex-vivo*-Untersuchung

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin