

Aus der
Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde
Klinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Martin Canis

**Der Einsatz der Lasertechnologie bei der
Cholesteatomresektion
-
eine Ex-vivo-Studie**

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

vorgelegt von
Sebastian Fuchs

aus
Göppingen

Jahr
2025

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Ronald Sroka
Mitberichterstatter: PD Dr. Jonas J.-H. Park

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. Florian Schrötzlmair

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 11.12.2025

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis	4
1. Einleitung	7
1.1 Anatomie des Ohres	7
1.2 Cholesteatom	12
1.2.1 Definition	12
1.2.2 Epidemiologie	14
1.2.3 Histologie	14
1.2.4 Operative Techniken	15
1.3 Physikalische Grundlagen zur Bestimmung optischer Eigenschaften eines Gewebes	18
1.3.1 Ausbreitung von Licht im Gewebe	18
1.3.2 Optische Eigenschaften	19
1.3.2.1 Absorptionskoeffizient μ_a	19
1.3.2.2 Streukoeffizient μ_s	20
1.3.2.3 Anisotropiefaktor g	21
1.4 Grundlagen der Laserphysik	21
1.5 Laserinduzierte biologische Wirkungen	23
1.6 Verwendung des Lasers in der Mittelohrchirurgie	25
2. Zielsetzung	28
3. Material und Methoden	30
3.1 Materialien und Geräte	30
3.1.1 Chemikalien	30
3.1.2 Gebrauchsgegenstände	30
3.1.3 Geräte	31
3.1.4 Optische Dokumentationsgeräte	32
3.1.5 Software	32
3.2 Gewebeproben	33
3.3 Laserexperimentelle Methoden	33

5

4.2.3.1 Laseranwendung am Cholesteatom - Messung der Ablationstiefe mittels kryohistologischer Auswertung.....	73
4.2.3.2 Laseranwendung am Cholesteatom - Messung der Ablationstiefe mittels optischer Kohärenztomographie.....	76
4.2.3.3 Methodikvergleich: kryohistologische Schnittbildgebung versus OCT-Aufnahmen	78
4.2.3.4 Lasereinsatz am Gehörknöchelchen – Messung der Ablationstiefe mittels optischer Kohärenztomographie.....	79
4.2.3.5 Vergleich der verursachten Schäden an Cholesteatom und Ossikel durch CO ₂ - und Diodenlaser.....	82
5. Diskussion	84
5.1 optische Eigenschaften	84
5.2 Methodikvergleich: Kryohistologische Schnittführung <i>versus</i> OCT- Aufnahmen in der Ablationstiefenbestimmung.....	92
5.3 Vergleich der beiden Laser hinsichtlich ihrer Anwendung am Cholesteatom und der verursachten Kollateralschäden.....	94
5.4 Limitationen & Ausblick: Ist eine klinische Anwendung von CO ₂ - und Diodenlaser in der Cholesteatomchirurgie sinnvoll?	100
6. Zusammenfassung.....	105
Literaturverzeichnis.....	108
Danksagung	117
Abbildungsverzeichnis	118
Tabellenverzeichnis.....	121

1. Einleitung

1.1 Anatomie des Ohres

Aus anatomischer Sicht setzt sich das Ohr aus drei Anteilen zusammen: äußeres Ohr, Mittel- und Innenohr.

Zum äußeren Ohr wird die Ohrmuschel (*Auricula*), der äußere Gehörgang (*Meatus acusticus externus*) und die äußere Schicht des Trommelfells (*Membrana tympanica*) gezählt.

Das Mittelohr umfasst die Paukenhöhle (*Cavum tympani*), welche die drei Gehörknöchelchen Hammer (*Malleus*), Amboss (*Incus*) und Steigbügel (*Stapes*) beherbergt, das *Antrum mastoideum*, die sich im Laufe der Kindheit pneumatisierenden *Cellulae mastoideae* und die Ohrtrumpete (*Tuba auditiva*). Die *Tuba auditiva* nimmt dabei eine zentrale Rolle in der Physiologie des Mittelohrs ein. Sie schafft eine Verbindung zwischen Paukenhöhle und Nasenrachen (*Nasopharynx*) und dient somit dem Druckausgleich, der Ventilation und der Drainage von Flüssigkeiten aus dem Mittelohr (Reiß, 2009).

Im Innenohr befindet sich das Labyrinth, welches über einen knöchernen und einen häutigen Anteil verfügt. Das Labyrinthsystem beinhaltet das Hör- (*Cochlea*) und das Gleichgewichtsorgan (Bogengänge (*Canalis semicircularis anterior, lateralis und posterior*), *Sacculus* und *Utriculus*) (siehe Abbildung 1) (Benninghoff & Drenckhahn, 2004; Lenarz & Boenninghaus, 2012; Moore, 2013; Reiß, 2009).

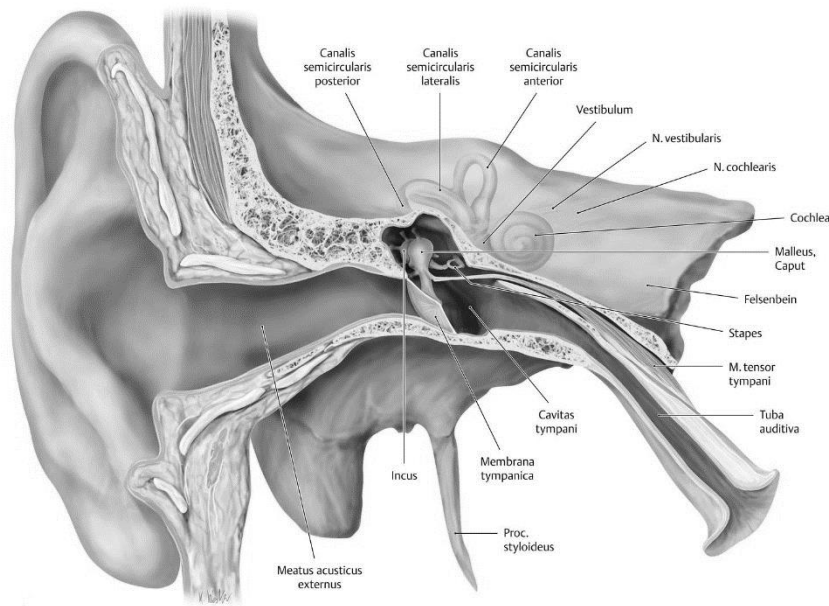


Abbildung 1: Überblick Anatomie Ohr (Ansicht von coronar) (Schünke et al., 2018)

Den lateralen Anteil des Ohres bildet die Ohrmuschel. Von der äußeren Gehörgangsöffnung ausgehend erstreckt sich der äußere Gehörgang über seinen zunächst knorpeligen, dann knöchernen Anteil bis hin zum Trommelfell. Der äußere Gehörgang ist von mehrschichtig verhorntem Plattenepithel ausgekleidet (Benninghoff & Drenckhahn, 2004). Er enthält Talgdrüsen und Ceruminaldrüsen, deren Sekrete, zusammen mit abgeschilferten Epithelzellen, das Ohrenschmalz (*Cerumen*) bilden (Lenarz & Boenninghaus, 2012; Welsch, 2010).

Die Grenze zwischen äußerem Ohr- und Mittelohr bildet das Trommelfell. Es verfügt über einen randständigen Ring (*Anulus fibrosus*), welcher im *Sulcus tympanicus* eingelassen ist. Im Bereich dieses Ringes ist das Trommelfell straff gespannt (*Pars tensa*). Daneben besitzt das Trommelfell einen kleineren, nicht gespannten Anteil an seinem oberen Rand (*Pars flaccida*). Durch Verwachsung des Hammergriffs mit dem Trommelfell findet sich in der Mitte der Membran eine Einziehung (*Umbo*) (siehe Abbildung 2).

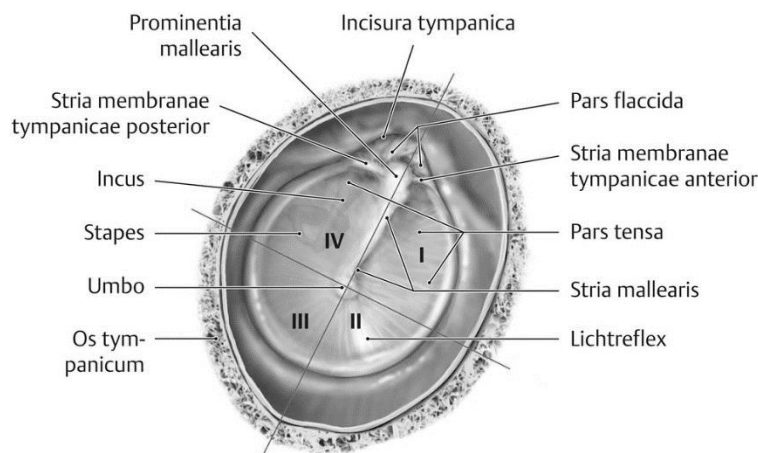


Abbildung 2: linkes Trommelfell (Ansicht von sagittal) (Schünke et al. 2018)

Vergleichbar mit dem Epithel des äußeren Gehörgangs, ist das Trommelfell auf der Außenseite von mehrschichtig verhorntem Plattenepithel überzogen, wohingegen es auf der Mittelohrseite vom einschichtigen, flachen oder kubischen Schleimhautepithel bedeckt ist (Benninghoff & Drenckhahn, 2004; Luers & Huttenbrink, 2016; Welsch, 2010). Während die *Pars tensa* über drei Schichten verfügt - Epithelschicht, Bindegewebsschicht (*Lamina propria*) und Schleimhaut, weist die *Pars flaccida* lediglich eine Zweischichtigkeit auf (Epithelschicht und Schleimhaut) (Lenarz & Boenninghaus, 2012).

Hinter dem Trommelfell liegt die Paukenhöhle. Diese lässt sich in drei Etagen unterteilen: *Epitympanon*, *Mesotympanon* und *Hypotympanon*.

Das *Epitympanon*, auch Kuppelraum oder Attik genannt, befindet sich oberhalb des Trommelfells. In diesem Bereich sind Hammerkopf und kurzer Ambossfortsatz

vorzufinden. Das *Tegmen tympani* grenzt das *Epitympanon* nach kranial von der mittleren Schädelgrube ab. Nach lateral gelangt man über den *Aditus ad antrum* in das *Antrum mastoideum*.

Das *Mesotympanon* wird nach lateral durch die *Paries membranaceus*, nach medial durch das *Promontorium* (knöcherne Ausbuchtung der basalen Schneckenwindung) sowie das runde und das ovale Fenster, nach vorne durch die *Paries caroticus* und nach hinten durch die *Paries mastoideus* begrenzt. Im *Mesotympanon* befinden sich unter anderem die *Chorda tympani* zwischen Hammergriff und langem Ambossschenkel, der Steigbügel, der *Nervus facialis* sowie die Öffnung zur *Tuba auditiva* (siehe Abbildung 3).

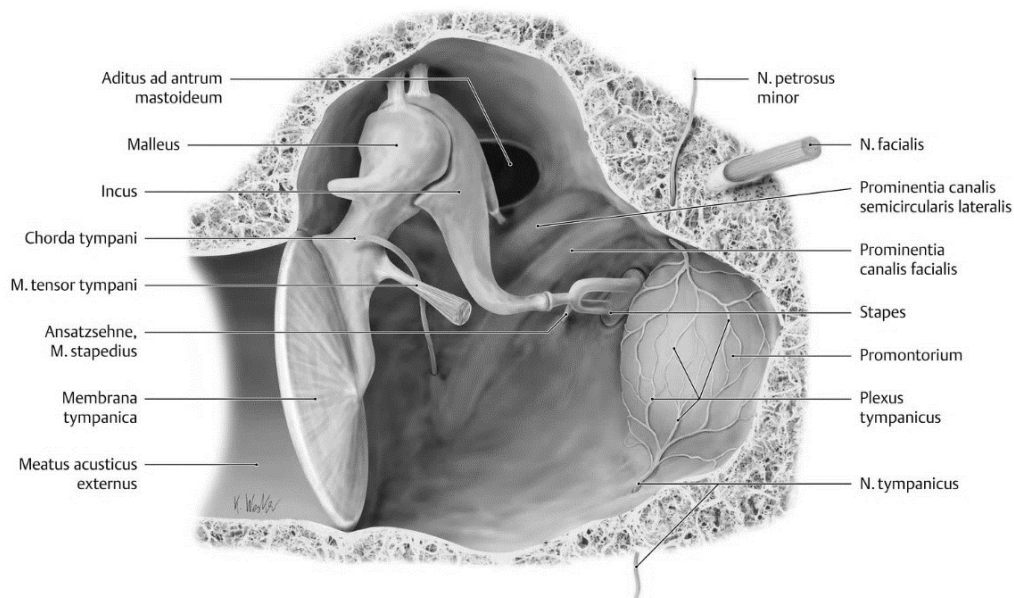


Abbildung 3: Anatomie der Paukenhöhle (Ansicht von coronar) (Schünke et al., 2018)

Als *Hypotympanon* wird der Bereich unterhalb der Trommelfellebene bezeichnet (Aumüller, 2007; Lenarz & Boenninghaus, 2012).

In bis zu 39% der Fälle breitet sich das Cholesteatom in eine Einbuchtung im Bereich des *Mesotympanons*, den so genannten *Sinus tympani* aus und ist dabei aufgrund der schwierigen Zugänglichkeit dieser Region nur sehr mühsam zu entfernen. Der *Sinus tympani* befindet sich posterior gelegen im Bereich des *Mesotympanons* in Höhe des

*Promontorium*s. Nach lateral liegt er in enger Umgebung zum *Canalis facialis* und zum lateralen Bogengang. Nach inferior gelangt man in Richtung des *Bulbus venae jugularis* (Kara & Watson, 2008; Nitek et al., 2006; Thumfart, 1998; Toran et al., 2004).

Zu den wichtigen Strukturen im Bereich des Mittelohrs, auf die in dieser Arbeit ein besonderes Augenmerk gerichtet werden soll, zählen die Gehörknöchelchen. Sie dienen der Schallübertragung vom Trommelfell auf das ovale Fenster. Der Hammer leitet den auf das Trommelfell eintreffenden Schall über ein Sattelgelenk an den Amboss weiter. Dieser artikuliert im Bereich des *Processus lenticularis* mit dem Stapeskopf. Der Steigbügel verfügt über zwei Schenkel (*Crus anterius* und *Crus posterius*), welche in die Steigbügel Fußplatte münden. Diese ist über das *Ligamentum anulare* beweglich im ovalen Fenster befestigt. Aufgrund ihrer Lage innerhalb des ovalen Fensters und der damit verknüpften Verbindung zum Innenohr ist hier bei der Entfernung von pathologischen Prozessen und den damit verknüpften Manipulationen Vorsicht geboten. Insbesondere bei Vorliegen eines beweglichen Stapes besteht in diesem Bereich die Gefahr einer Fußplattendislokation, weshalb sich hier ein kontaktfreies Arbeiten besonders anbietet (Jovanovic, 2003; Theissing et al., 2006).

Die eintreffenden Schallwellen versetzen das Trommelfell in Schwingung, welche durch Vibrationen über die Gehörknöchelchenkette weitergeleitet werden. Dabei fungieren die Ossikel als Impedanzwandler zwischen dem niedrigen Schallwellenwiderstand in der Luft und dem hohen Schallwellenwiderstand der Innenohrflüssigkeit (*Perilymphe*). Diese wird einerseits über die Hebelwirkung der Gehörknöchelchen erzielt, andererseits gelingt dies aufgrund einer Verstärkung des Schalldrucks (Schalldrucktransformation) durch die Übertragung von der vergleichsweise großen Fläche des Trommelfells auf die kleine Fläche der Steigbügel Fußplatte (ca. 1:20) (Arndt, 2010; Lenarz & Boenninghaus, 2012).

1.2 Cholesteatom

1.2.1 Definition

Beim Cholesteatom handelt es sich um eine destruierende Läsion im Bereich des *Oss temporale* (Olszewska et al., 2004; Welkoborsky, 2011).

Bezeichnend für das Cholesteatom ist das Einwachsen von verhornendem Plattenepithel in die mit Schleimhaut ausgekleideten Bereiche des Mittelohrs (Welkoborsky, 2011). Es stellt sich histologisch als dreischichtige Läsion dar (Semaan & Megerian, 2006), welche sich sukzessive ausbreitet, dabei die umgebenden Strukturen schädigt (Olszewska et al., 2004) und nach Entfernung zur Entwicklung von Rezidiven neigt (McCabe et al., 1976).

Gray spricht in diesem Zusammenhang kurz und treffend von „skin in the wrong place“. Es ähnelt histologisch somit einer „Epidermoidzyste“ (Ferlito, 1993).

Das Cholesteatom wird klassisch in ein kongenitales (auch „primäres“- oder „genuines“ Cholesteatom) und ein erworbenes Cholesteatom unterteilt. Letzteres wird in eine primär-, sekundär- und tertiär erworbene Form eingeteilt. Bei der primär erworbenen Form handelt es sich um Cholesteatome, welche als Resultat der Ausbildung einer Retraktionstasche innerhalb des Trommelfells entstehen. Die sekundär erworbene Form setzt eine Perforation des Trommelfells voraus. Hierdurch ist eine Migration von Plattenepithel in die Paukenhöhle möglich. Meyerhoff und Truelson beschreiben darüber hinaus eine weitere, tertiär erworbene Form, welche hinter einem unversehrt erscheinenden Trommelfell vorzufinden ist und aufgrund einer Implantation oder einer vorbestehenden Otitis media entsteht (Dornelles et al., 2005; Meyerhoff & Truelson, 1986; Olszewska et al., 2004).

Eine weitere Einteilung lieferte Tos (Tos, 1993). Sie stellt die Lokalisation des Cholesteatoms in den Fokus. Dabei werden drei Formen unterschieden (Hildmann et al., 2006; Olszewska et al., 2004):

1. Attik-Cholesteatom (mit Ursprung an der *Pars flaccida*)

2. *Sinus-tympani*-Cholesteatom (unter Ausbildung einer Retraktion der *Pars tensa* mit Prädisposition im hinteren oberen Bereich des Trommelfells)
3. Tensa-Cholesteatom (geht aus einer vollständig retrahierten *Pars tensa* hervor)

Die Klassifikation nach Tos gilt als hilfreich bei der Prognosestellung oder der Wahl des chirurgischen Eingriffs (Hildmann et al., 2006).

Saleh und Mills beschreiben 1999 eine weitere Möglichkeit der Einteilung, welche die otoskopisch beurteilte Ausbreitung der Erkrankung, den Status der Gehörknöchelchenkette und das Auftreten präoperativer Komplikationen berücksichtigt (Saleh & Mills, 1999).

Die so genannte ATM-Klassifikation entwickelt von Telmesani et. al fußt auf der präoperativen Beurteilung der Ausdehnung des Cholesteatoms. Anhand klinischer und radiologischer Ergebnisse wird dabei die Ausbreitung der Erkrankung im Bereich der Attik (A), der Paukenhöhle (englisch *tympanum*) (T) und des Mastoids (M) beurteilt (Telmesani et al., 2009).

Beim Vorliegen eines Cholesteatoms stellt die Gehörknöchelchenkette einen sehr zentralen Angriffspunkt dar. Die Destruktion der Ossikelkette hat je nach Ausmaß der Läsion eine Beeinträchtigung des Hörvermögens der betroffenen Patienten zur Folge. In ca. 80 – 90% der Fälle scheinen die Ossikel zumindest teilweise von einem resorptiven Prozess betroffen zu sein (Albera et al., 2012; Dornelles et al., 2007; Hildmann & Sudhoff, 1999). Dabei ist der *Incus* insgesamt bei allen Cholesteatomformen der am häufigsten betroffene Ossikel (Albera et al., 2012; Sade & Fuchs, 1994; Tos, 1979). Im Falle eines kongenitalen Cholesteatoms wiesen laut Potsic *et al.* 43% der jungen Patienten eine Beteiligung der Gehörknöchelchenkette auf (Potsic et al., 2002). Darüber hinaus beschrieben Albera *et al.* bei 11% ihrer Patienten eine funktionell intakte Kette, trotz teilweise vorhandener Erosionen der Ossikel. Die Hörschwelle dieser Patienten war dabei vergleichbar mit Patienten, welche über eine normale Ossikelkette verfügten (Albera et al., 2012).

1.2.2 Epidemiologie

Die jährliche Inzidenz des Cholesteatoms beträgt innerhalb der europäischen Bevölkerung 9,2 pro 100 000 erwachsener Einwohner kaukasischen Ursprungs (Kemppainen et al., 1999), bei Kindern liegt die Inzidenz bei ca. 3 pro 100 000 Einwohner (Tos, 1988). Männer sind 1,4-mal häufiger betroffen als Frauen (Kemppainen et al., 1999). Da Costa *et al.* beschreiben in einer aktuellen Studie an 356 Cholesteatompatienten ein bilaterales Auftreten der Erkrankung in 16,9% der Fälle (da Costa et al., 2016). Es konnten keine Unterschiede in der Prävalenz hinsichtlich der Herkunft von Patienten aus unterschiedlichen sozialen Schichten ermittelt werden (Kemppainen et al., 1999).

1.2.3 Histologie

Makroskopisch betrachtet erscheint das Cholesteatom meist als rundliche oder ovale Raumforderung weißlicher oder gräulicher Farbe und ist häufig von breiiger Konsistenz. Vielfach präsentiert es sich auch als abgrenzbare Perle. Die Größe kann dabei stark variieren (Ferlito, 1993).

Das Cholesteatom setzt sich histologisch aus drei unterschiedlichen Schichten zusammen (von innen nach außen): zystischer Inhalt, Matrix, Perimatrix (Ferlito, 1993). Den zystischen Inhalt des Cholesteatoms bilden Hornlamellen.

Die Matrix besteht aus mehrschichtig verhorntem Plattenepithel und setzt sich – vergleichbar mit der Epidermis – aus vier verschiedenen Schichten zusammen (von innen nach außen): *Stratum basale*, *spinosum*, *granulosum* und *corneum* (Dornelles et al., 2005).

Die Perimatrix stellt den äußersten Teil des Cholesteatoms dar. Sie besteht aus Bindegewebe, beinhaltet Kollagenfasern, Fibrozyten und Entzündungszellen und ist kapillarreich. Dornelles *et al.* beschreiben die Perimatrix zusammenfassend als „inflammatorisches Netzwerk, welches das Cholesteatom umgibt“ (Dornelles et al., 2005; Welkoborsky, 2011).

Die entscheidenden pathologischen Prozesse im Bereich der Matrix scheinen in einer Störung der Keratinozyten-Differenzierung sowie einer Hyperproliferation der Matrix zu liegen. Die Hyperproliferation entsteht offenbar in Folge einer Kombination aus Proliferationssteigerung aufgrund eines Entzündungsprozesses innerhalb der Perimatrix sowie einer Hemmung der Apoptose (Jacob et al., 2001; Jung et al., 2008; Li et al., 2008; Park et al., 2009; Woo et al., 2009). Der direkte Kontakt von Bakterien und Epithelzellen innerhalb der Matrix dient als Stimulus für weiteres Tiefenwachstum und bedingt in der Perimatrix eine verstärkte Ausschüttung von Osteoklasten (Kuczkowski et al., 2010; Welkoborsky, 2011).

Histopathologisch zeigt sich innerhalb der Perimatrix eine vermehrte Expression von Proteinasen, Kollagenasen und Zytokinen, welche den Abbau der umgebenden knöchernen Strukturen begünstigen und somit zur weiteren Progression der Erkrankung beitragen (Kuczkowski et al., 2010; Olszewska et al., 2007; Suchozebrska-Jesioneck et al., 2008; Welkoborsky, 2011).

1.2.4 Operative Techniken

Das Primärziel der Cholesteatomtherapie besteht in der vollständigen Entfernung des Cholesteatoms. Hierbei hat es sich bewährt, ausgehend vom Trommelfell der Wachstumsrichtung des Cholesteatomsacks zu folgen und das krankhafte Gewebe wenn möglich *en bloc* zu entfernen. Als operativ erstrebenswert gilt ein möglichst pflegeleichtes Ohr mit einer geringen Rezidivrate. Eine gute Hörfunktion ist diesen Primärzielen vorerst unterzuordnen (Hildmann et al., 2000; Hildmann et al., 2006; Reiß, 2009).

Zur Cholesteatomentfernung stehen vorrangig drei chirurgische Eingriffe zur Verfügung: die offene Methode (*Canal Wall Down Mastoidectomy/CWD*) = Radikalhöhlenanlage, die *Canal-Wall-Down-Operation* mit anschließender Rekonstruktion der Gehörgangshinterwand = sekundär-geschlossenes Verfahren und

die primär geschlossene Methode (*Canal Wall Up Technik/CWU* oder *Intact Canal Wall Technik/ICW*). (Hildmann et al., 2000; Theissing et al., 2006).

Bei der offenen Operationstechnik (CWD) erfolgt der Zugang zur Paukenhöhle über einen endauralen oder retroaurikulären Zugang. Der endaurale Zugang bietet sich vor allem bei kleinen Cholesteatomen an, wohingegen sich der Operateur mit Hilfe des retroaurikulären Zugangs eine bessere Übersicht und mehr Raum schaffen kann. Der Cholesteatomsack wird ausgehend vom Trommelfell in seiner Wachstumsrichtung verfolgt. Während des operativen Prozesses werden laterale Attikwand und hintere Gehörgangswand im Sinne einer Attikoantrotomie teilweise oder vollständig abgetragen und das Cholesteatom vollständig dargestellt. Gelingt dem Operateur die vollständige Darstellung des Cholesteatomsacks, kann dieser nun *en bloc* reseziert werden. Bei vollständiger Resektion ohne Rekonstruktion der hinteren Gehörgangswand entsteht eine offene Mastoidhöhle, welche bei völlig fehlender Rekonstruktion der Paukenhöhle auch als Radikalhöhle bezeichnet wird. Für die offene Operationstechnik wird eine geringere Rezidivrate beschrieben. Zudem ermöglicht sie im Rahmen der Nachsorgeuntersuchungen ein schnelleres Erkennen von Rezidiven. Der Nachteil besteht in der meist intensiven HNO-ärztlichen Pflegebedürftigkeit der offenen Mastoidhöhle. Darüber hinaus neigt die angelegte Radikalhöhle gelegentlich zur Sekretion, welche eine für den Patienten unangenehme Otorrhoe zur Folge hat. Erfolgt während des operativen Eingriffes eine zusätzliche Rekonstruktion der hinteren Gehörgangswand spricht man von einem sekundär-geschlossenen Verfahren. Diese wird in der Regel mit autologem Knorpel aus der Ohrmuschel durchgeführt. Beim primär geschlossenen Verfahren besteht je nach Ausdehnung des Cholesteatoms die Möglichkeit, dieses in einem Ein- oder Zwei-Wege-Verfahren zu resezieren. Der Zugangsweg erfolgt entsprechend des Ein- oder Zwei-Wege-Verfahrens endaural bzw. retroaurikulär und/oder über das Mastoid. Die Gehörgangshinterwand bleibt hier im Gegensatz zum offenen Verfahren erhalten, weshalb diese Vorgehensweise auch als *intact-canal-wall-Technik* bezeichnet wird. Eine intensive Pflegebedürftigkeit wie bei Anlage einer Radikalhöhle wird somit

vermieden. Das geschlossene Verfahren ist unter anderem aufgrund der eingeschränkten intraoperativen Übersicht, vor allem im hinteren Anteil der Paukenhöhle mit dem *Sinus tympani*, mit einer höheren Rezidivrate verbunden. Darüber hinaus ist ein mögliches Rezidiv für den Untersucher in der Nachsorgeuntersuchung wesentlich schwerer zu erkennen (Stark et al., 2011; Theissing et al., 2006; Thumfart, 1998).

Kann nicht sicher von einer vollständigen Entfernung des Cholesteatoms ausgegangen werden, bietet sich eine „*Second-look*“-Operation zur Früherkennung und Therapie eines möglichen Rezidivs nach circa 12 Monaten an (Reiß, 2009; Stark et al., 2011).

Zur Darstellung und Resektion des Cholesteatoms werden typischerweise verschiedene Bohrsysteme (z.B. Diamantbohrer, Rosen-Bohrer) und mikrochirurgische Instrumente (z.B. Häkchen, Tellermesser) eingesetzt. Somit erfolgt die Entfernung des krankhaften Gewebes mechanisch. Demzufolge ist beispielsweise bei Arbeiten in der Nähe oder direkt an einer intakten Gehörknöchelchenkette besondere Vorsicht geboten, da Manipulationen bzw. Vibrationen, welche vor allem bei Fräsarbeiten in der Nähe der Kette auftreten, bleibende Lärmschädigungen des Innenohrs zur Folge haben können (Arndt, 2010, 2010; Palva et al., 1973, 1973; Stark et al., 2011, 2011). Es existieren zahlreiche Studien, welche sich mit diesen postoperativen Schallempfindungsschwerhörigkeiten nach Mittelohroperationen beschäftigen. Als mögliche Auslöser zieht man starke Manipulationen im Bereich der Gehörknöchelchen, akustische Bohrtraumata und Vibrationen sowie thermische Effekte beim Bohrprozess und den erzeugten Lärm beim Absaugen von Flüssigkeiten aus dem Mittelohr in Betracht. Bohrgeräusche scheinen dabei sowohl im ipsilateralen als auch im kontralateralen Ohr eine mögliche Gefahrenquelle für postoperative sensorineurale Schwerhörigkeiten darzustellen (Bergin et al., 2015; Desai et al., 2004; Goyal et al., 2013; Holmquist et al., 1979; Kazikdas et al., 2015; Kylen & Arlinger, 1976; Palva & Sorri, 1979; Smyth, 1977; Sorri et al., 2009; Yin et al., 2011; Zou et al., 2001). Die Reduzierung möglicher akustischer Bohrtraumata ist im Rahmen eines operativen Mittelohreingriffes laut Kylén *et al.* lediglich durch eine Verkürzung der

Bohrzeit zu erreichen, was allerdings häufig nicht möglich ist (Kylén, Stjernvall & Arlinger, 1977).

Vartiainen und Seppä betonen in ihrer Studie das besonders vorsichtige Vorgehen bei chirurgischen Arbeiten an einer intakten Gehörknöchelchenkette (Vartiainen & Seppä, 1997). Manipulationen an den Ossikeln scheinen dabei vor allem für eine temporäre Hörschwellenminderung im Bereich niedriger Frequenzen verantwortlich zu sein, wohingegen Bohrgeräusche eine sensorineurale Schwerhörigkeit im Bereich hoher Frequenzen auslösen können (Kazikdas et al., 2015; Kylén, Arlinger & Bergholtz, 1977, 1977). In einer weiteren Studie sehen Kylén *et al.* hinsichtlich Manipulationen im Bereich der Ossikel bei ausreichend vorsichtigem Vorgehen ein geringeres Schädigungspotential für das Innenohr als bei Gefährdungen durch akustische Bohrtraumata oder durch Perilymphfisteln (Kylén et al., 1980).

Bei einer Cholesteatomentfernung im Bereich der Stapesfußplatte besteht aufgrund der direkten Verbindung über das ovale Fenster zum Innenohr zusätzlich ein sehr hohes Risiko einer iatrogenen Innenohrschädigung durch Dislokationen, Mobilisierung oder Frakturierung der Stapesfußplatte. Diese Gefahr einer Perilymphfistel stellt sich für den Operateur ebenso bei der Resektion von krankhaften Gewebeanteilen im Bereich des Hypotympanons, da die unmittelbare Nähe zum Innenohr hier über das runde Fenster geschaffen wird (Jovanovic, 2003; Theissing et al., 2006; Vartiainen & Seppä, 1997).

1.3 Physikalische Grundlagen zur Bestimmung optischer Eigenschaften eines Gewebes

1.3.1 Ausbreitung von Licht im Gewebe

Die Fähigkeit des Lichts, Gewebe zu durchdringen und dabei Energie an dieses abzugeben, ist essenziell für dessen therapeutische Anwendung. Dabei ist die Ausbreitung des Lichts innerhalb eines Mediums abhängig von dessen optischen

Eigenschaften. Zur physikalischen Beschreibung der optischen Eigenschaften dienen vor allem der Brechungsindex n , der Anisotropiefaktor g , der Absorptionskoeffizient μ_a und der Streukoeffizient μ_s . Die Ermittlung dieser Werte gelingt durch Messung makroskopischer Größen wie Absorption, Transmission, Reflexion und Streuung des einfallenden Lichts im Gewebe (siehe Abbildung 4) (Cheong et al., 1990; Jacques, 2013; Raulin & Karsai, 2013).

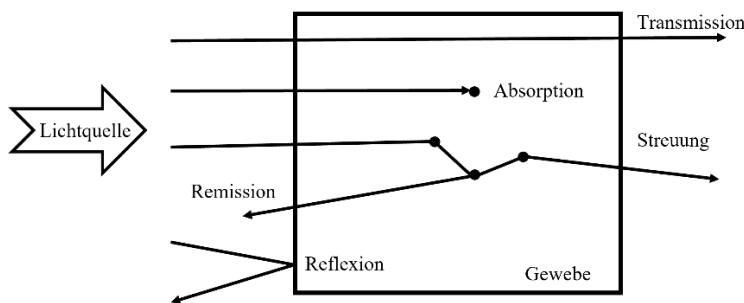


Abbildung 4: Ausbreitung von Licht im Gewebe

1.3.2 Optische Eigenschaften

1.3.2.1 Absorptionskoeffizient μ_a

Von Absorption spricht man bei vollständiger Energieübertragung eines Photons auf ein anderes Molekül. Dabei wird ein Elektron des Moleküls angeregt und vom Grundzustand in einen angeregten Zustand überführt. Befindet sich das Elektron im angeregten Zustand kann es unter Emission eines Photons (Lumineszenz) oder durch Hitzeabgabe zurück in den Grundzustand gelangen. Bei der Lumineszenz wird innerhalb des Emissionsprozesses zwischen Fluoreszenz und Phosphoreszenz unterschieden. Neben der Energieabgabe über Wärme, Phosphoreszenz und Fluoreszenz besteht die Möglichkeit der Übertragung des angeregten Elektrons auf ein weiteres Molekül, wodurch sich dessen chemische Eigenschaften ändern können. Diesen Vorgang bezeichnet man als Photochemischen Effekt.

Der Absorptionskoeffizient μ_a beschreibt das Ausmaß der Intensitätsverringern von Strahlung beim Durchgang durch ein gegebenes Medium. Er ist definiert als Wahrscheinlichkeit für die Absorption eines Photons im Medium pro durchlaufener Wegstrecke und wird in der Regel in mm^{-1} angegeben. Mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes lässt sich die Intensität $I(x)$ in einer Gewebetiefe x bei einer Anfangsstrahlungsintensität I_0 nach Durchlauf einer Strecke x durch ein absorbierendes Medium folgendermaßen berechnen:

$$I(x) = I_0 \cdot \exp(-\mu_a \cdot x)$$

Als absorbierende Medien innerhalb eines Gewebes fungieren vor allem Hämoglobin, Melanin und Wasser (Wang & Wu, 2007).

1.3.2.2 Streukoeffizient μ_s

Innerhalb eines Gewebes werden Photonen gestreut. Diese Streuung lässt sich durch den Streukoeffizienten μ_s beschreiben. Er ist ein Maß für die Wahrscheinlichkeit, pro zurückgelegter Weglänge eines Photons innerhalb des zu durchquerenden Mediums Streuung zu erfahren. Der Streukoeffizient wird typischerweise in mm^{-1} angegeben. Mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes lässt sich wiederum die Wahrscheinlichkeit berechnen, unter welcher das Photon keine Streuung erfährt:

$$I(x) = I_0 \cdot \exp(-\mu_s \cdot x)$$

Beim Durchqueren eines Gewebes kann ein Photon an unterschiedlichen Zellbestandteilen gestreut werden, welche im Größenbereich von Zellmembranen ($0,01\mu\text{m}$) bis hin zu ganzen Zellen ($10\mu\text{m}$) liegen. Innerhalb einer Zelle werden Photonen hauptsächlich an Zellkernen und Mitochondrien gestreut (Wang & Wu, 2007).

1.3.2.3 Anisotropiefaktor g

Der Anisotropiefaktor beschreibt die Richtungsänderung eines Photons nach einem stattgefundenen Streuprozess. Er kann je nach Streuungsrichtung Werte zwischen -1 und 1 annehmen. Dabei gilt für $g = 1$, dass das Photon ausschließlich Vorwärtsstreuung erfährt. Bei $g = -1$ findet dagegen ausschließlich Rückwärtsstreuung statt. Bei einem Wert für $g = 0$ liegt isotrope Streuung vor. Hier ist die Wahrscheinlichkeit für eine Streuung in jede Richtung gleich groß. Für biologisches Gewebe wurden Werte für den Anisotropiefaktor zwischen 0,7 und 0,99 ermittelt – es tritt demzufolge überwiegend Vorwärtsstreuung auf. Durch die zahlreich stattfindenden Streuprozesse innerhalb des Gewebes besteht die Möglichkeit, dass ein Teil der Photonen nach Mehrfachstreuung in die rückwärtige Richtung gestreut wurde und somit das Gewebe durch dessen Oberfläche wieder verlassen kann. Diesen Prozess, bei dem das Photon im Gewebe war und an einer anderen Stelle das Gewebe wieder verlässt, bezeichnet man als Remission, wohingegen die spekuläre Reflexion unmittelbar an der Gewebeoberfläche entsteht und dem Snellius'schem Gesetz folgt. Tritt Remission im Rahmen einer Laserapplikation auf, ist diese als Hof um den punktuellen Auftreffpunkt des Strahls zu sehen (Grevers, 2001; Welch & Gemert, 1995).

1.4 Grundlagen der Laserphysik

Der Begriff „Laser“ bezeichnet ein Akronym aus dem Englischen und steht für „Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation“. Es beschreibt das Verfahren, bei dem durch eine gezielte, stimulierte Abgabe von Strahlung eine Lichtverstärkung realisiert werden kann.

Ein Laser setzt sich aus drei wesentlichen Bestandteilen zusammen: aktives Lasermedium, Pumpquelle und optischer Resonator.

Es stehen Lasermedien in allen drei klassischen Aggregatzuständen zur Verfügung. So dienen beispielsweise Halbleiter in der Klasse der Feststoffe beim Diodenlaser als

aktives Lasermedium, wohingegen beim CO₂-Laser ein Gasgemisch zur Anwendung kommt. Auch Farbstoffgemische werden in flüssiger Form bei Farbstofflasern als Lasermedium genutzt.

Die Pumpquelle dient der Anregung der Teilchen innerhalb des Lasermediums aus dem Grundzustand in einen höheren Energiezustand mit dem Ziel der Erzeugung einer Besetzungsinversion. In diesem Zustand befinden sich mehr Moleküle im angeregten Zustand, als dies im Grundzustand der Fall ist. Durch spontane Emission eines Photons aus dem angeregten Zustand in den energetisch tieferen Zustand kann nun eine stimulierte Emission weiterer Photonen erzeugt werden.

Der optische Resonator dient der Reflexion der durchlaufenden Photonen und der daraus resultierenden Lichtverstärkung. Er besteht aus zwei Spiegeln, welche das aktive Lasermedium einschließen. Einer dieser Spiegel ist hochreflektierend, wohingegen der andere teildurchlässig ist. Die emittierten Photonen werden durch Reflexion an den beiden Spiegeln durch das aktive Lasermedium geleitet und stimulieren somit die Emission weiterer Photonen. Es entsteht eine stehende Welle, welche nun durch den teildurchlässigen Spiegel (Auskoppelspiegel) in Form eines nahezu parallelen Lichtbündels (Laserstrahl) ausgekoppelt werden kann (siehe Abbildung 5).

Bei einem Halbleiterlaser erfolgt das Erreichen der Besetzungsinversion durch elektrisches Pumpen. Der Stromfluss erzeugt innerhalb des Halbleiters die Bildung von Elektronenlochpaaren, welche bei Rekombination von Elektronen und Löchern spontan Photonen emittieren. Mit dem Erreichen der Besetzungsinversion kann die spontane Emission wiederum durch stimulierte Emission verstärkt werden, so dass ein Laserstrahl entsteht (siehe Abbildung 6).

Als Resonator dient dem Halbleiterlaser der hohe Brechungsindexsprung der Halbleiterkristalle zu Luft, so dass Halbleiterlaser ohne externe Spiegel betrieben werden können (Grevers, 2001).

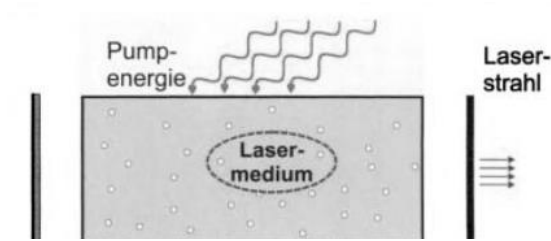


Abbildung 5: Schematischer Aufbau eines Lasers (Grevers 2001)

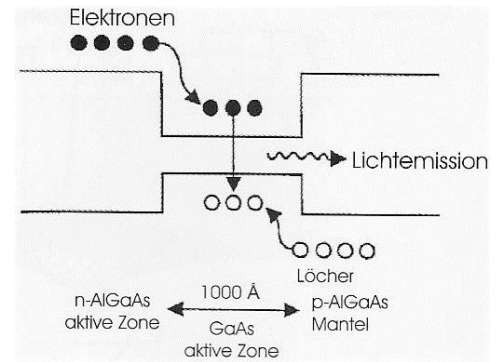


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Laserübergangs in einem Halbleiterlaser (Grevers 2001)

1.5 Laserinduzierte biologische Wirkungen

Mit Hilfe von Laserstrahlung lassen sich unterschiedliche biologische Wirkungen am Gewebe erzielen. Diese sind primär von den gewählten Laserparametern Leistungsdichte [W/cm^2], Energiedichte [J/cm^2] und Einwirkdauer [s] abhängig. Grundsätzlich lassen sich bei Laseranwendungen thermische von nicht-thermischen Verfahren trennen. Bei den nicht-thermischen Verfahren spielen vor allem die Photochemie und die Biomodulation eine Rolle, wohingegen sich die thermischen Verfahren durch Koagulation, Vaporisation, Ablation, Disruption und Fragmentation beschreiben lassen. Die am Gewebe erzielte Wirkung lässt sich dabei durch Variation von Leistungsdichte und Einwirkdauer modulieren (siehe Abbildung 7).

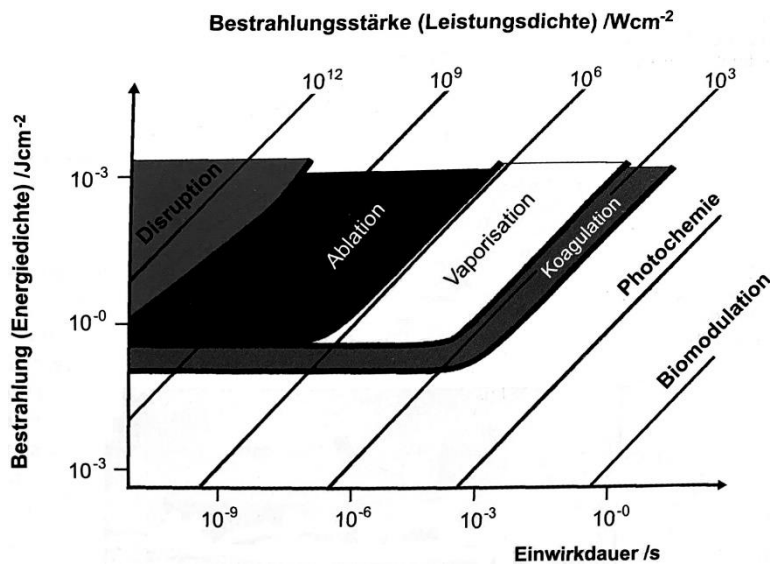


Abbildung 7: Laserinduzierte Prozesse in Abhängigkeit der Laserparameter (Grevers et al., 2001)

Bei der chirurgischen Anwendung des Lasers spielen vor allem die thermischen Verfahren eine große Rolle. Mittels der durch Absorption erzeugten Wärme lässt sich in Abhängigkeit der Temperatur und Dauer der Temperatureinwirkung eine selektive Schädigung der Gewebestrukturen erreichen. Ab einer Temperatur von 58°C über einen Zeitraum von 10s ist eine weißliche Verfärbung des Gewebes zu beobachten. Proteine innerhalb des Gewebes werden denaturiert. Es findet eine irreversible Zellschädigung statt. Diesen Koagulationsprozess macht man sich beispielsweise im Bereich der Blutstillung zum Verschluss kleinerer Blutgefäße zu Nutze. Mit Erreichen der Siedetemperatur des intrazellulären Wasseranteils ab 100°C zieht sich die Gewebeoberfläche zusammen und es kommt zur Vakuolenbildung. Ab 150°C ist eine Schwarzfärbung des Gewebes zu beobachten. Durch die Laserbestrahlung erfolgt Karbonisation am Zielgewebe, dabei nimmt der Absorptionskoeffizient zu. Dementsprechend findet die weitere Temperaturerhöhung des Gewebes sehr schnell statt.

Vaporisation und Verbrennung des Gewebes erfolgen oberhalb einer Temperatur von 300°C. Erreicht man diesen Temperaturbereich, erfolgt der Gewebeabtrag durch schlagartige Vaporisation. Diesen Vorgang bezeichnet man als Ablation. Der

Wärmeabtransport erfolgt hier sehr rasch, so dass die thermische Wechselwirkung sehr kurzgehalten wird und die thermisch veränderte Randzone somit nur eine geringe Ausdehnung besitzt. Zur Gewebeablation sind Pulsenergiedichten im Bereich von $0,1 - 10 \text{ J/cm}^2$ nötig. Erfolgt darüber hinaus eine weitere Steigerung der Pulsenergiedichte, wird ein kurzzeitiges Plasma erzeugt, welches sich zunächst ausdehnt und anschließend wieder zusammenfällt. Hierdurch wird eine mechanische Stoßwelle induziert, welche eine Disruption und Fragmentation des Gewebes zur Folge haben kann. Dieser Vorgang kommt im Bereich der Lithotripsie zur Anwendung (Boulnois, 1986; Grevers, 2001; Steiner, 2013).

1.6 Verwendung des Lasers in der Mittelohrchirurgie

Betrachtet man die aktuellen Anwendungsgebiete des Lasers im Bereich des Mittelohrs, so kommen unterschiedliche Laser primär bei Otosklerose im Sinne einer Stapedotomie zur Perforation der Stapesfußplatte zum Einsatz (Grevers, 2001; Lesinski, 1989; Perkins, 1980; Silverstein et al., 1989). Auch bei der Implantation von Stapesprothesen zur chirurgischen Therapie der Otosklerose werden regelmäßig Laser eingesetzt. In diesem Zusammenhang konnten Schrötzlmair *et al.* die erfolgreiche klinische Anwendung einer Nitinol-Stapesprothese unter Zuhilfenahme eines Diodenlasers mit einer Wellenlänge von 940 nm zur Fixierung der Prothese aufzeigen. Ein großer Vorteil des Lasers besteht in der Möglichkeit der kontaktfreien Verankerung der Prothese zur Vermeidung manueller Schäden an der Gehörknöchelchenkette oder am Innenohr (Schrötzlmair et al., 2013). In einer ex-vivo-Studie bestätigten Schrötzlmair *et al.* die sichere Anwendung insbesondere von fasergekoppelten Lasern zur Fixierung der Nitinol-Stapesprothese. Des Weiteren konnten sie die Überlegenheit des Diodenlasers in der sicheren Anwendung im Bereich empfindlicher Mittelohrstrukturen gegenüber eines CO₂-Lasers darstellen (Schrötzlmair et al., 2018).

Zu den bisher angewandten Lasersystemen in der Otologie zählen Argon- (488 nm), KTP- (532 nm), CO₂- (10600 nm), Dioden- (810 nm, 940 nm) und Erbium:YAG-Laser (2940 nm) (Caffier et al., 2008; Hamilton, 2004; Jovanovic, 2003; McCaffer et al., 2018; Nagel, 1997).

Mittlerweile stellen einige Laser auch bei der Cholesteatomchirurgie ein geeignetes Hilfsmittel dar. Thedinger schildert den Einsatz des KTP-Lasers (532 nm) in 103 Fällen chronischer Mittelohrentzündungen. Dabei macht sich der Autor die unterschiedliche laserinduzierte Wirkung des KTP-Lasers am Zielgewebe zu nutze. So ist es beispielsweise möglich, mittels eines schneidenden Prozesses Adhäsionen im Bereich der Gehörknöchelchenkette zu lösen oder Cholesteatomgewebe im Bereich der Stapes crura zu entfernen, ohne dabei die Fußplatte zu dislozieren. Die Eigenschaft des Vaporisierens erwies sich besonders am Stapes als vorteilhaft. Hierbei scheint es möglich, den Stapes vom krankhaften Gewebe zu befreien, ohne diesen dabei zu schädigen (Thedinger, 1990).

Laut Jovanovic *et al.* präsentiert sich der CO₂-Laser (10600 nm) gerade zur Cholesteatomentfernung im Bereich des Stapes ebenfalls als ein sehr geeignetes Operationsinstrument (Jovanovic, 2003).

Nagel beschreibt eine mögliche Nutzung des Erbium:YAG-Lasers (2940 nm) zur Entfernung von Cholesteatomgewebe an den Gehörknöchelchen sowie zur Bearbeitung der Ossikel für die Kettenrekonstruktion (Nagel, 1997).

McCaffer schildert die sichere Anwendung des Diodenlasers zur Cholesteatomresektion in unmittelbarer Nähe des *N. facialis* unter Zuhilfenahme einer flexiblen und gebogenen Faser. Diese ermöglicht auch eine Resektion in sonst sehr schwer zugänglichen Arealen wie beispielsweise im Bereich des *Sinus tympani* (McCaffer et al., 2018).

Darüber hinaus berichtet Hamilton von einer geringeren Rezidivrate unter Einsatz des KTP-Lasers (532 nm) bei der Cholesteatomresektion (Hamilton, 2004; Hamilton, 2005).

Besonders in der Mikrochirurgie ist ein übersichtliches, möglichst blutleeres Operationsfeld unabdingbar. Hier könnten sich die koagulierenden Eigenschaften einiger Lasersysteme mit hoher Absorptionsrate im Bereich des Hämoglobins als besonders nützlich erweisen (Grevers, 2001; Thedinger, 1990). Aufgrund dieser ausgeprägten Koagulationsfähigkeit werden einige Lasersysteme (u.a. Argon-, CO₂-, KTP, Nd:Yag- und Diodenlaser) auch bei der Entfernung von *Glomus-tympanicum*-Tumoren genutzt (Durvasula, Venkata S P et al., 2005; Jovanovic, 2003; Molony et al., 1998; Robinson et al., 1993).

Abgesehen von den genannten Einsatzbereichen werden innerhalb der Otologie noch weitere Anwendungsmöglichkeiten des Lasers beschrieben. Beispielsweise nutzte Nagel den Erbium:YAG-Laser zur Entfernung von Gehörgangsexostosen sowie für neue Operationstechniken im Bereich der Tympanoplastik (Nagel, 1997).

Die bisherigen Einsatzgebiete des Lasers in der Otologie sind allerdings häufig noch aufgrund fehlender Kenntnisse der Wechselwirkung der unterschiedlichen Lasersysteme im Gewebe limitiert (Jovanovic, 2003).

2. Zielsetzung

Laser wurden bereits in einigen klinischen Studien bei der Therapie des Cholesteatoms eingesetzt. Hier konnte gezeigt werden, dass der Einsatz eines Lasers sowohl zur Reduktion der Rezidivrate als auch zum verbesserten Erhalt der Gehörknöchelchenkette beitragen kann (Hamilton, 2004; Hamilton, 2005, 2010; Nagel, 1997; Nishizaki et al., 2001).

Für den sicheren Einsatz des Lasers sind genaue Kenntnisse zur Wechselwirkung der emittierten Strahlung mit dem zu bestrahlendem Gewebe unabdingbar (Jovanovic, 2003). Bisherige Studien beschränken sich dabei vorwiegend auf klinisch-theoretische Erfahrungswerte beim Lasereinsatz am Patienten (Hamilton, 2004; Hamilton, 2005, 2010; Jovanovic, 2003; Landegger & Cohen, 2016; McCaffer et al., 2018; Nagel, 1997; Nishizaki et al., 2001; Thedinger, 1990) oder auf die Möglichkeit einer selektiven Ablation von Cholesteatomgewebe durch Absorptionsverstärkung mittels Zellfärbung (Caffier et al., 2008; Sedlmaier et al., 2005). Genaue Daten zur Ablationstiefe des Lasers und zum Ausmaß der thermischen Schäden am Zielgewebe in Abhängigkeit von Leistung und Bestrahlungsdauer sowie zur Bestimmung möglicher Schäden am umliegenden Gewebe wie beispielsweise an den Gehörknöchelchen liegen derzeit nicht vor. Die Ermittlung der optischen Eigenschaften stellt eine wichtige Grundlage zum Verständnis der Licht-Gewebe-Wechselwirkung im Zielgewebe dar. Hierzu liegen bislang lediglich Daten einer weiteren Studie vor (Wisotzky et al., 2020).

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, unter Einsatz zweier verschiedener Laser, *ex vivo* Ablation am erkrankten Gewebe zu erzeugen und hiermit die Wechselwirkung der verwendeten Laser mit dem Zielgewebe zu ermitteln. Darüber hinaus soll bestimmt werden, welche möglichen Schäden durch die gewählten Lasersysteme an humanen Gehörknöchelchen entstehen können. Unter Zuhilfenahme histologischer Techniken und Messungen mittels optischer Kohärenztomografie (OCT) sollen Ablationstiefe und thermische Schäden eines CO₂- (10600 nm) sowie eines Diodenlasers (940 nm)

am Versuchsgewebe dargestellt werden. Somit soll diese Arbeit zeigen, in welchem Ausmaß sich Cholesteatomgewebe unter Verwendung der beiden Laser abtragen lässt und wie weitgehend der dabei am Gewebe entstehende Kollateralschaden sein kann. Darüber hinaus sollen unter Zuhilfenahme eines Ulbrichtkugelsystems die optischen Eigenschaften von Cholesteatomen bestimmt werden, um genauere Kenntnisse der Licht-Gewebe-Wechselwirkung zu erhalten und folglich die Auswahl und sichere Anwendung eines geeigneten Lasers zu ermöglichen.

3. Material und Methoden

3.1 Materialien und Geräte

3.1.1 Chemikalien

Ringerlösung (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)

NaCl 0,9% (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)

Tissue-Tek O.C.T. Compound (Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen, Deutschland)

Hämalaun nach Mayer (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)

Eosin Y Solution (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland)

Roti[®]-Histol (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)

Ethanol 100% PE vergällt (Hausapotheke)

Ethanol 96% MEK vergällt (Hausapotheke)

Ethanol 70% MEK vergällt (Hausapotheke)

Eukitt (O-Kindler - division of ORSAtec, ORSAtec GmbH, Bobingen, Deutschland)

3.1.2 Gebrauchsgegenstände

Objektträger: Superfrostplus (Thermo Fisher Scientific Gerhard Menzel B.V. & Co. KG, Braunschweig, Deutschland)

Deckgläser: 24x50mm (Thermo Fisher Scientific Gerhard Menzel B.V. & Co. KG, Braunschweig, Deutschland)

Mikrotomklingen: Feather A-35 (pfm medical AG, Köln, Deutschland)

Tissue-Tek Cryomold Einbettformen (Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen, Deutschland)

Klebstoff zur Fixation der Gehörknöchelchen auf Kork: Loctite 454 (Henkel AG & Co. KGaA, Düsseldorf, Deutschland)

Swiss Boy Hebebühne 116 (Rudolf Grauer AG, Degersheim, Schweiz)

Adjustierschiene mit Glasfaserhalterung und Millimeter-Einstellung (Spindler & Hoyer)

Halterung CO₂-Laser (Bochem Instrumente GmbH, Weilburg, Deutschland)

3.1.3 Geräte

Kryotom: Kryostat Leica CM3050 (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland)

Diodenlaser: Dornier Medtech 940nm, Medilas D SkinPulse (Dornier MedTech Europe GmbH, Wessling, Deutschland)

CO₂-Laser: Lumenis Sharplan 20C 10600nm (Lumenis (Germany) GmbH, Dreieich, Deutschland)

Photodetektor zur Bestimmung des Leistungsoutputs an der Glasfaser des Diodenlasers: Soliton (Soliton Laser- & Messtechnik Gilching, Deutschland)

Messgerät zur Bestimmung des Leistungsoutputs an der Glasfaser des Diodenlasers: TPM-300 CE Laser Power Meter (Gentec-eo, Quebec, Canada)

Färbeautomat: Combitec Slide Stainer 4009 (Histolab Products, Göteborg, Schweden)

Ulbrichtkugel: Labsphere integrating sphere device (Ø 101,6mm) (Labsphere, North Sutton, USA)

Xenon-Bogenlampe: D-light 201332 20 (Karl Storz, Tuttlingen, Deutschland)

3.1.4 Optische Dokumentationsgeräte

Optische Kohärenztomographie (OCT): Ganymede™ HR OCT system (Thorlabs GmbH, Dachau, Deutschland)

Konfokalmikroskop zur Beurteilung der Kryoschnitte: Leica ICS NT (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland)

Durchlichtmikroskop zur Auswertung der gefärbten Kryoschnitte: Leica DM 1000 (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland)

Digitale Mikroskopkamera zur Aufnahme der H.E.-gefärbten kryohistologischen Schnitte: Leica DFC 450 (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland)

Auflichtmikroskop für Fotodokumentation: Leica MZ12 (Leica Camera AG, Wetzlar, Deutschland)

Kamera zur Fotodokumentation: Canon PowerShot A720 IS (Canon Deutschland GmbH, Krefeld, Deutschland)

Spektrometer: S2000 (Ocean Optics, Ostfildern, Deutschland)

3.1.5 Software

MS Office 2016 (Microsoft Corporation, Redmond, USA)

ImageJ 1.46r (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA)

Leica Application Suite Version 4.3.0 (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland)

SigmaPlot 11.0 (Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland)

3.2 Gewebeproben

Insgesamt wurde Gewebe von 16 Cholesteatomen und drei humane Ossikel (entnommen bei indizierten Standardoperationen) für die *Ex vivo*- Versuche genutzt. Die Probenentnahmen wurden im Zeitraum vom 01.07.2014 bis 17.11.2014 an der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde der Ludwig-Maximilians-Universität München im Rahmen einer chirurgischen Intervention entnommen. 12 der 16 Cholesteatome wurden zur Bestimmung der Ablationstiefe der verwendeten Lasersysteme herangezogen. Vier von 16 Cholesteatomen dienten der Bestimmung der optischen Eigenschaften mittels Ulbrichtkugelsystem. Im Hinblick auf die Untersuchung der Proben fanden für die Patienten keinerlei Veränderungen hinsichtlich des Therapieregimes statt. Bei allen Patienten lag eine absolute Operationsindikation zur Entfernung des Cholesteatoms vor. Bei den für die Versuche genutzten Gewebeanteilen handelte es sich um zu entsorgendes Restmaterial, welches für diese Untersuchungen herangezogen und anschließend fachgerecht entsorgt wurde. Bei den verwendeten Gehörknöchelchen handelte es sich ebenfalls um im Rahmen der jeweiligen Operation reseziertes, an sich zu verwerfendes Material.

3.3 Laserexperimentelle Methoden

Insgesamt fanden bei den durchgeführten lasertechnischen Anwendungen 12 Cholesteatomgewebe und drei Gehörknöchelchenanteile Eingang in diese Untersuchung. Insgesamt wurden 91 Laserapplikationen, davon 65 Laserapplikationen

mittels Diodenlaser und 26 Applikationen mittels CO₂-Laser am Cholesteatomgewebe durchgeführt. Insgesamt entsprachen 59 von 91 Laserapplikationen im Cholesteatomgewebe den Auswertungskriterien zur Bestimmung der Ablationstiefe-, Ablationsfläche und der thermischen Zonen. 50 von 59 Ablationen wurden mittels kryohistologischen Schnitten ausgewertet (39 Behandlungen mit Diodenlaser und 11 mit CO₂-Laser). 11 von 59 Ablationen wurden mit Hilfe der OCT-Aufnahmen dargestellt (7 Behandlungen mit Diodenlaser und 4 mit CO₂-Laser). 2 mit dem Diodenlaser behandelte Proben konnten unter Berücksichtigung der Auswertungskriterien sowohl mit kryohistologischen Schnitten als auch mittels OCT-Aufnahmen ausgewertet werden. Von den 50 Ablationskratern der Kryoschnitte fanden 50 Eingang in die Auswertung der Ablationstiefe, 26 von 50 Laserapplikationen (15 Behandlungen mit Diodenlaser und 11 mit CO₂-Laser) wurden zur Bestimmung der thermischen Gesamtschädigungszone und 21 von 50 zur Vermessung der Karbonisations- und Vakuolisierungszone herangezogen (11 Behandlungen mit Diodenlaser und mit 10 CO₂-Laser). 22 von 50 Ablationskratern konnten zur Vermessung der Ablationsfläche verwendet werden (12 Behandlungen mit Diodenlaser und 10 mit CO₂-Laser). Falls vorhandene Ablationskrater nach der kryohistologischen Aufarbeitung den Einschlusskriterien für die Bestimmung der Ablationstiefe bzw. -fläche und den Kriterien für die Vermessung der thermischen Zonen entsprachen, wurden diese für alle genannten Auswertungsbereiche herangezogen. In die kryohistologische Auswertung wurden nur Proben eingeschlossen, bei denen die Laserapplikation nach histologischer Beurteilung direkt in Cholesteatomgewebe oder in Bereichen entzündlicher Schleimhaut erfolgte. Für die Auswertung der Ablationskrater, welche nur mittels OCT aufgenommen wurden, fand eine makroskopische Beurteilung des Gewebes unter Zuhilfenahme des Auflichtmikroskops (Leica MZ12) statt.

Die vorhandenen Gehörknöchelchen wurden 15-mal mit dem Diodenlaser und 15-mal mit dem CO₂-Laser bestrahlt. 25 der insgesamt 30 Laserapplikationen am Ossikel

konnten in dieser Untersuchung ausgewertet werden (12 Behandlungen mit Diodenlaser und 13 mit CO₂-Laser).

3.3.1 Ablauf der Laserversuchsreihe

3.3.1.1 Präparation der Proben

Die intraoperativ gewonnenen Cholesteatome wurden während des Transports vom Operationssaal zum Labor kurzzeitig in einem luftdicht verschlossenen histologischen Probengefäß bis zur Laserapplikation trocken asserviert. Sehr kleine Cholesteatome wurden in ihrer Größe belassen und direkt zur Bestrahlung mit dem Laser herangezogen, größeres Gewebe wurde in mehrere Proben zerteilt. Zur Simulation des feuchten Mittelohrmilieus bei einer *In-vivo*- Cholesteatomresektion wurde das gewonnene Gewebe vor der Laserbehandlung mit 0,9 % NaCl-Lösung angefeuchtet. Hierzu wurde die Probe mit Hilfe einer Pinzette in einem mit Kochsalzlösung befüllten Gefäß befeuchtet. Intraoperativ wird isotone Kochsalzlösung zum regelmäßigen Spülen des Operationsgebietes verwendet, so dass das Cholesteatom auch hier regelmäßig in Kontakt mit der Flüssigkeit gerät. Die angefeuchtete Probe wurde nun ohne zusätzliche Fixation auf eine Korkplatte aufgebracht und anschließend mit den Lasersystemen bestrahlt. Es wurden zwei verschiedene Lasersysteme zur Applikation am Gewebe herangezogen: ein CO₂-Laser (SHARPLAN 20C) mit einer Wellenlänge von $\lambda=10600$ nm und ein Diodenlaser (Dornier Medtech) mit einer Wellenlänge von $\lambda=940$ nm. Die Transmission des Laserlichts in Richtung Zielgewebe erfolgte beim CO₂-Laser mittels eines Spiegelgelenkarms mit Fokussierhandstück, welches einen Laserspotdurchmesser von 400 μ m Durchmesser auf der Gewebeoberfläche im Fokusabstand ermöglicht. Beim Diodenlaser diente eine Glasfaser mit einem Kerndurchmesser von 400 μ m als Lichtwellenleiter. Zur Applikationsorientierung der Laserstrahlung am Zielgewebe kam bei beiden Lasern die Markierung des Auftreffpunktes mittels der zusätzlich im Gerät vorhandenen Pilotlaser zum Einsatz.

Als weitere Unterlage diente eine Hartplastikplatte dem zusätzlichen Schutz der darunterliegenden Hebebühne. Nach Laserapplikation erfolgte die weitere Auswertung der Proben anteilig histologisch und zum Teil mit Hilfe der OCT (siehe 3.3.2.1 bzw. 3.3.2.2).

Die gewonnenen Gehörknöchelchen wurden bis zur Behandlung in einem mit Ringerlösung befüllten histologischen Probengefäß bei -9°C in einem Kühlschrank asserviert. Vor der Laserbestrahlung wurden die Ossikel mit Klebstoff (Loctite 454) an der Korkplatte fixiert, um eine Positionsmanipulation des Gehörknöchelchens durch das Auflegen der Glasfaser auf Kontakt möglichst zu vermeiden. Die weitere Auswertung erfolgte ausschließlich mittels OCT (siehe 3.3.2.2).

3.3.1.2 Laserapplikation mittels CO₂-Laser

Der Abstand des CO₂-Lasers zur Probe betrug konstant 3,1 cm mit einem Spotdurchmesser von 430 μm und wurde mit Hilfe der vorhandenen Hebebühne (Swiss Boy) eingestellt.

Zur Bestimmung des Spotdurchmessers des CO₂-Lasers wurde eine separate Versuchsreihe durchgeführt. Hierzu wurde ein Objektträger mit schwarzer Lackschicht überzogen und aus unterschiedlichem Abstand (1 - 5 cm) mit einer Energie von 0,1 J bestrahlt und die Ablationsfläche ermittelt. Mit Hilfe des Auflichtmikroskops (Leica MZ12) erfolgte unter Anlegen einer Skala und Fotodokumentation (Canon PowerShot A720 IS) anschließend die digitale Bestimmung des Spotdurchmessers mittels ImageJ (ImageJ 1.46r). Für den Abstand von 3,1 cm zeigte sich der CO₂-Laser im Fokus, der entsprechende Spotdurchmesser betrug 430 μm .

Eine Haltevorrichtung diente zur Fixierung des Spiegelgelenkarms zur festen Einhaltung des eingestellten Abstands. Die Bestrahlung des Gewebes mittels CO₂-Laser erfolgte für alle Laseranwendungen als einzelne Lichtapplikation in continuous

wave Modus mit einer Pulsdauer von 0,05 s bis 1 s bei Leistungen von 1 W und 1,5 W. Dementsprechend wurden Energien im Bereich von 0,15 J bis 2 J auf die Bestrahlungsfläche des Zielgewebes appliziert. Die tatsächlich emittierte Leistung des Lasers wurde zu Beginn der Versuchsreihe mit einem Messgerät (TPM-300 CE Laser Power Meter) bestimmt und entsprach der eingestellten Leistung am Laser.

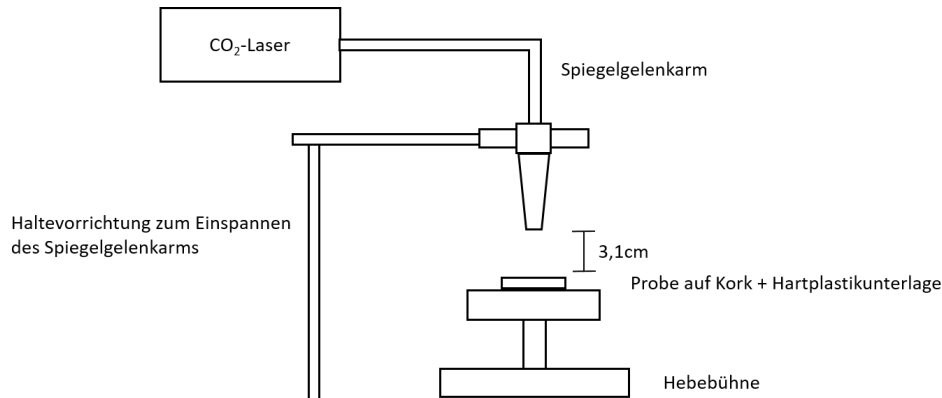


Abbildung 8: Versuchsaufbau CO₂-Laser

3.3.1.3 Laserapplikation mittels Diodenlaser

Der Diodenlaser wurde mit Kontakt der Glasfaser (Kerndurchmesser 400 μm) zur Probe appliziert. Dies gelang einerseits über eine grobe Adjustierung mit Hilfe der Hebebühne (Swiss Boy), andererseits konnte die Glasfaser über eine an die Glasfaserhalterung angebrachte Justierschiene zusätzlich millimetergenau bis zum Kontakt mit der Probe abgesenkt werden. Der Spotdurchmesser für den Diodenlaser betrug somit 400 μm . Die Unterschiede der Spotgrößen der beiden Laser im verwendeten Versuchsaufbau waren mit 400 μm für den Diodenlaser und 430 μm für den CO₂-Laser (siehe 3.3.1.2) vernachlässigbar gering, weshalb auf eine Darstellung der Messgrößen in Abhängigkeit der Energiedichte in J/cm^2 verzichtet wurde. Da die an der Glasfaser ausgekoppelte Leistung des Diodenlasers von zahlreichen Faktoren wie etwa dem Schleifprozess der Glasfaser, deren Verlauf oder deren Einspannen in eine Haltevorrichtung abhängig ist, wurde die tatsächlich emittierte Leistung des

Lasers vor Bestrahlung der Probe stets mit Hilfe eines Messgerätes (TPM-300 CE Laser Power Meter) ermittelt. Die Laserstrahlung wurde bei Verwendung des Diodenlasers in getakteter Form mit continuous wave und einer Pulsdauer von 3 s bis 10 s mit einer Leistung von 0,9 W bis 5,6 W emittiert. Dementsprechend wurde das Zielgewebe mit Energien im Bereich von 4,8 J bis 28 J pro Faserquerschnitt (400 μm) bestrahlt.

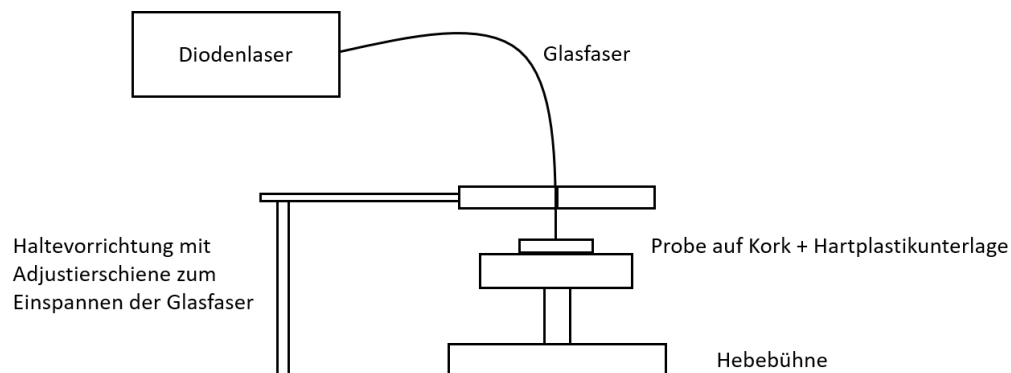


Abbildung 9: Versuchsaufbau Diodenlaser

Da bei Betrieb des CO_2 -Lasers mit einer Energie von 2 J am Zielgewebe gleichmäßige Krater erzeugt wurden, diente dieser Laser mit diesen Parametern zusätzlich als Markierungs- und Identifikationshilfe für den Ablationsbereich des Diodenlasers. Hierzu wurden mit dem CO_2 -Laser zwei Markierungen in einer vertikalen Linie mit einer Energie von 2 J (2 W, 1 s) gesetzt. Die Applikation des Diodenlasers erfolgte zwischen diesen Markierungspunkten (siehe Abbildung 10).

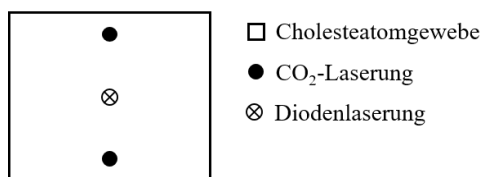


Abbildung 10: Markierungshilfe mittels CO_2 -Laser

3.3.1.4 Asservation und weitere Vorgehensweise

Nach der Laserapplikation wurden die Proben anteilig mittels Tissue Tek O.C.T. Compound in einer Cryomoldschale eingebettet, mit Hilfe von flüssigem Stickstoff zur späteren histologischen Aufbereitung schockgefroren und anschließend in einem Tiefkühlfach bei -25°C asserviert.

Ein weiterer Teil der Proben wurde direkt nach Laserapplikation zur Schnittbildaufnahme mittels OCT verwendet.

Humane Ossikel wurden direkt im Anschluss an die Laseranwendung zur Auswertung mittels OCT herangezogen.

Nach Durchführung der Versuchsreihe wurden vorhandene Gewebeüberreste sowie die bereits mittels OCT vermessenen Proben stets fachgerecht entsorgt.

3.3.2 Bestimmung der Ablationstiefe

Zur Ermittlung der durch die beiden Laser am Zielgewebe verursachten Ablationstiefe wurden zwei verschiedene Verfahren herangezogen. Zu Beginn der Versuchsreihe erfolgte die Ermittlung der Ablation auf Basis kryohistologischer Schnitte. Im Verlauf fand sich in Form der optischen Kohärenztomographie eine genauere, weniger fehleranfällige Messmethode.

3.3.2.1 Kryohistologie

Die tiefgefrorenen Proben wurden zunächst aus den Cryomoldformen gelöst, mit etwas Tissue Tek O.C.T. Compound auf den Haltezylinder aufgeblickt und anschließend mit einer Feather A-35 Mikrotomklinge im Kryostat (Leica CM 3050) geschnitten. Die Kerntemperatur betrug dabei zwischen -18°C und -23°C, die Objekttemperatur zwischen -15°C und -19°C. Die Proben wurden mit einer Dicke von 7 µm und 9 µm geschnitten. Die Schnittdicke wurde dabei je nach Handhabbarkeit des

Gewebes im Kryotom gewählt. War das Gewebe poröser und somit anfälliger für Artefakte wurde eine Schnittdicke von 9 µm genutzt. Bei einer Dicke von 7 µm wurde jeder fünfte Schnitt auf einen Superfrostplus Objektträger aufgezogen, bei einer Dicke von 9 µm wurde jeder vierte Schnitt aufgezogen. Somit ergaben sich vier bzw. drei Leerschnitte mit einer Gesamttiefe von 28 µm respektive 27 µm zwischen jedem aufgezogenen Schnitt. Die Anzahl der Leerschnitte und fehlerhaften Schnitte (ebenfalls nicht aufgezogene Schnitte) wurde exakt dokumentiert, um für jeden aufgezogenen Schnitt die korrekte relative Tiefenposition im Gewebe ermitteln zu können. Die Gefrierschnitte wurden bei erstem Anschnitt des Gewebes auf den Objektträger aufgezogen. Das Schnittende erfolgte bei letztem Gewebeanschnitt bzw. wenn der Ablationsbereich des Lasers unter Zuhilfenahme eines Konfokalmikroskops (Leica ICS NT) nicht mehr sichtbar war. Schnittbeginn - und -ende wurden ebenfalls exakt dokumentiert. Somit konnte jedem Schnitt auf dem Objektträger eine Gewebetiefe zugeordnet werden und hiermit die Schädigungstiefe ermittelt werden. Sämtliche Objektträger wurden zum Schutz mit Alufolie ummantelt und bis zur Färbung bei -25°C tiefgekühlt asserviert.

Die Färbung erfolgte als Hämatoxylin-Eosin-Färbung mit Hilfe eines Färbeautomaten (Combitec Slide Stainer 4009) entsprechend dem im Labor etablierten Protokoll. Bei dieser Färbemethode färbt das enthaltene Hämalan alle basophilen Strukturen wie z.B. Zellkerne mit enthaltener DNA blau, wohingegen das Eosin die acidophilen Bestandteile wie Zellplasmae, Keratin oder Kollagenfasern rot färbt (Ramulu et al., 2013).

Färbeprotokoll für den Combitec Slide Stainer: jeder Färbeschritt (1 - 19) erfolgte automatisiert in einer eigenen Kammer für 3 min mit einer Abtropfzeit von 12 s vor Wechsel der Kammer.

1. Roti®-Histol
2. Roti®-Histol
3. Alkohol 100%
4. Alkohol 100%
5. Alkohol 96%
6. Alkohol 70%
7. Hämalan
8. Hämalan
9. Hämalan
10. fließendes Wasser
11. fließendes Wasser
12. Eosin 0,5% wässrige Lösung
13. Eosin 0,5% wässrige Lösung
14. Wasser
15. Alkohol 100%
16. Alkohol 100%
17. Alkohol 100%
18. Roti®-Histol
19. Roti®-Histol

Die gefärbten Präparate wurden über Nacht bei Zimmertemperatur getrocknet und anschließend mit Eukitt und 24 x 50 mm² Deckgläsern abgedeckt.

Zur histologischen Beurteilung der H.E.-gefärbten Präparate wurde ein Durchlichtmikroskop (Leica DM 1000) verwendet. Der Ablationsbereich des CO₂- bzw. Diodenlasers konnte somit in seiner Tiefe in jedem Präparat nachverfolgt werden.

Falls keine sichtbare Gewebeschädigung durch den Laser erzeugt wurde, konnte dies durch die Integrität des Gewebes ebenfalls verifiziert werden. Die Bestimmung der Ablationstiefe erfolgte anhand der dokumentierten Schnitttiefe der jeweiligen H.E.-Schnitte als Angabe in μm . Der Beginn wurde bei erstmalig vorhandener, sichtbarer Ablation gewählt, das Ende bei letztmalig sichtbarer Ablation. Wurde das Gewebe nicht vollständig durch den Laser durchdrungen, konnte das Ende des Ablationsbereichs histologisch verifiziert werden. Die Ablationstiefe ergab sich somit aus der dokumentierten Schnitttiefe mit einer maximalen Ungenauigkeit im Bereich von 0 bis +27 μm bzw. 0 bis +28 μm durch die vorhandenen Leerschnitte zwischen letztmalig sichtbarer Ablation und histologisch nachgewiesenem Ende des Ablationsbereichs. Bei vollständiger Gewebepenetration im Ablationsbereich des Lasers wurde die Tiefe als Mindesttiefe dokumentiert.

Es wurden nur Ablationskrater vermessen, welche auch nach der histologischen Aufarbeitung eindeutig der zuvor in den Laserexperimenten angelegten Leistung zuzuordnen waren. Die Krater mussten mit Hilfe der histologischen Schnitte in ihrer Tiefe verfolgbar sein. Unter diesen Kriterien war die Bestimmung von Beginn und Ende des Ablationskraters mit einer eindeutigen Zuordnung zur angelegten Leistung des Lasers möglich.

Insgesamt wurden 11 Cholesteatome in die Auswertung eingeschlossen. An diesen 11 Cholesteatomen wurden sowohl Laserungen mit dem Diodenlaser als auch mit dem CO₂-Laser durchgeführt. Aus den 11 exzidierten Cholesteatomen konnten 39 Proben zur Laserapplikation erstellt werden. Insgesamt wurde die Ablationstiefe von 50 Laserapplikationen (39 für den Diodenlaser, 11 für den CO₂-Laser) bei einem Energiebereich von 4,8 – 27 J für den Diodenlaser und 0,2 – 2 J für den CO₂-Laser mit dieser Methodik vermessen. Bei 13 der 50 Ablationskrater lag eine vollständige Gewebeporation vor. Die exakte Aufteilung ist Tabelle 1 zu entnehmen.

Tabelle 1: Ablationstiefenbestimmung am Cholesteatom anhand der kryohistologischen Schnitte

	Diodenlaser	CO ₂ -Laser	Gesamt
Cholesteatomanzahl	11	2	11
Probenanzahl	34	5	39
Laserapplikationen	39 (6 durchgängig)	11 (7 durchgängig)	50
Energiebereich	4,8 J – 27 J	0,2 J – 2 J	

3.3.2.2 Vermessung mittels optischer Kohärenztomographie (OCT)

Die optische Kohärenztomographie (OCT) ähnelt in ihrer Funktionsweise der Sonographie und eignet sich wie diese zur nicht-invasiven Bildgebung. Im Gegensatz zur Ultraschalldiagnostik kommen bei der OCT allerdings Lichtstrahlen anstelle von Schallwellen zum Einsatz. Als Lichtquelle dient eine Superlumineszenzdiode, welche Licht geringer Kohärenzlänge emittiert. Das emittierte Licht wird in einem Strahlteiler (halbdurchlässiger Spiegel) in einen Referenz- und einen Probenstrahl geteilt. Der Probenstrahl wird auf die zu untersuchende Probe geleitet, dringt in diese ein und wird dort an Schichtengrenzen mit unterschiedlichen Brechungsindizes teilweise reflektiert. Das reflektierte Licht durchläuft den Strahlteiler und trifft anschließend auf den Detektor. Der Referenzstrahl wird auf einen vollständig reflektierenden Spiegel geleitet (hier weiter als Referenzspiegel bezeichnet). Am Referenzspiegel wird der Referenzstrahl reflektiert, durchläuft den Strahlteiler und trifft anschließend ebenfalls auf den Detektor. Auf der Strecke vom Strahlteiler zum Detektor kommt es zur

Interferenz von Probenstrahl und Referenzstrahl. Dieses Interferenzsignal wird vom Detektor aufgenommen und ausgewertet (siehe Abbildung 11).

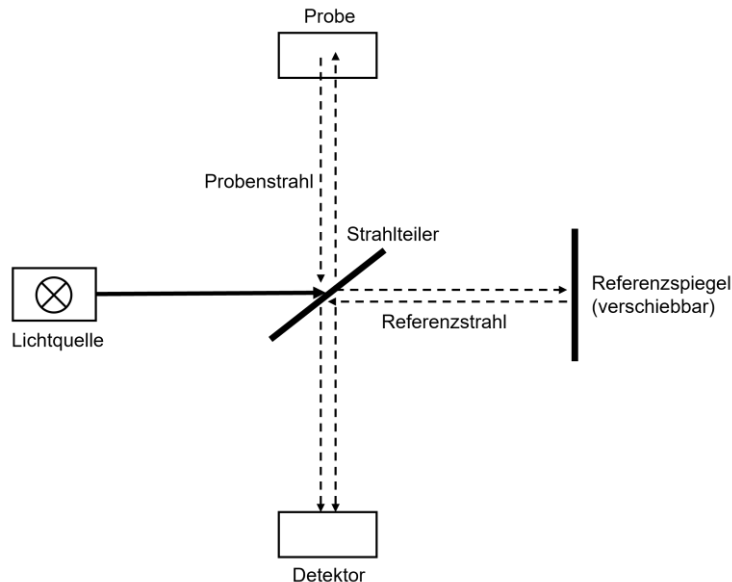


Abbildung 11: Optischer Aufbau zur Kohärenztomographie

Wird nun der Referenzspiegel in axialer Richtung verschoben, können am Detektor Interferenzsignale aus unterschiedlichen Tiefen Z der Probe aufgezeichnet werden. Verschiebt man zusätzlich den Probenstrahl nach lateral (in X -Richtung) über die Probe, kann nun Punkt für Punkt zunächst ein Bild eines Gewebeschnittes, bei zusätzlicher lateraler Bewegung in Y -Richtung sogar ein dreidimensionales Bild der Probe anhand der Rückstreuungssignale erzeugt werden.

Es werden vorwiegend zwei verschiedene Messsysteme in der Bildgebung der optischen Kohärenztomographie unterschieden. Das *time-domain* (TD)-System basiert auf der Interferenzmessung in Abhängigkeit von der Zeitabweichung zwischen Referenz- und Probenarm, wohingegen das *frequency-domain* (FD)-System die Interferenz anhand der Frequenzunterschiede zwischen Referenz- und Probenarm berechnet. Die Nachweistiefe von OCT-Geräten ist vorwiegend abhängig von der Wellenlänge der emittierenden Lichtquelle und den optischen Eigenschaften des Zielgewebes (Aumann et al., 2019; Gambichler et al., 2011; Welzel, 2010).

Bei dem in dieser Studie verwendeten OCT-Gerät (Ganymede™ HR OCT system, Thorlabs, Dachau, Deutschland) handelt es sich um ein Time-Domain-System mit einer Strahlenquelle von 930 nm, was einer optischen Eindringtiefe von ca. 2,9 mm in Abhängigkeit der Eigenschaften des Zielgewebes entspricht. Es verfügt über ein Weißlicht-Live-Kamerabild, welches die Orientierung am Zielgewebe erleichtert und eine Befunddokumentation während der Aufnahme erlaubt.

Eine optimale Bildeinstellung wurde durch Anpassung des Abstandes des Scansystems zur Probe erreicht. Der Fokus wurde dabei so gewählt, dass der Ablationskonus in der Tiefe sichtbar gemacht werden konnte und die Reflexion an der Oberfläche gleichzeitig möglichst geringgehalten wurde. Zur Vermeidung der Austrocknung der Proben während der optischen Untersuchungen wurden diese vor und nach der Bildaufnahme mit 0,9 % NaCl-Lösung angefeuchtet. Ein dabei entstehender Flüssigkeitsfilm wurde vorsichtig mit Hilfe eines Präzisionswischtuches entfernt, um optisch spiegelnde Reflexionen an der Krateroberfläche weitestgehend zu verhindern. Die Proben wurden zur Messung anschließend auf eine Korkunterlage gelegt.

Die Auswertung der OCT-Schnittbilder erfolgte mit Hilfe der Software ImageJ (Version 1.46r). Zur Bestimmung der Ablationstiefe wurden die Aufnahmen in koronarer Ebene gewählt. Hierzu wurden pro Ablationskrater repräsentativ drei Bilder im Bereich der maximalen Tiefe vermessen und hieraus der Mittelwert mit Standardabweichung bestimmt. Zur genaueren Darstellung des Ablationskonus wurden die Aufnahmen in einen 8bit-Modus umgewandelt und mit Hilfe eines individuellen Schwellwertes (Threshold) schwarz-weiß verpixelt. Zur Einstellung des Schwellwertes und somit zur Bestimmung des Ablationsbereichs wurde der Bereich der Probe gewählt, in welchem sich optisch eine deutliche Demarkationslinie zeigte. Im 8bit Modus werden die einzelnen Pixel des Bildes in 256 Intensitätsstufen unterteilt. Besitzt ein Pixel den Wert 0 wird er als schwarz angezeigt, bei einem Wert von 255 als weiß. Alle weiteren Werte innerhalb dieses Bereichs repräsentieren Graustufen (McNaughton, 2010). Mit Hilfe der Software können nun die gewünschten

Intensitätsstufen selektiert werden. Es entsteht ein klares schwarz-weiß Bild und somit eine deutlichere Demarkationslinie des Ablationskonus. Dies ermöglichte eine einheitlichere, klarere Tiefenbestimmung ohne Graubereiche verschiedener Intensitäten in der Tiefe des Konus (siehe Abbildungen 12 und 13). Zur Vermessung der Ablationstiefe wurde eine horizontale Linie im Bereich der Ablationsränder an der Probenoberfläche angelegt und hierzu das Lot zum tiefsten Punkt des Lochs gefällt. Aufgrund der häufig inhomogenen Oberflächenstruktur der Proben wurde in Fällen, in denen keine horizontale Linie angelegt werden konnte, der abweichende Winkel α zur Horizontalen bestimmt und das zu vermessende Bild um diesen Winkel gedreht (siehe Abbildungen 12 und 13). Lagen ein sehr schmaler Ablationskonus und/oder ein sehr großer Abweichungswinkel α vor, war nach Drehung des Bildes eine direkte Messung der Ablationstiefe mittels Lot zur Horizontalen nicht möglich (siehe Abbildung 14 und 15). In diesen Fällen wurde eine Tangente an die Ablationsränder angelegt und der tiefste Punkt des Kraters zur Tangente bestimmt (siehe Abbildung 16).

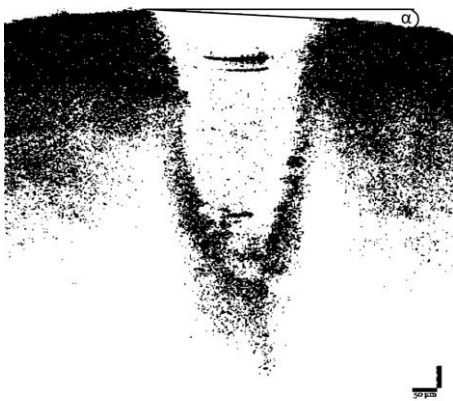


Abbildung 12: Winkelbestimmung

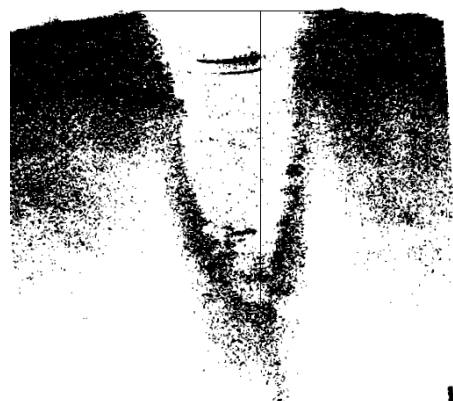


Abbildung 13: Tiefenbestimmung mittels Lot nach Drehen des Bildes um α

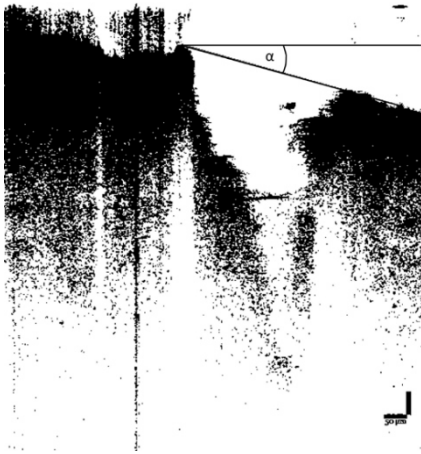


Abbildung 14: Winkelbestimmung bei großen Winkel und schmalem Konus

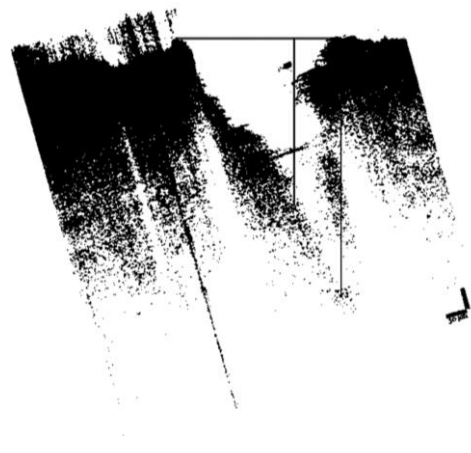


Abbildung 15: Tiefenbestimmung nach Drehung nicht möglich

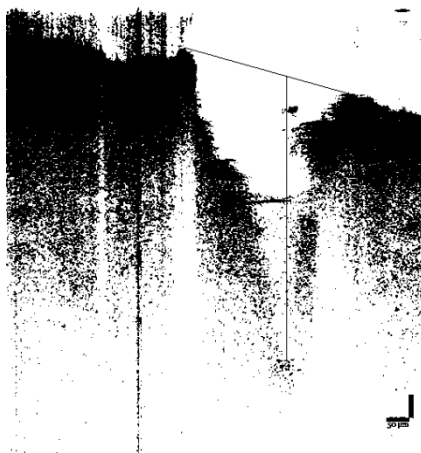


Abbildung 16: Tiefenbestimmung mittels Tangente

In die Auswertung mittels optischer Kohärenztomographie konnten drei Cholesteatome eingeschlossen werden. Analog zur kryohistologischen Auswertung wurden hier an den vorhandenen Cholesteatompräparaten ebenfalls Laserapplikationen sowohl mittels Diodenlaser als auch CO₂-Laser durchgeführt. Es konnten insgesamt 11 Ablationskrater bei einem Energiebereich von 7,44 – 20 J für den Diodenlaser und 0,2 – 0,5 J für den CO₂-Laser vermessen und ausgewertet werden, wovon bei drei Kratern eine vollständige Gewebeporforation vorlag (siehe Tabelle 2).

Es fanden nur diejenigen Ablationskrater Eingang in die Auswertung, welche mit Hilfe der OCT-Aufnahmen in ihrer vollständigen Tiefenausdehnung abgebildet werden konnten. Somit war für alle Krater, bei denen keine vollständige Perforation vorlag, ein Ablationskonus darstellbar, wohingegen bei vollständiger Gewebeperforation die Korkunterlage in der Bildgebung sichtbar wurde. Ablationen mit vollständiger Gewebeperforation wurden dementsprechend von der Gewebeoberfläche bis zur Korkunterlage bemessen. Sämtliche Krater, die diesen Kriterien nicht entsprachen, wurden von der Auswertung ausgeschlossen.

Tabelle 2: Ablationstiefenbestimmung am Cholesteatom anhand der OCT-Aufnahmen

	Diodenlaser	CO ₂ -Laser	Gesamt
Cholesteatomanzahl	3	1	3
Laserapplikationen	7 (3 durchgängig)	4 (0 durchgängig)	11
Energiebereich	7,44 – 20 J	0,2 – 0,5 J	

Die Beurteilung möglicher laserinduzierter Schäden an den entnommenen Ossikeln fand ausschließlich unter Zuhilfenahme der optischen Kohärenztomographie statt. Der Energiebereich bei Laseranwendung an den Gehörknöchelchen wurde in einer vergleichbaren Größenordnung zu den Laserapplikationen am Cholesteatomgewebe festgelegt. Die Laserapplikationen lagen für den Diodenlaser in einem Energiebereich von 8,75 – 28 J und für den CO₂-Laser im Bereich von 0,15 – 0,45 J.

Es wurden nur Ablationskrater ausgewertet, welche in ihrer Tiefe vollständig darstellbar waren, eindeutig der am Laser angelegten Leistung zugeordnet werden konnten, deutlich von Unregelmäßigkeiten in der Gewebeoberfläche der Ossikel zu unterscheiden waren und somit eindeutig als laserinduzierte Schädigung definiert werden konnten

Die Behandlungen mit dem CO₂- und Diodenlaser wurden an drei Gehörknöchelchen durchgeführt. Die Anzahl der Gehörknöchelchen, der Energiebereich und die Anzahl der in dieser Untersuchung eingeschlossenen Laserapplikationen sind Tabelle 3 zu entnehmen.

Tabelle 3: Ablationstiefenbestimmung am humanen Ossikel anhand der OCT-Aufnahmen

	Diodenlaser	CO ₂ -Laser	Gesamt
Gehörknöchelchen	3	3	3
Laserapplikationen	12 (0 durchgängig)	13 (0 durchgängig)	25
Energiebereich	8,75 – 28 J	0,15 – 0,45 J	

3.3.3 Beschreibung der thermischen Wechselwirkungen der Lasersysteme mit dem Zielgewebe

Die Auswertung der thermischen Wirkung der verwendeten Laser am Zielgewebe fand anhand kryohistologischer Schnitte (vgl. 3.3.2.1) statt. Hierzu erfolgte die Beschreibung der thermischen Wirkung am Gewebe anhand einer Einteilung in drei Zonen (von innen nach außen): Karbonisationszone, Vakuolisierungszone und thermische Zone. Vakuolen waren häufig auch im Bereich der Karbonisationszone vorzufinden, wodurch diese beiden Zonen meist schwer zu differenzieren waren und somit zu einer gemeinsamen Zone zusammengefasst wurden. Zur Beurteilung des gesamten thermischen Schadens wurden alle Zonen zu einer Gesamtschädigungszone zusammengefasst und ausgewertet. Die Beurteilung aller thermischen Zonen erfolgte stets um und in Bezug auf einen vorhandenen Ablationskrater. Laserapplikationen, welche am Zielgewebe keinen Ablationskrater erzeugten, wurden somit aus der Bewertung ausgeschlossen. Zur Bestimmung der Zonenausdehnung wurde ein geeigneter H.E.-gefärbter, kryohistologischer Schnitt bestimmt. Dieser wurde basierend auf den vorhandenen Schnitten so gewählt, dass er sich in der Mitte der Tiefe des Ablationskraters befand. Der ermittelte Schnitt wurde mit Hilfe einer Mikroskopkamera (Leica DFC 450) und der Software Leica Application Suite (Version 4.3.0) aufgenommen und stand somit zur weiteren Ausarbeitung in digitaler Form zur Verfügung.

Das Einzeichnen der Zonen in der digitalisierten Aufnahme erfolgte mittels Freihandzeichnung mit Hilfe der Software ImageJ (Version 1.46r) (siehe Abbildung 17). Zur Bestimmung der Zonenbreite diente eine am Laser-Forschungslabor

programmierte Transformation der Sigmaplot-Software (Version 11.0). Die durch die Freihandzeichnung ermittelten x- und y-Koordinaten der eingezeichneten Zonengrenzen wurden zur Abstandsberechnung in Sigmaplot eingefügt. Diese erfolgte in einem erlaubten Winkelabstandsmaß von $\alpha = 0,9^\circ$ entlang der vorgegebenen Zonenkoordinaten. Hierdurch bildeten alle gegenüberliegenden Punkte mit einer Unschärfe von $\alpha = 0,9^\circ$ ein Koordinatenpaar. Zwischen diesen Koordinatenpaaren erfolgte eine Abstandsberechnung der eingezeichneten Zonengrenzen in Richtung des ermittelten Schwerpunkts. Die Transformation ermittelte dabei die Anzahl der vorhandenen Messungen, die durchschnittliche Zonenbreite sowie die zugehörige Standardabweichung. Artefakte im Schnittbild und Bereiche, in denen die Herausarbeitung einer Demarkationslinie zum nicht geschädigten Gewebeabschnitt nicht möglich war, wurden mit Hilfe der Software nicht in die Abstandsberechnung mit einbezogen. Somit war beispielsweise die Bestimmung der durchschnittlichen Zonenbreite inklusive Standardabweichung für die Gesamtschädigungszone in Abbildung 17 als Abstandsmessungen zwischen der innersten und äußersten eingezeichneten Demarkationslinie (Zone 1 bis 3) unter Berücksichtigung der Artefakte (Ausschlussbereich I und II) möglich. Es erfolgte eine zusätzliche graphische Darstellung der Zonen mit den ermittelten Koordinatenpärchen, zwischen denen eine Breitenbestimmung möglich war und nicht korrespondierender Punkte sowie ausgeschlossener Bereiche, zwischen denen keine Abstandsberechnung durch das Programm erfolgte (siehe Abbildung 18).

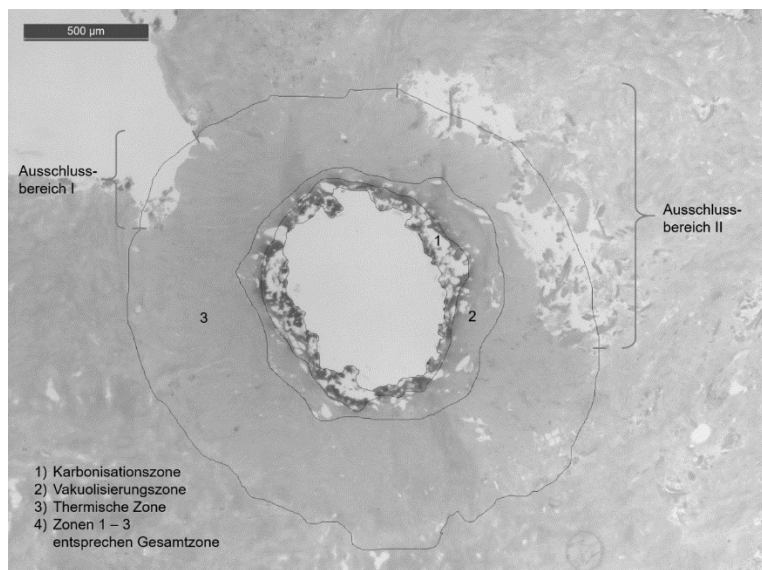


Abbildung 17: H.E. gefärbtes Präparat zur Bestimmung der thermischen Zonen

Graphische Darstellung der Zonenauswertung: Gesamtzone der thermischen Schäden an einer Cholesteatomprobe verursacht durch den Diodenlaser

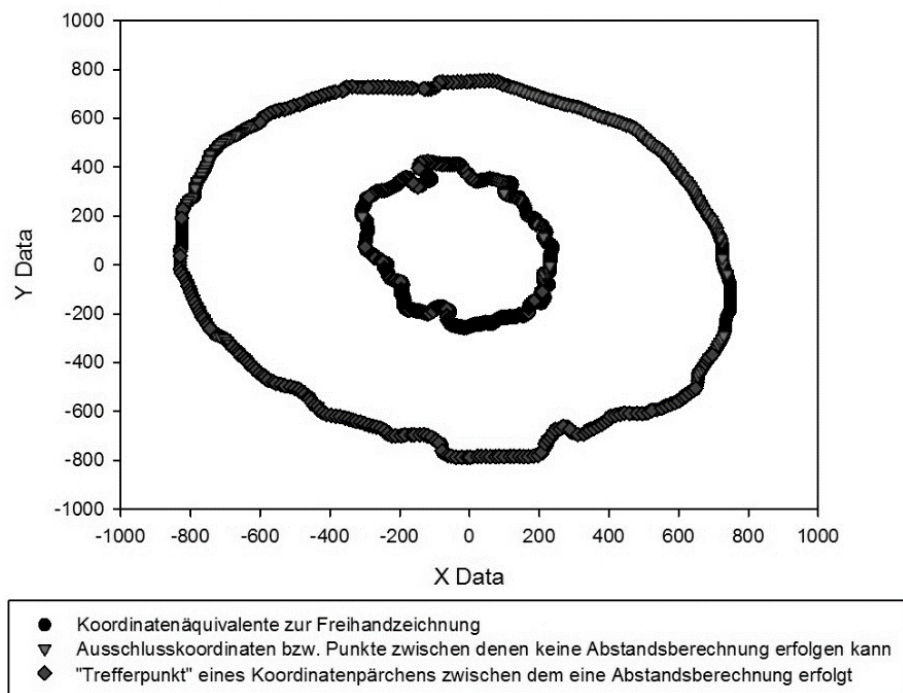


Abbildung 18: Abbildungsäquivalent der Transformation zur Berechnung der durchschnittlichen Zonenbreite (hier: Berechnung der Gesamtzone)

Für die Bestimmung von Karbonisations- und Vakuolisierungszone wurden gemäß den festgelegten Kriterien insgesamt 21 Laserapplikationen in einem Energiebereich von 4,8 – 27 J für den Diodenlaser bzw. 0,2 – 1,5 J für den CO₂-Laser berücksichtigt (Tabelle 4). Zur Beurteilung der Gesamtschädigungszone fanden insgesamt 19 Laserapplikationen in einem Energiebereich von 6 – 27 J für den Diodenlaser und 0,2 – 2 J für den CO₂-Laser Eingang in diese Untersuchung (Tabelle 5).

Tabelle 4: Bestimmung der thermischen Wechselwirkungen – Beurteilung der Karbonisations- & Vakuolisierungszone

	Diodenlaser	CO ₂ -Laser	Gesamt
Cholesteatome	4	1	5
Probenanzahl	11	4	15
Laserapplikationen	11	10	21
Perforationen	1/11	7/10	8/21
Energiebereich	4,8 – 27 J	0,2 – 1,5 J	

Tabelle 5: Bestimmung der thermischen Wechselwirkungen - Beurteilung der Gesamtschädigungszone

	Diodenlaser	CO ₂ -Laser	Gesamt
Cholesteatome	2	2	4
Probenanzahl	8	5	13
Laserapplikationen	8	11	19
Perforationen	1/8	7/11	8/19
Energiebereich	4,8 – 27 J	0,2 – 2,0 J	

3.3.4 Bestimmung der Ablationsfläche

Die Bestimmung der Ablationsfläche erfolgte analog zur Einzeichnung der Zonen mittels Freihandzeichnung in ImageJ (Version 1.46r) am entsprechenden kryohistologischen Schnitt. Der Bereich vollständiger Ablation wurde sorgfältig eingezeichnet und anschließend mittels der im Programm vorhandenen Flächenbestimmungsfunktion berechnet. Zur Kalibrierung diente eine Messskala mit einer Länge von 500 µm im digitalisierten Kryoschnitt (siehe Abbildung 17). Für eine korrekte Flächenbestimmung wurden nur Ablationsflächen berücksichtigt, welche am

gewählten Schnitt vollständig zu vermessen waren. Diese waren vollständig und ohne jeglichen Rissartefakte von Gewebe umschlossen, da Rissartefakte innerhalb des Ablationsbereichs eine falsch große Messung zur Folge hätten. Somit konnten Gewebeproben von 7 unterschiedlichen Cholesteatomen mit insgesamt 22 messbaren Ablationsbereichen in einem Energiebereich von 7 – 26,1 J für den Diodenlaser und 0,2 – 2 J für den CO₂-Laser ausgewertet werden (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6: Bestimmung der Ablationsfläche am Cholesteatom anhand der kryohistologischen Schnitte

	Diodenlaser	CO ₂ -Laser	Gesamt
Cholesteatome	7	2	7
Probenanzahl	12	5	17
Laserapplikationen	12	10	22
Energiebereich	7 J – 26,1 J	0,2 J – 2 J	

3.4 Untersuchung der optischen Eigenschaften mittels Ulbrichtkugel

Zur Ermittlung der optischen Eigenschaften μ_a , μ_s und g des Cholesteatomgewebes wurde ein Ulbrichtkugel-Messsystem verwendet. Das Prinzip zur Messung optischer Eigenschaften mit Hilfe der Ulbrichtkugel besteht darin, einstrahlendes Licht über eine rückstreuende Oberfläche im Inneren der Kugel in ein homogenes, isotropes Strahlungsfeld zu wandeln. Nach entsprechender Kalibrierung kann jeder Messpunkt auf dieser Kugel-Innenoberfläche als ein Maß für die Gesamtintensität genutzt werden. Die Ulbrichtkugel ermöglicht die Messung der kollimierten Transmission T_c , der diffusen Transmission T_d und der diffusen Reflexion R_d einer Probe. Über ein so genanntes „Inverse-adding-doubling-Verfahren“ kann anschließend die Berechnung der optischen Eigenschaften erfolgen.

Die kollimierte Transmission beschreibt dabei den Lichtanteil, welcher die Probe ungehindert durchdringt.

Bei der diffusen Transmission erfährt das einfallende Licht bei Durchdringen der Probe eine oder mehrere Streuprozesse.

Der Anteil des einfallenden Lichts, welcher innerhalb der Probe gestreut wird und diese dabei wieder rückwärtig verlässt, wird als diffuse Reflexion bezeichnet (siehe Abbildung 19).

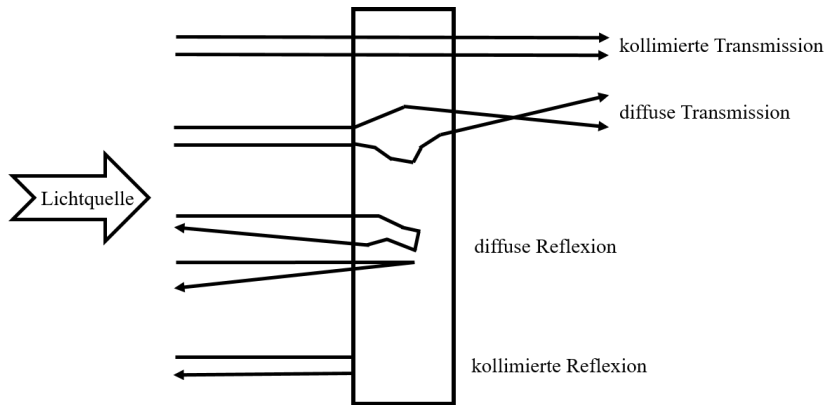


Abbildung 19: Wechselwirkungen von einstrahlendem Licht innerhalb eines Gewebes

3.4.1 Präparation der Proben

Es wurden vier Gewebeproben aus vier Cholesteatomen vermessen, wobei bei der vierten Probe drei unterschiedliche Areale vermessen werden konnten. Die Messungen erfolgten stets unmittelbar nach der operativen Probengewinnung. Zum Transport wurde das Gewebe in einem histologischen Probengefäß luftdicht verschlossen.

Zur Bestimmung der optischen Eigenschaften muss das Gewebe über plane Eintritts- und Austrittsflächen sowie einen ausreichend großen Durchmesser verfügen. Hierzu wurden die Cholesteatomproben zwischen zwei gläserne Objektträger (50 x 50 x 1 mm³) mit zwischenliegenden Distanzhaltern (Metallplättchen definierter Dicke: 0,2 mm) in allen vier Ecken des Objektträgers eingebracht. Zur Fixierung der Objektträger dienten vier Klammern, welche ebenfalls im Randbereich angebracht wurden. Beim Einbringen der Probe waren eventuelle Lufteinschlüsse zwischen Gewebeoberfläche und Objektträger unbedingt zu vermeiden, da hierdurch Sprünge der Brechungsindizes an den Grenzflächen zur Luft entstehen, welche die Messergebnisse verfälschen.

3.4.2 Versuchsaufbau

Die verwendete Ulbrichtkugel (Labsphere, Ø: 101,6 mm) weist auf ihrer Innenseite eine Spectralon®-Beschichtung auf. Diese ermöglicht eine diffuse Reflektivität R von 99% im Wellenlängenbereich von 400 nm bis 1500 nm. Die Kugel verfügt über vier Öffnungen (Ports) (Durchmesser: 3 x 25,5 mm, 1 x 12,8 mm). An einem dieser Ports wurde die Probenhalterung mit der zu vermessenden Probe angebracht (im Folgenden als Eingangsport bezeichnet). Aufgrund der häufig sehr kleinen Proben wurden sowohl der Eingangsport als auch der gegenüberliegende Port (Ausgangsport) auf 12,6 mm Durchmesser verkleinert, um die Portabdeckung weiterhin zu gewährleisten. Die Verkleinerung der Portdurchmesser konnte durch Anbringen von Reduzierstücken erreicht werden. Zum Verschluss der weiteren Ports wurde ein geeigneter Deckel verwendet.

Eine zusätzliche Öffnung (Durchmesser: 3,2 mm) diente dem Einbringen einer Detektionsfaser (Kerndurchmesser: 0,5 mm) in die Ulbrichtkugel.

Die Transmissions- und Remissionsmessungen erfolgten in einem Wellenlängenbereich von 400 – 700 nm einer Xenon-Bogenlampe (D-light 201332 20), deren abstrahlendes Licht über eine Multi-Mode-Faser mit einem Durchmesser von 1,5 mm geleitet wurde (siehe Abbildung 20).

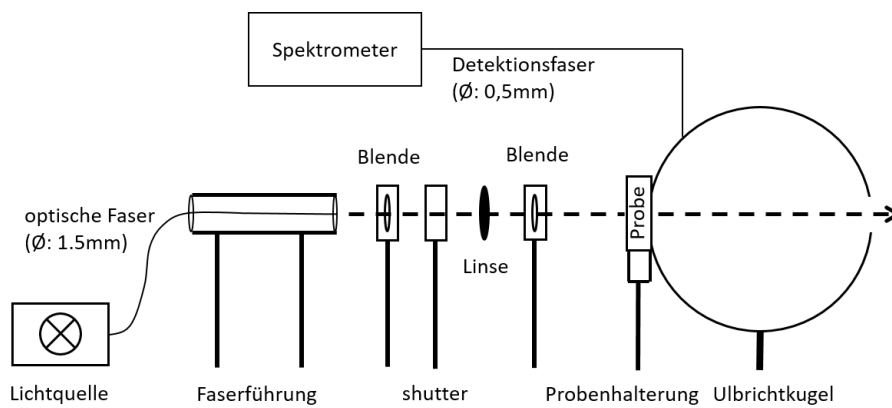


Abbildung 20: Versuchsaufbau Ulbrichtkugel

Die Faser wurde dabei durch eine mit Aluminium beschichtete Faserführung geleitet, um eine Streuung des Lichts zu minimieren. Am Faseraustritt befand sich eine Blende

zur Größeneinstellung des Lichtspots und zur weiteren Streulichtreduktion. Ab hier wurde das Licht als Freistrahle durch den Versuchsaufbau geleitet. Ein Shutter diente der Durchführung von Dunkelmessungen, indem dieser ein Blockieren des Lichtwegs ermöglichte. Nachfolgend fokussierte eine Linse mit 60 mm Brennweite das einfallende Licht auf die Probe. Hinter der Linse befand sich eine weitere Blende, welche wiederum zur Reduzierung von Streulicht und zur Größeneinstellung des Lichtspots genutzt wurde.

Das durch den Messaufbau geleitete Licht traf auf die zu vermessende Probe und wurde hier anteilig absorbiert, reflektiert und transmittiert. Durch unterschiedlich durchgeführte Messungen konnte mit Hilfe der eingebrachten Detektionsfaser das reflektierte und transmittierte Licht innerhalb der Ulbrichtkugel aufgenommen werden. Hierzu nahm die Detektionsfaser Licht von einem gegenüberliegenden Teilbereich der Kugellinnenseite mit einem Durchmesser von ca. 30 mm auf und leitete dieses zur Auswertung an das angeschlossene Spektrometer. Das verwendete Spektrometer (S 2000, Ocean Optics, Ostfildern, Deutschland) ermöglichte eine Spektralanalyse im Wellenlängenbereich von 200 – 850 nm.

Um ein Verschieben parallel zum Lichtstrahl zu ermöglichen, wurden alle Komponenten des Messaufbaus bis auf die Lichtquelle und das Spektrometer auf einer Schiene angebracht. Die Ulbrichtkugel wurde zusätzlich auf einer Rotationsplatte befestigt, welche eine Rotation um die vertikale Achse und ein weiteres Verschieben der Kugel horizontal zum einfallenden Licht ermöglichte.

3.4.3 Messverfahren

Zunächst wurde die diffuse Transmission bestimmt. Die jeweils zu vermessende Cholesteatomgewebeprobe wurde hierzu mit Hilfe einer Probenhalterung am Eingangsport direkt an die Ulbrichtkugel angebracht. Anschließend wurde die Probe mit einem Lichtbündel der Xenon-Bogenlampe mit 5 mm Durchmesser senkrecht

bestrahlt (siehe Abbildung 21). Der in der Ulbrichtkugel ankommende Lichtanteil, welcher innerhalb der Probe Streuprozessen ausgesetzt war, wurde durch die Detektionsfaser aufgenommen und am Spektrometer als Wellenlängenspektrum Sig_{Td} gemessen, wohingegen der Lichtanteil, welcher nicht durch Streuung beeinflusst wurde, die Ulbrichtkugel am rückseitigen Port wieder ungehindert verlassen konnte (entspricht der kollimierten Transmission T_c).

Zur Bestimmung der diffusen Transmission waren zusätzlich eine Referenzmessung sowie eine Dunkelmessung mit entsprechender Referenzmessung notwendig. Die

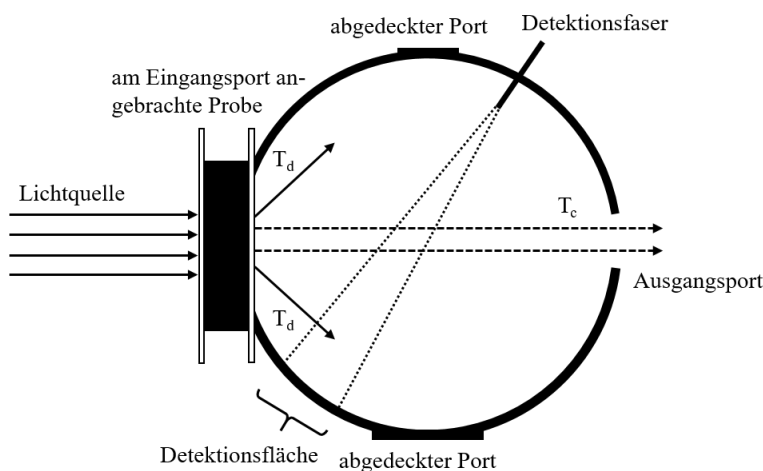


Abbildung 21: Messung der diffusen Transmission

Dunkelmessung erfolgte durch Blockieren des Lichtwegs mit Hilfe eines Shutters bei gleicher Integrationszeit des Spektrometers. Durch diese Messung konnte das Hintergrundspektrum Bg_{Td} ermittelt werden. Bei der Referenzmessung der diffusen Transmission wurde die Ulbrichtkugel so gedreht, dass der einfallende Lichtstrahl nicht direkt mit der Probe interagieren konnte, sondern an der Spectralon Beschichtung rückgestreut wurde. Dadurch war es möglich, den Einfluss der Probe am Messport zu berücksichtigen (siehe Abbildung 22). Anschließend erfolgte eine ebenso durchgeführte Referenzmessung für die Dunkelmessung mit Einbringen des Shutters. Die beiden Messungen lieferten die Ergebnisse für Ref_{Td} bzw. $Bg_{ref,Td}$. Die Referenzmessung (Ref_{Td}) und die Referenzmessung der Dunkelmessung ($Bg_{ref,Td}$) waren für die Bestimmung der diffusen Transmission und der diffusen Reflexion

gleich und mussten somit nur einmal durchgeführt und bestimmt werden. Mit Hilfe der vier Spektralmessungen sowie der gegebenen Reflektivität R der Spectralon®-Beschichtung der Ulbrichtkugel ergab sich die Berechnung der diffusen Transmission T_d wie folgt:

$$T_d = \frac{\text{Sig}_{Td} - \text{Bg}_{Td}}{\text{Ref}_{Td} - \text{Bg}_{\text{ref},Td}} \cdot R \equiv \frac{I_{Td}}{I_{\text{ref},Td}} \cdot R$$

Dabei handelte es sich bei Sig und Bg um die Spektraldatensätze. $I_{\text{ref},Td}$ entsprachen den über die Integrationszeiten wellenlängenabhängig ermittelten Intensitätswerten. Zur Messung der diffusen Reflexion wurde die Ulbrichtkugel so gedreht, dass sich der

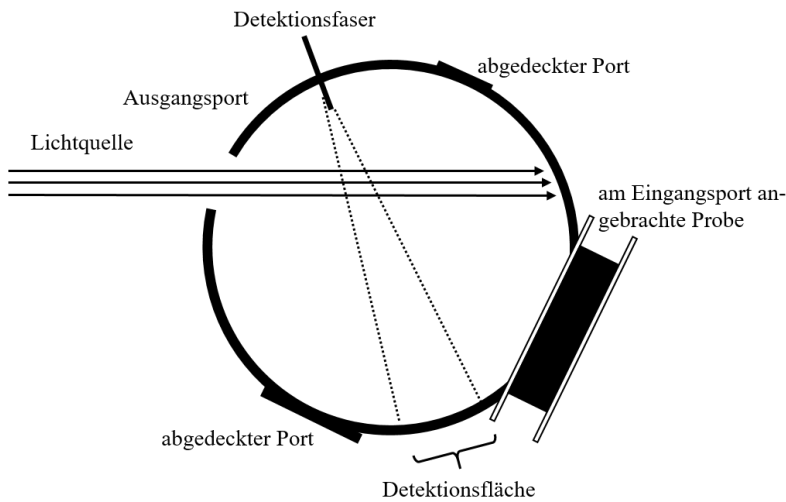


Abbildung 22: Referenzmessung für T_d und R_d

Eingangsport an der Rückseite der Kugel befand (siehe Abbildung 23). Das einfallende Licht der verwendeten Xenon-Bogenlampe trat somit durch den gegenüberliegenden Port ein und traf senkrecht auf die zu vermessende Probe. Der direkt reflektierte Lichtanteil (kollimierte Reflexion) konnte die Ulbrichtkugel am selbigen, der Probe gegenüberliegenden Port wieder ungehindert verlassen. Der innerhalb der Probe gestreut-reflektierte Anteil (diffuse Reflexion) des Lichts wurde mit Hilfe der Detektionsfaser erfasst und am Spektrometer als Wellenlängenspektrum Sig_{Rd} gemessen.

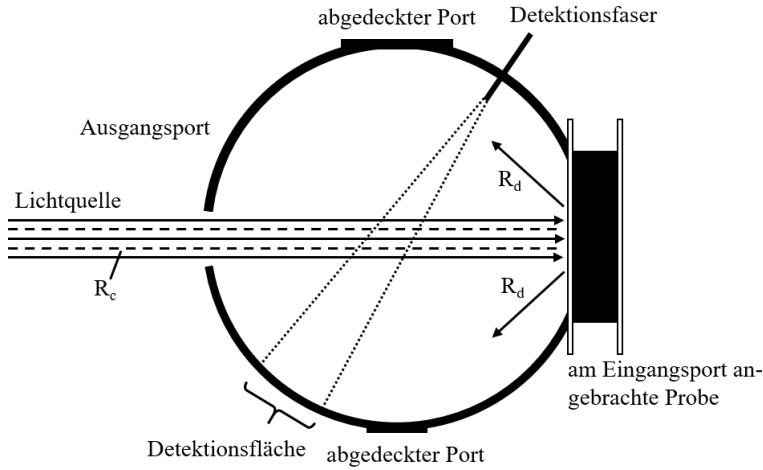


Abbildung 23: Messung der diffusen Reflexion

Anschließend wurde, wie bei der Bestimmung der diffusen Transmission, eine Dunkelmessung durchgeführt, mit welcher sich das Ergebnis für Bg_{Rd} ermitteln lassen konnte. Ref_{Rd} und $Bg_{ref,Rd}$ konnten wie beschrieben aus den Messungen der diffusen Transmission übernommen werden. Somit ergab sich aus den vier ermittelten Spektralmessungen und der Reflektivität R der Ulbrichtkugel-Beschichtung die Berechnung der diffusen Reflexion R_d wie folgt:

$$R_d = \frac{Sig_{Rd} - Bg_{Rd}}{Ref_{Rd} - Bg_{ref,Rd}} \cdot R \equiv \frac{I_{Rd}}{I_{ref,Rd}} \cdot R$$

Idealerweise sollte für die Messung der kollimierten Transmission lediglich der nicht abgelenkte Lichtanteil zur Messung in die Ulbrichtkugel gelangen. Dies gelang annähernd durch die Positionierung der präparierten Probe in einem weiter entfernten Abstand zur Ulbrichtkugel (siehe Abbildung 24). Somit konnten die diffus gestreuten Anteile des durchdringenden Lichts von der Messung weitestgehend ausgeschlossen werden. Wie bei den beiden vorherigen Messung zur diffusen Reflexion und diffusen Transmission wurden zur Bestimmung der kollimierten Transmission ebenfalls die Signal- und Dunkelmessungen mit ihren jeweiligen Referenzspektren aufgezeichnet. Für die Durchführung der Referenzmessungen wurde die Probe aus dem Strahlengang

entfernt. Aus den gewonnenen Ergebnissen ergab sich die Berechnung der kollimierten Transmission T_c wie folgt:

$$T_c = \frac{Sig_{coll} - Bg_{coll}}{Ref_{coll} - Bg_{ref,coll}} \equiv \frac{I_{coll}}{I_{ref,coll}}$$

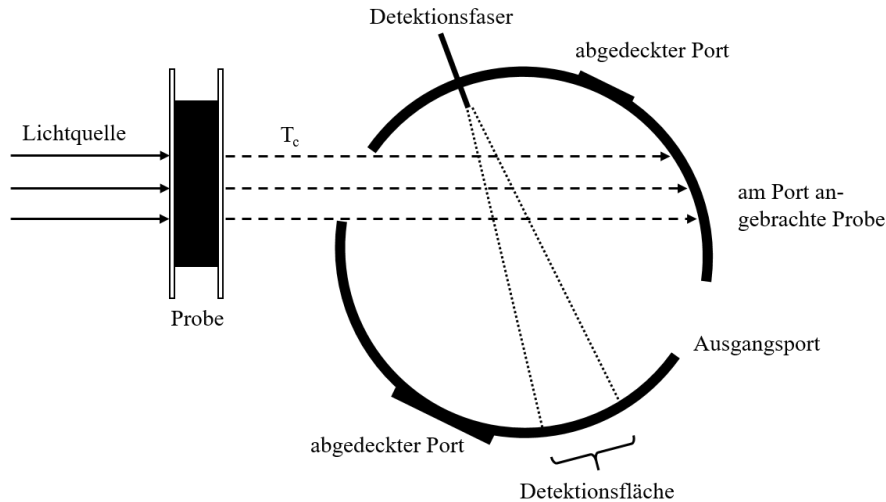


Abbildung 24: Messung der kollimierten Transmission

Während der Versuche zeigte sich, dass eine hinreichend genaue Bestimmung der kollimierten Transmission aufgrund des hohen Absorptionskoeffizienten des Cholesteatomgewebes nicht möglich war. Die Lichtintensität nach Beleuchten der Probe war hierbei für eine zuverlässige Messung mittels Ulbrichtkugel zu schwach, weshalb die kollimierte Transmission gleich 0 gesetzt wurde ($T_c = 0$).

3.4.4 Inverse-adding-doubling-Verfahren

Mit Hilfe des von Prahl entwickelten *Inverse-adding-doubling*-Verfahrens (IAD-Verfahren) ist es möglich, aus den Messdaten der diffusen Reflexion (R_D), der totalen Transmission ($T_{Tot} = T_d + T_c$) und der kollimierten Transmission (T_c) die optischen Eigenschaften μ_a , μ_s und g zu bestimmen. Hierzu werden zunächst willkürliche Startwerte für μ_a , μ_s und g angenommen. Im nächsten Schritt werden ausgehend von diesen Startwerten die Ergebnisse für R_d und T_{Tot} mittels Vorwärtsrechnung nach dem

Adding-doubling-Verfahren berechnet. Das Programm vergleicht anschließend die ermittelten mit den gemessenen Werten und bewertet den Grad der Übereinstimmung. Liegt ein unzureichender Übereinstimmungsgrad vor, werden die Startparameter für die optischen Eigenschaften so lange variiert, bis das bestmögliche Ergebnis erreicht wird (Prahl et al., 1993).

Wie bereits in 3.6.2 erwähnt, ließ sich die kollimierte Transmission für Cholesteatomgewebe nicht hinreichend bestimmen. Somit konnten als optische Parameter der Absorptionskoeffizient μ_a und der reduzierte Streukoeffizient $\mu_s' = (1 - g) \cdot \mu_s$ bestimmt werden. Um eine Berechnung des Streukoeffizienten μ_s zu ermöglichen, muss der Anisotropiefaktor g geschätzt werden. Hierfür wurden vorgegebene Werte aus der gängigen Literatur für entzündliche Epidermis herangezogen, welche sich zwischen $g = 0,7$ und $g = 0,9$ bewegen (Tuchin, 2007). Hierdurch ist eine Berechnung des Streukoeffizienten μ_s prinzipiell möglich. Die ermittelten Messergebnisse für μ_s stehen dabei allerdings in starker Abhängigkeit des geschätzten Anisotropiefaktors g , welcher bereits bei kleinen Änderungen zu großen Ergebnisschwankungen führt. Deshalb beschränken sich die Ergebnisse in dieser Arbeit auf die Angabe des Absorptions- und reduzierten Streukoeffizienten. Der reduzierte Streukoeffizient zeigte sich in anderen Experimenten weniger anfällig für eine Variation des Anisotropiefaktors (Eisel, 2015).

3.5 Statistik

Die Erstellung der Graphen erfolgte mittels Sigmaplot (Version 11.0, Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland).

Die Auswertung der bestimmten optischen Eigenschaften der Cholesteatomproben erfolgte deskriptiv anhand der ermittelten Werte für μ_a und μ_s' .

CO₂- und Diodenlaser wurden hinsichtlich ihrer Schäden am Zielgewebe miteinander verglichen und zusätzlich auf Unterschiede bei der Bestrahlung von

Cholesteatomgewebe im Gegensatz zur Bestrahlung von humanen Ossikeln untersucht.

Zum Vergleich der laserinduzierten Gewebeeffekte miteinander wurden unterschiedliche Kriterien herangezogen. Hierzu wurden mehrere Kurvenfits angelegt, wobei nur mittels Regressionsgerade ein entsprechender fit der Ergebnisse hergestellt werden konnte. Die ermittelten Regressionsgeraden von CO₂- und Diodenlaser wurden bezüglich ihrer Ablationstiefe, Ablationsfläche und der verursachten thermischen Schädigung in Abhängigkeit der emittierten Energie verglichen. Als Vergleichskriterien dienten das Bestimmtheitsmaß (R^2) der linearen Regression und die Steigung (m) der ermittelten Regressionsgeraden.

4. Ergebnisse

4.1 Bestimmung der optischen Eigenschaften des Cholesteatomgewebes

Zur Bestimmung der optischen Eigenschaften wurden vier Cholesteatome mit Hilfe der Ulbrichtkugel vermessen. Da sich das verwendete Cholesteatomgewebe bereits makroskopisch teils als sehr heterogen erwies, wurden in einer besonders auffälligen, größeren Probe (Probe 4) exemplarisch hämoglobinreiche (rot), hämoglobinfreie (weiß) und hämoglobinarne Areale (mix) jeweils einzeln vermessen. Der weiße, isoliert vermessene Bereich von Probe 4 wurde somit bei einer makroskopisch insgesamt hämoglobinreichen Probe im Vergleich zu den weiteren Arealen dieser Probe als weitgehend hämoglobinfrei eingestuft.

4.1.1 Vergleich des Absorptionskoeffizienten μ_a

Wie bereits in 1.3.2.1 beschrieben und in Abbildung 25 dargestellt, ist der *Absorptionskoeffizient* μ_a stark abhängig vom Hämoglobin- und Wassergehalt der jeweiligen Probe. Somit bot sich für den Vergleich der *Absorptionskoeffizienten* diese makroskopische Einteilung anhand des mutmaßlichen Hämoglobingehalts in hämoglobinfreie (weiß), hämoglobinarne (mix) und hämoglobinreiche Proben (rot) an.

Für alle Proben lag das Absorptionsmaximum im Wellenlängenbereich von ca. 400 - 430 nm. Im Spektralbereich von 430 nm bis 520 nm zeigte sich für alle spektralabhängigen Absorptionskurven jeweils ein deutlicher Absorptionsabfall. Für die hämoglobinreiche (P4 rot) und die hämoglobinarne Proben (P1 mix, P2 mix, P4 mix) war ein weiterer Absorptionsanstieg im Bereich von ca. 540 - 570 nm zu verzeichnen. Hier zeigte sich ein lokales Doppelmaximum bei 542 nm und 571 nm für die Proben P1 mix, P2 mix und P4 rot. Der hämoglobinarne Anteil von Probe 4 (P4 mix) zeigte ein singuläres lokales Maximum bei 560 nm. Das vermessene weiße Areal

von Probe 4 wies ebenfalls zwei lokale Maxima bei 542 nm und 571 nm vor. Der Anstieg der Absorptionswerte zeigte sich hier wesentlich geringer ausgeprägt als für die hämoglobinreicheren Areale von P4. Für die weitgehend hämoglobinfreie Probe 3 (P3 weiß) ergab sich kein Absorptionsanstieg in diesem Spektralbereich.

Im Wellenlängenbereich größer 580 nm zeigte sich für alle Proben eine weitere Abnahme des Absorptionskoeffizienten.

Im Vergleich der absoluten Messwerte ließen sich im roten Anteil von Probe 4, wie auch beim weißen und gemischten Areal von Probe 4, wesentlich höhere Absorptionswerte im Gegensatz zu den anderen Proben verzeichnen (siehe Abbildung 25). Die niedrigsten Absorptionswerte wurden für die hämoglobinarne Probe 2 (P2 mix) ermittelt.

Im direkten Vergleich aller Gewebeprobenbereiche innerhalb von Probe 4 zeigten sich die höchsten Absorptionswerte für das hämoglobinreiche Areal (rot), wohingegen die geringsten Absolutwerte für den weitgehend hämoglobinfreien Bereich (weiß) erzielt wurden. Die Messwerte für das hämoglobinarne Areal (mix) bewegten sich dazwischen (siehe Abbildung 25).

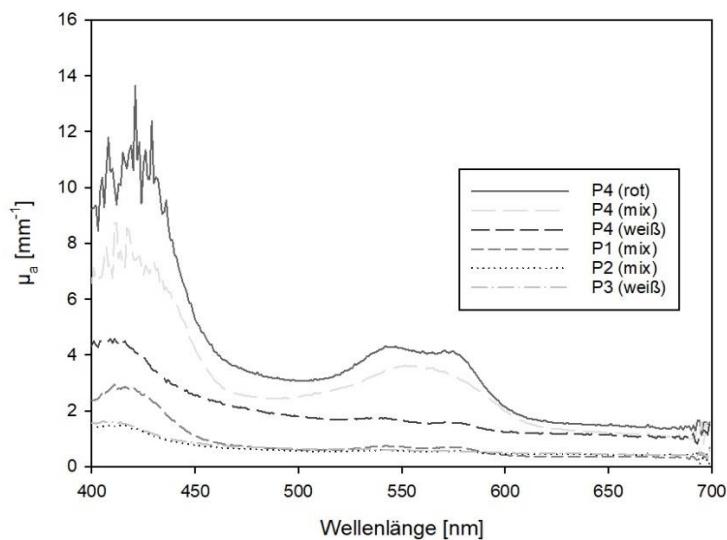


Abbildung 25: Absorptionskoeffizient μ_a der vermessenen Proben mit Aufschlüsselung anhand des makroskopischen Erscheinungsbildes

4.1.2 Vergleich des reduzierten Streukoeffizienten μ_s'

Wie bereits in Abschnitt 1.3.2.2 beschrieben, finden Streuprozesse beim Durchlaufen eines Gewebes an unterschiedlichsten Gewebe- und Zellbestandteilen statt (Wang & Wu, 2007). Die genaue histologische Beschaffenheit des Gewebes konnte vor Bestimmung der optischen Eigenschaften nicht ermittelt werden, weshalb hier eine Einteilung anhand der Gewebebeschaffenheit nicht möglich war. Aus diesem Grunde wurde die bereits in Abschnitt 4.1.1 eingeführte Nomenklatur mit Einteilung nach dem makroskopisch anzunehmenden Hämoglobingehalt beibehalten.

Die Maximalwerte des reduzierten Streukoeffizienten für alle gemessenen Proben wurden im Spektralbereich von ca. 400 - 430 nm ermittelt (siehe Abbildung 26).

Ein erneuter Anstieg des reduzierten Streukoeffizienten konnte nur für den hämoglobinarmlen und hämoglobinreichen Anteil der Probe 4 nachgewiesen werden (P4 mix und P4 rot). Im Kurvenverlauf des hämoglobinreichen Anteils von Probe 4 (P4 rot) zeigte sich ein doppeltes lokales Maximum bei 543 nm und 569 nm. Für den hämoglobinarmlen Anteil von Probe 4 (P4 mix) konnte ein lokales Maximum bei 555 nm nachgewiesen werden. Für den weitgehend hämoglobinfreien Anteil von Probe 4 konnte kein erneuter Anstieg des reduzierten Streukoeffizienten festgestellt werden. Hier konnte, wie auch bei den hämoglobinarmlen Proben P1 mix und P2 mix sowie bei der hämoglobinfreien Probe 3 (P3 weiß), im Anschluss an das erste lokale Maximum ein kontinuierlicher Abfall des reduzierten Streukoeffizienten festgestellt werden (siehe Abbildung 26).

Die Messwerte für den reduzierten Streukoeffizienten wiesen im Bereich von ca. 690 - 700 nm ausgeprägte Messwertschwankungen auf, wobei sich hier für das hämoglobinreiche und hämoglobinarmlen Areal von Probe 4 (P4 rot und P4 mix) die geringsten Schwankungen zeigten (siehe Abbildung 26).

Hinsichtlich der Absolutwerte zeigte sich ein heterogener Kurvenverlauf. Im Wellenlängenbereich von 400 nm bis 600 nm ergaben sich die höchsten Werte des reduzierten Streukoeffizienten für das hämoglobinarmlen Areal der Probe 4 (P4 mix). Ab ca. 600 nm ließen sich die höchsten Werte bis 700 nm für das hämoglobinfreie

Areal von Probe 4 (P4 weiß) bestimmen. Das hämoglobinreiche Areal von Probe 4 (P4 rot) zeigte sich zu Beginn der Messwerte bis ca. 450 nm zwischen den Werten für P4 mix und P4 weiß, lieferte im weiteren Verlauf ab ca. 450 nm im direkten Vergleich für Probe 4 die geringsten Werte für den reduzierten Streukoeffizienten. Ab ca. 570 nm zeigte sich eine deutliche Annäherung der Kurven von P4 rot und P4 mix. Die geringsten Werte für den reduzierten Streukoeffizienten wies die hämoglobinarmer Probe 1 auf (siehe Abbildung 26).

Im direkten Vergleich der Graphen für μ_s' war ein ähnlicher Kurvenverlauf der Proben P4 weiß, P3 weiß, P2 mix und P1 mix zu erkennen. Diese wiesen jeweils ein erstes lokales Maximum ohne starke Messwertschwankungen vor. Die Kurven P4 mix und P4 rot unterschieden sich in ihrer Form und in ihrem Verlauf deutlich von den oben genannten. Besonders auffällig waren hierbei die starken Schwankungen beim ersten lokalen Maximum sowie die lokalen Maxima im Bereich von 530 – 580 nm für P4 rot und für P4 mix (siehe Abbildung 26).

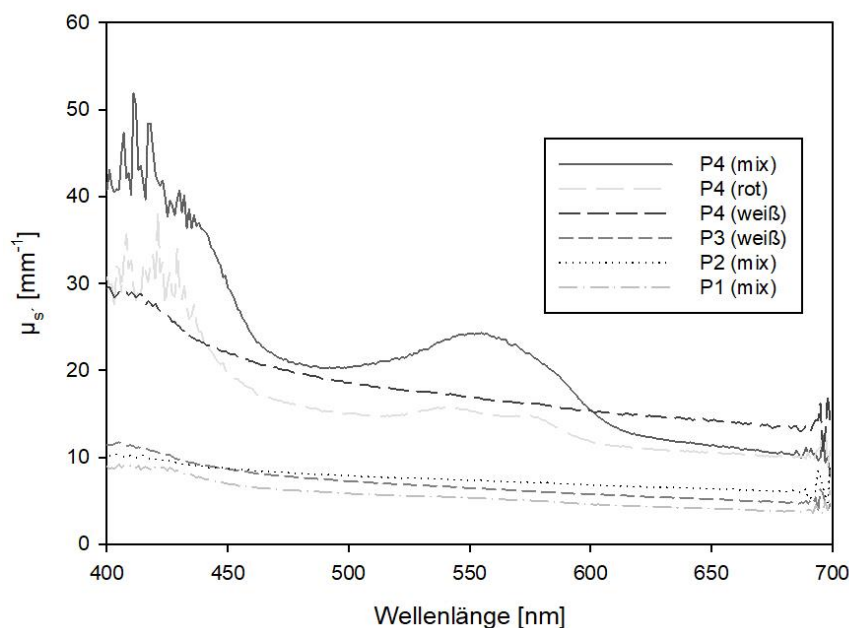


Abbildung 26: reduzierter Streukoeffizient μ_s' aller vermessenen Proben mit Aufschlüsselung anhand des makroskopischen Erscheinungsbildes

4.2 Laseranwendung am Zielgewebe

4.2.1 Thermische Wechselwirkungen mit dem Zielgewebe

4.2.1.1 Auswertung der Karbonisations- plus Vakuolisierungszone

Die Breite der Karbonisations- plus Vakuolisierungszone (KZ+VZ) (mit Mittelwert- und Standardabweichung) wurde in Abhängigkeit zur applizierten Energie des Lasers dargestellt. Beide Laser erzeugten bei ansteigender applizierter Energie einen breiteren Karbonisations- plus Vakuolisierungsbereich im Gewebe (siehe Abbildung 27 und 28). Insgesamt zeigte der Diodenlaser eine größere Streuung der Messwerte. Das Bestimmtheitsmaß (R^2) der linearen Regression lag für den Diodenlaser (12,9 %) niedriger als beim CO₂-Laser (29 %). Die total applizierte Energie war bei den ausgewählten Messwerten für den Diodenlaser durchschnittlich ca. um den Faktor 23 größer als für den CO₂-Laser. Vergleicht man die Regressionsgeraden beider Schaubilder miteinander, so wird deutlich, dass beim CO₂-Laser bereits eine geringe Änderung der Energie im Bereich von 0,2 – 1,5 J zu einer Verbreiterung der Zone um ca. 71 % führte, wohingegen sich die Zonenbreite beim Diodenlaser in einem Energiebereich von 4,8 – 27 J um ca. 56% vergrößerte (siehe Abbildungen 27 - 29). Dementsprechend zeigte sich eine größere Steigung der Regressionsgeraden für die Breite der Karbonisations- plus Vakuolisierungszone bei Anwendung des CO₂-Lasers ($m \approx 20,1$) gegenüber der Steigung der Regressionsgeraden unter Anwendung des Diodenlasers ($m \approx 2,7$).

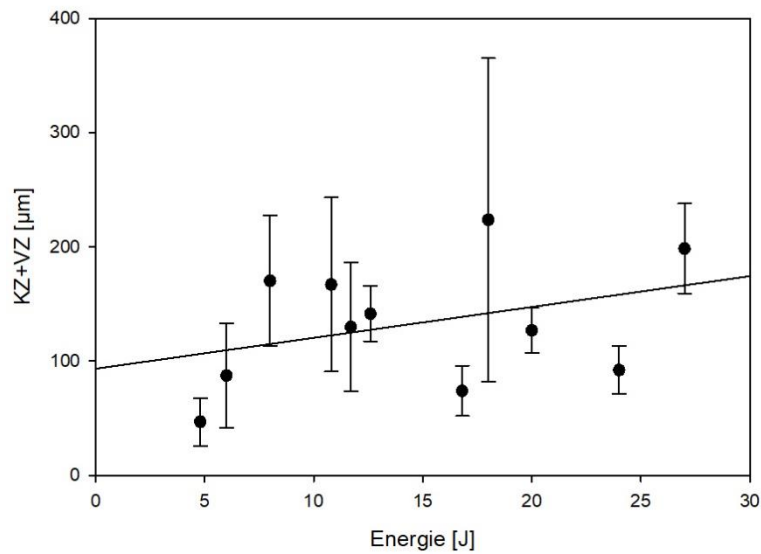


Abbildung 27: Diodenlaser: Breite der zusammengeführten Karbonisations- plus Vakuolisierungszonen in Abhängigkeit der Energie bei Applikation am Cholesteatomgewebe

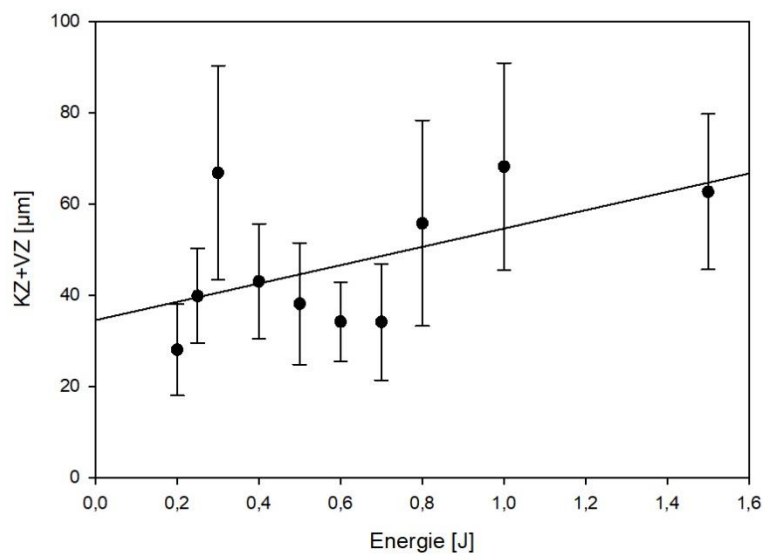


Abbildung 28: CO₂-Laser: Breite der zusammengeführten Karbonisations- plus Vakuolisierungszonen in Abhängigkeit der Energie bei Applikation am Cholesteatomgewebe

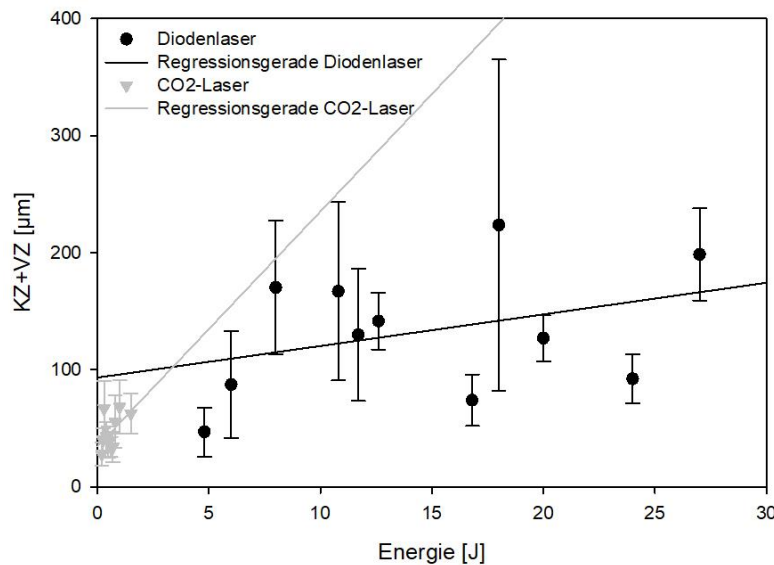


Abbildung 29: Vergleich CO₂ - und Diodenlaser: Breite der zusammengeführten Karbonisations- plus Vakuolisierungszonen in Abhängigkeit der Energie bei Applikation am Cholesteatomgewebe

4.2.1.2 Auswertung der gesamten thermischen Schädigung (Gesamtzone)

Die Breite der gesamten laserinduzierten thermischen Gewebeschädigung (Gesamtzone = GZ) (mit Mittelwert und Standardabweichung) wurde in Abhängigkeit von der applizierten Energie dargestellt.

Der Diodenlaser zeigte hier tendenziell eine geringfügige Abnahme der Zonenbreite der gesamten thermischen Schädigung mit Zunahme der angelegten Energie (siehe Abbildung 30). Die applizierte Energie war für den Diodenlaser durchschnittlich ca. um den Faktor 21 größer als für den CO₂-Laser.

Der CO₂-Laser erzeugte eine Gesamtzonenverbreiterung mit Anstieg der angelegten Energie (siehe Abbildung 31). Die Messwerte wiesen im Gegensatz zur Auswertung beim Diodenlaser eine etwas geringere Streuung um die Regressionsgerade auf. Das Bestimmtheitsmaß (R^2) der linearen Regression erwies sich für den Diodenlaser (51,7 %) niedriger als für den CO₂-Laser (76,1 %).

Im Vergleich der beiden Regressionsgeraden führte auch für die Breite der Gesamtzone bereits eine geringe Änderung der Energie des CO₂-Lasers im Bereich von 0,2 – 2 J zu einer Vergrößerung der Gesamtzone um ca. 144 %, wohingegen sich die Zonenbreite beim Diodenlaser im Energiebereich von 6 – 27 J um ca. 25 % verkleinerte (siehe Abbildungen 30 – 32). Dementsprechend zeigte sich eine deutliche größere Steigung der Regressionsgeraden für die Breite der Gesamtzone bei Anwendung des CO₂-Lasers ($m \approx 70,7$) gegenüber der Steigung der Regressionsgeraden unter Anwendung des Diodenlasers ($m \approx -7,1$).

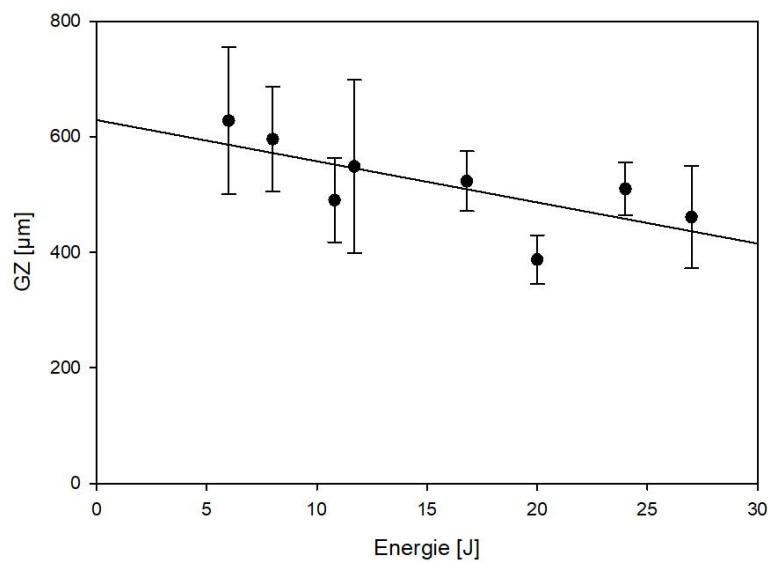


Abbildung 30: Diodenlaser: Breite der gesamten thermischen Schäden in Abhängigkeit der Energie bei Applikation am Cholesteatomgewebe

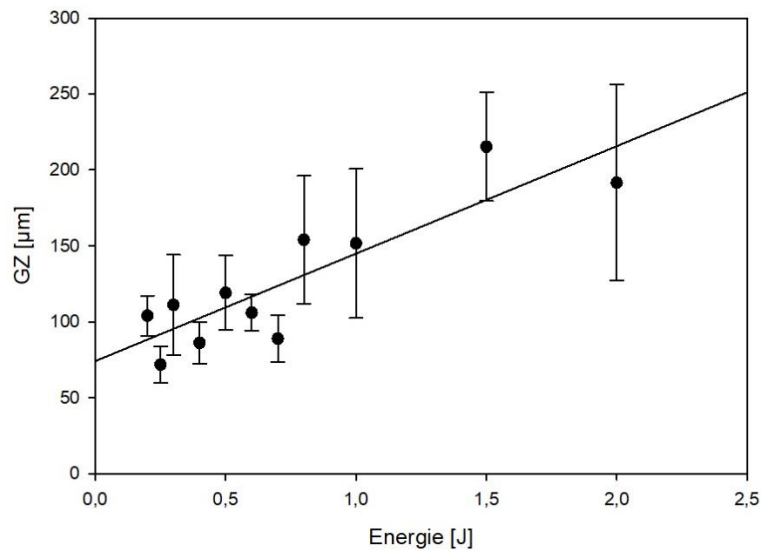


Abbildung 31: CO₂-Laser: Breite der gesamten thermischen Schäden in Abhängigkeit der Energie bei Applikation am Cholesteatomgewebe

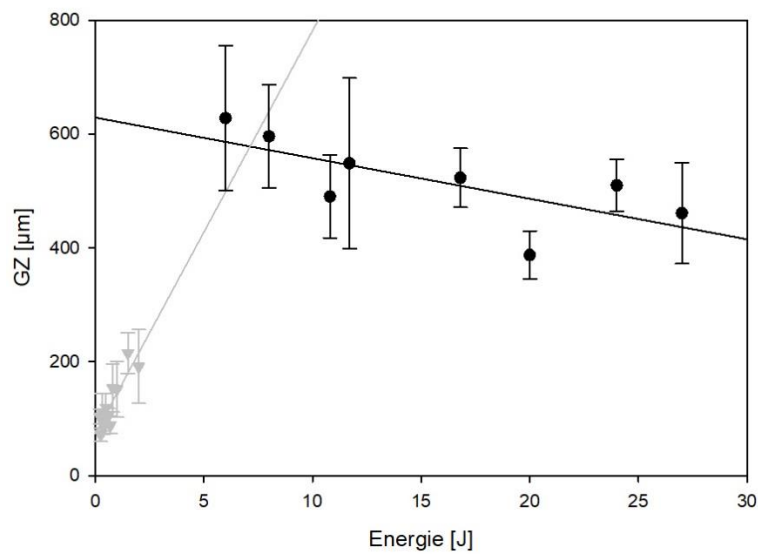


Abbildung 32: Vergleich CO₂ - und Diodenlaser: Breite der gesamten thermischen Schäden in Abhängigkeit der Energie bei Applikation am Cholesteatomgewebe

4.2.2 Bestimmung der Ablationsfläche

Sowohl für den CO₂- als auch für den Diodenlaser konnte eine Vergrößerung der Ablationsfläche bei Erhöhung der applizierten Energie ermittelt werden (siehe Abbildung 33). Beim Vergleich der Regressionsgeraden fiel auf, dass sich die Ablationsflächen der beiden verwendeten Laser am Zielgewebe bei Extrapolation der Werte für den CO₂-Laser bei ähnlich gewählter Spotgröße (430 µm für den CO₂-Laser, 400 µm für den Diodenlaser) nur gering unterschieden (siehe Abbildung 33). Entsprechend zeigte sich die Steigung der beiden Regressionsgeraden mit $m = 0,029$ für den CO₂-Laser und $m = 0,022$ für den Diodenlaser nahezu identisch. Das Bestimmtheitsmaß (R^2) der linearen Regression erwies sich für den Diodenlaser (24,5%) niedriger als für den CO₂-Laser (63,6%).

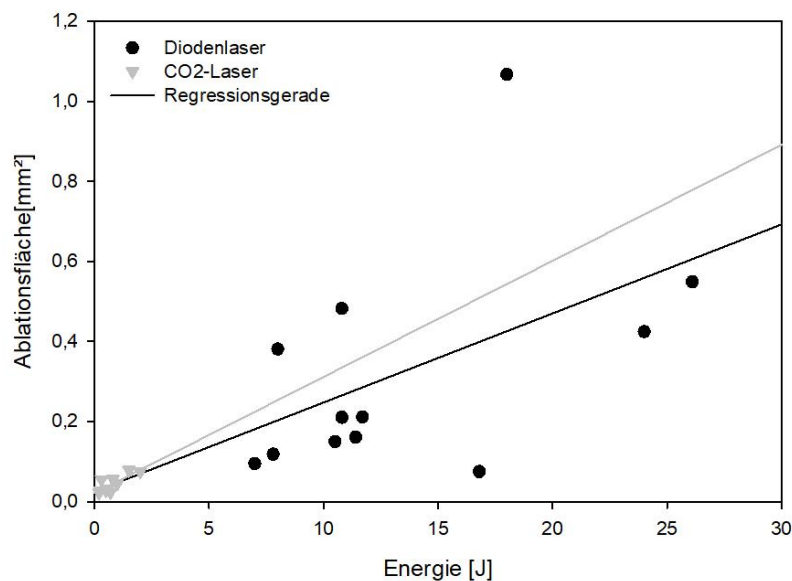


Abbildung 33: Kryohistologische Schnitte: Vergleich CO₂- und Diodenlaser: Ablationsfläche in Abhängigkeit der Energie

4.2.3 Bestimmung der Ablationstiefe an Cholesteatom und Gehörknöchelchen

4.2.3.1 Laseranwendung am Cholesteatom - Messung der Ablationstiefe mittels kryohistologischer Auswertung

Die Messwerte für die Ablationstiefenbestimmungen ergaben sich durch die Messung einer einzelnen Laserapplikation am Zielgewebe. Die Ungenauigkeit durch die in 3.3.2.1 beschriebene Methodik von maximal + 27 µm bzw. + 28 µm Tiefe aufgrund der erzeugten Leerschnitte wurde in den Schaubildern vernachlässigt. Bei der großen Streuung der ermittelten Kratertiefen in Abhängigkeit der applizierten Energie wird anhand der Regressionsgeraden für beide verwendeten Laser eine Steigerung der Tiefe des Ablationskraters mit ansteigender Energie erkennbar (siehe Abbildung 34 - 36). Die Streuung der Kratertiefen bei Verwendung des Diodenlasers führt dazu, dass das Bestimmtheitsmaß der linearen Regression für den Diodenlaser geringer als für den CO₂-Laser ($R^2_{\text{Diodenlaser}} = 23,8\%$ vs. $R^2_{\text{CO}_2\text{-Laser}} = 30,3\%$) ausfällt. Der Vergleich der beiden Regressionsgeraden zeigt den Unterschied in der Zunahme der Ablationstiefe in Abhängigkeit der applizierten Energie. So wird bei CO₂-Laseranwendung bereits bei sehr geringen Energieänderungen im Bereich von 0,2 – 2 J eine deutliche Zunahme der Ablationstiefe deutlich, während für einen entsprechenden Tiefenzuwachs für den Diodenlaser eine wesentlich höhere Energieänderung notwendig war. Entsprechend ist die Steigung der Regressionsgeraden für den CO₂-Laser mit $m = 550$ deutlich größer als für den Diodenlaser mit $m = 65$.

Beim CO₂-Laser fiel auf, dass in 7 von 11 Anwendungen und bereits bei geringer applizierter Energie eine komplette Perforation erfolgte. Eine Bestimmung der Tiefenausdehnung des Kraters war somit nicht möglich. Die Kratertiefen bzw. die perforierte Gewebeschichtdicke sind in diesen Fällen als Mindesttiefe zu betrachten und dementsprechend in den Abbildungen hervorgehoben (siehe Abbildungen 35 und 36). Es ist anzunehmen, dass die Steigung der Regressionsgeraden für den CO₂-Laser unter der Möglichkeit einer vollständigen Tiefenbestimmung gegebenenfalls größer ausfallen würde.

Für den Diodenlaser war die Anzahl der vollständigen Gewebep perforationen anteilig an der Gesamtzahl der Messungen geringer (6 vollständige Perforationen bei insgesamt 39 Messwerten). Die Bewertung der vollständigen Perforationen erfolgte wie beim CO₂-Laser beschrieben und diese sind entsprechend in den Abbildungen gekennzeichnet (siehe Abbildungen 34 und 36).

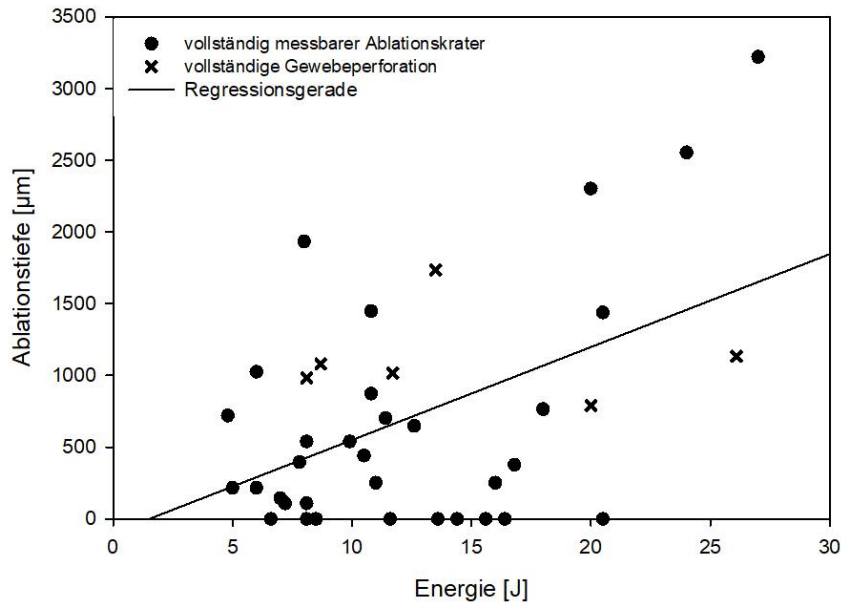


Abbildung 34: Diodenlaser - kryohistologische Schnitte: induzierte Ablationstiefe in Abhängigkeit der Energie bei Applikation am Cholesteatom

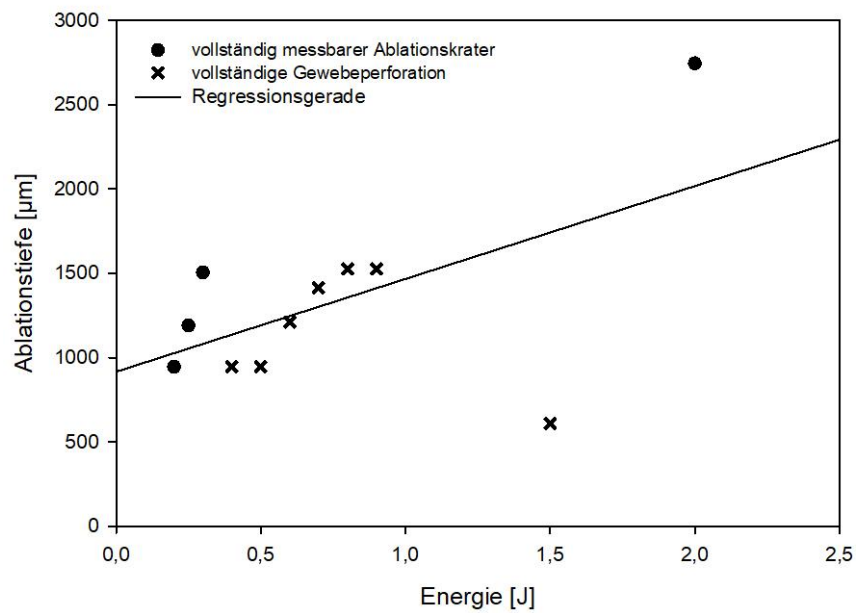


Abbildung 35: CO₂-Laser - kryohistologische Schnitte: induzierte Ablationstiefe in Abhängigkeit der Energie bei Applikation am Cholesteatom

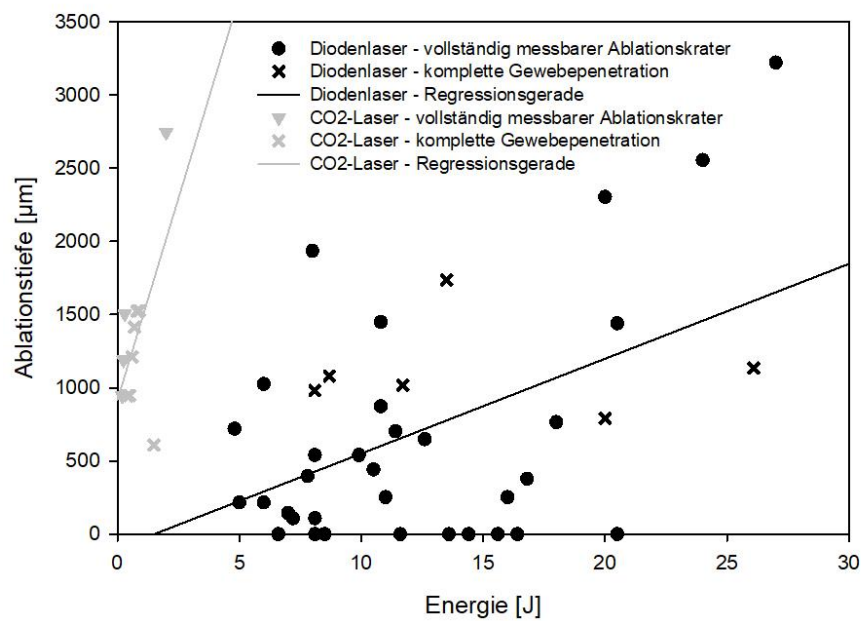


Abbildung 36: kryohistologische Schnitte: Vergleich zwischen induzierten Ablationstiefen von CO₂- und Diodenlaser in Abhängigkeit der Energie

4.2.3.2 Laseranwendung am Cholesteatom - Messung der Ablationstiefe mittels optischer Kohärenztomographie

In Abbildung 37 und 38 sind die mittels OCT ermittelten Kratertiefen (mit Mittelwert und Standardabweichung) dargestellt. Bei drei Ablationen lag eine vollständige Gewebeporforation vor. Diese sind als Mindesttiefe zu sehen und wurden ebenfalls entsprechend in den Abbildungen gekennzeichnet.

Es zeigte sich für beide Laser eine Vergrößerung der Ablationstiefe mit steigender Energie. Sofern aufgrund der geringeren Anzahl an Messwerten beurteilbar, wies der Diodenlaser auch hier wiederum eine stärkere Streuung der Messwerte auf (siehe Abbildungen 37 - 39). Entsprechend ergab das Bestimmtheitsmaß (R^2) der linearen Regression für den Diodenlaser (8,6%) einen deutlich niedrigeren Wert als für den CO₂-Laser (77,5%). Im Vergleich der beiden Regressionsgeraden zeigte sich die ausgeprägte Tiefenwirkung des CO₂-Lasers bei geringer applizierter Energie im Bereich von 0,2 – 0,5 J, wobei für das Erreichen einer vergleichbaren Ablationstiefe für den Diodenlaser wesentlich mehr Energie appliziert werden musste (siehe Abbildungen 37 - 39). Dies wird durch eine deutlich größere Steigung der Regressionsgeraden der CO₂-Laseranwendung im Vergleich zur Diodenlaseranwendung deutlich ($m_{\text{CO}_2\text{-Laser}} = 973,147$ vs. $m_{\text{Diodenlaser}} = 17,042$).

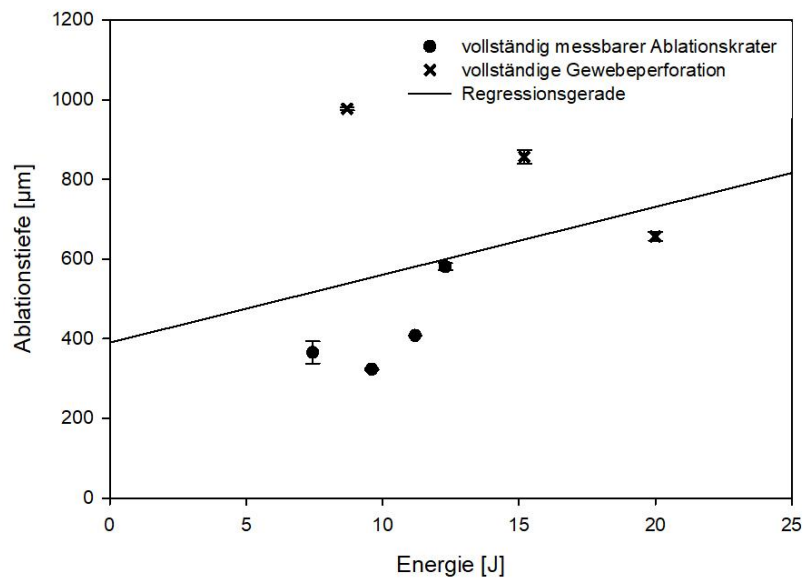


Abbildung 37: Diodenlaser - OCT: induzierte Ablationstiefe in Abhängigkeit der Energie bei Applikation am Cholesteatom

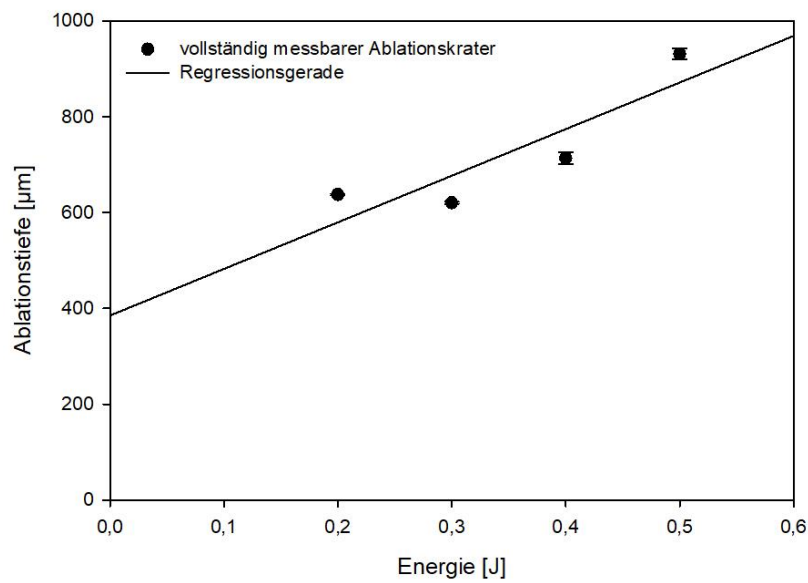


Abbildung 38: CO₂-Laser - OCT: induzierte Ablationstiefe in Abhängigkeit der Energie bei Applikation am Cholesteatom

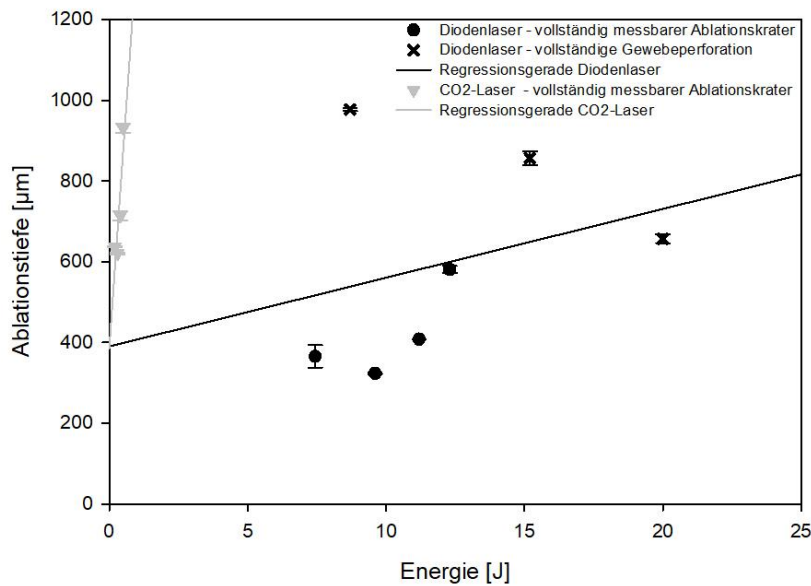


Abbildung 39: OCT: Vergleich zwischen induzierten Ablationstiefen von CO₂- und Diodenlaser in Abhängigkeit der Energie bei Applikation am Cholesteatom

4.2.3.3 Methodikvergleich: kryohistologische Schnittbildgebung versus OCT-Aufnahmen

Für den direkten Vergleich der beiden Messmethoden zur Bestimmung der Ablationstiefe konnten drei durch den Diodenlaser verursachte Ablationskrater sowohl mittels kryohistologischer Schnittbildgebung als auch mit Hilfe der OCT-Aufnahmen ausgewertet werden. Hier zeigten sich die Messwerte für die kryohistologischen Schnitte um durchschnittlich $+100 \mu\text{m} \pm 30 \mu\text{m}$ bzw. $+13 \% \pm 3 \%$ tiefer als die Messwerte, welche durch die OCT bestimmt wurden. Die Messwerte für die Kryoschnitte waren dabei stets größer als die ermittelten Messwerte der OCT-Auswertung. Zusätzlich zu dieser ermittelten durchschnittlichen Abweichung bestand durch die gewählte Methodik in der Anfertigung der kryohistologischen Schnitte eine zusätzliche maximale Ungenauigkeit der Ablationstiefe von $+27 \mu\text{m}$ bzw. $+28 \mu\text{m}$ aufgrund der drei bzw. vier nicht aufgezogenen Schnitte à $9 \mu\text{m}$ bzw. $7 \mu\text{m}$ (Leerschnitte) (siehe 3.3.2.1). Bezogen auf den Mittelwert aller durch Kryoschnitte

gemessenen Ablationstiefen für den Diodenlaser am Cholesteatom ergibt sich aufgrund der Leerschnitte somit ein systematischer Fehler von ca. 4 %. Für die ermittelten Ablationstiefen des CO₂-Lasers liegt der systematische Fehler der Kryoschnitte bezogen auf den Mittelwert bei ca. 2 %. Exemplarisch liegt der systematische Fehler für den tiefsten ermittelten Ablationskrater durch den Diodenlaser am Cholesteatom bei ca. 1 %. Für den kleinsten ermittelten Ablationskrater bei ca. 25 %. Für den CO₂-Laser liegt der systematische Fehler für den tiefsten bzw. kleinsten ermittelten Krater entsprechend bei ca. 1 % bzw. ca. 5 %. Im Vergleich hierzu ergibt sich der systematische Fehler für die Erhebung der Ablationstiefe mittels OCT aus den drei durchgeführten Messungen pro Ablationskrater und den hierfür ermittelten Mittelwerten inklusive Standardabweichung (siehe 3.3.4.2). Der systematische Fehler für den Diodenlaser beträgt somit bezogen auf die durchschnittliche Standardabweichung und den Mittelwert aller bestimmten Ablationstiefen mittels OCT ca. 2 %. Für die OCT-Messungen des CO₂-Lasers liegt der systematische Fehler bei ca. 1 %. Der höchste ermittelte systematische Fehler lag für den Diodenlaser bei ca. 8 %, für den CO₂-Laser bei ca. 2 %.

4.2.3.4 Lasereinsatz am Gehörknöchelchen – Messung der Ablationstiefe mittels optischer Kohärenztomographie

Der Diodenlaser verursachte im gewählten Energiebereich bei 10 von 12 Bestrahlungen keinen makroskopischen oder mit dem OCT darstellbaren Schaden. Die beiden schadhafte Stellen bei einer Energieanwendung von 23 J mit einem induzierten Ablationskrater von 225,2 µm Tiefe und 16 J mit einer Kratertiefe von 63,7 µm entstanden beide an einem Gehörknöchelchen mit kongenitaler Fehlbildung. An diesem Gehörknöchelchen fanden drei weitere Diodenlaserapplikationen statt (13,6 J, 15,6 J und 23 J), welche allesamt keinerlei Schäden am selbigen Ossikel hervorriefen (siehe Abbildung 40).

Beim CO₂-Laser konnte im gewählten Energiebereich von 0,15 – 0,45 J eine deutliche Zunahme der Ablationstiefe mit Anstieg der emittierten Energie verzeichnet werden (siehe Abbildung 41). Entsprechend zeigte sich eine erheblich größere Steigung der Regressionsgeraden bei Anwendung des CO₂-Lasers ($m = 649$) im Vergleich zur Diodenlaseranwendung ($m = 2$). Das Bestimmtheitsmaß der linearen Regression ergab für den Diodenlaser $R^2 = 3,9\%$ und für den CO₂-Laser $R^2 = 66,4\%$.

Im direkten Vergleich der beiden Regressionsgeraden wurde die wesentlich höhere Schädigung der Ossikel durch den CO₂-Laser selbst bei den gewählten sehr niedrigen Energien nochmals deutlich sichtbar (siehe Abbildung 42).

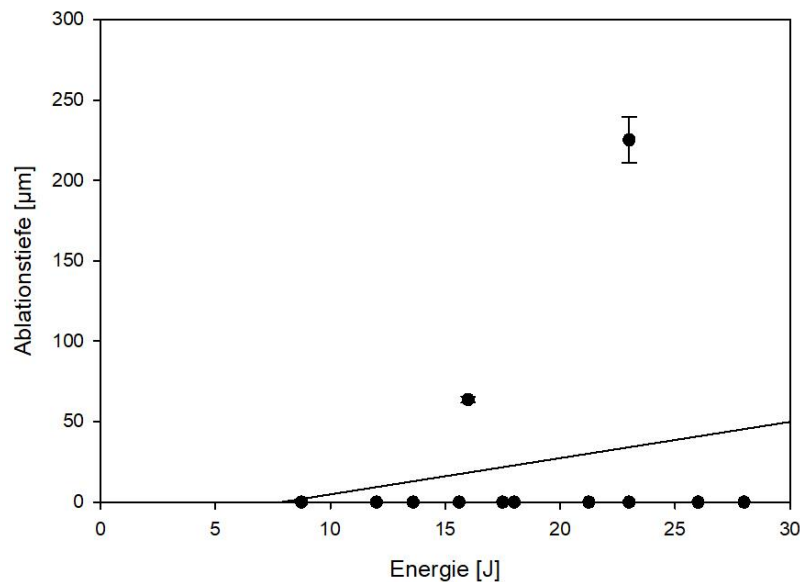


Abbildung 40: Diodenlaser - OCT: induzierte Ablationstiefe in Abhängigkeit der Energie bei Applikation am Gehörknöchelchen

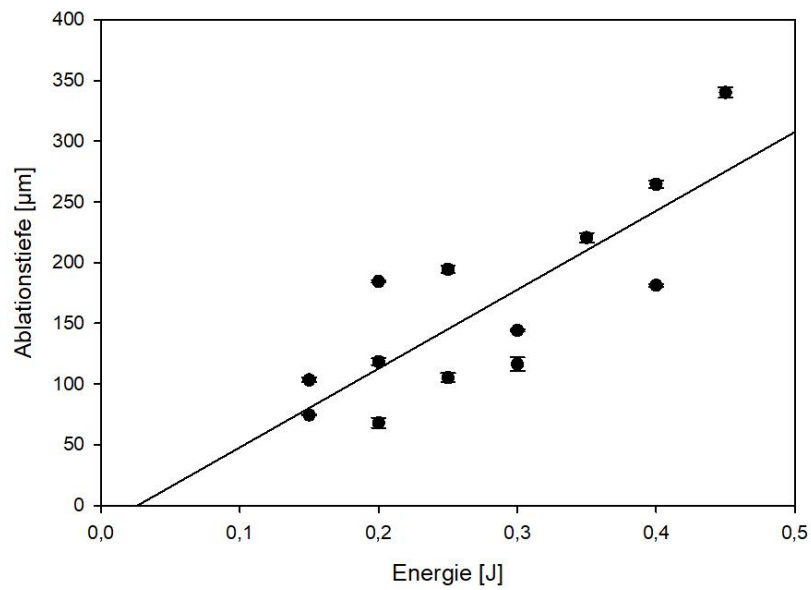


Abbildung 41: CO₂-Laser - OCT: induzierte Ablationstiefe in Abhängigkeit der Energie bei Applikation am Gehörknöchelchen

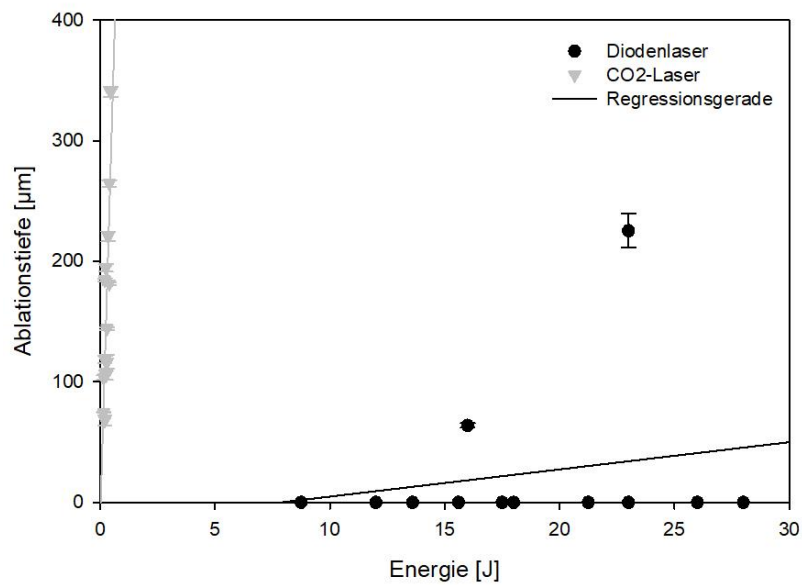


Abbildung 42: OCT: Vergleich zwischen induzierten Ablationstiefen von CO₂- und Diodenlaser in Abhängigkeit der Energie bei Applikation am Gehörknöchelchen

4.2.3.5 Vergleich der verursachten Schäden an Cholesteatom und Ossikel durch CO₂- und Diodenlaser

Abschließend zur Analyse der durch Laserbestrahlung hervorgerufenen Schäden findet sich in den Tabellen 7 und 8 eine Übersicht der Ergebnisse anhand der durchschnittlichen Werte der Regressionsgeraden bei der idealisierten Annahme eines linearen Verlaufs. Hierzu wurde die emittierte Energie der einzelnen Laser bestimmt, welche zur Ablation einer vorgegebenen Tiefe nötig war, und die zugehörigen entstehenden Kollateralschäden bei Bestrahlung des Gewebes mit dieser Energie ermittelt. Die hier angegebenen Daten wurden den jeweiligen Regressionsgeraden entnommen und entsprechend einem Energiebereich ausgewählt, für welchen tatsächliche Laserapplikationen am Zielgewebe stattfanden. Eingeklammerte Werte befinden sich außerhalb des tatsächlich applizierten Energiebereichs, wurden ebenfalls anhand der Regressionsgeraden bestimmt und gelten dementsprechend für die Annahme eines weiteren linearen Verlaufs. Für die Ablationstiefe ergeben sich die Werte aus den gemischten Werten der kryohistologischen Ablationstiefenbestimmung und der Tiefenbestimmung aus den OCT-Aufnahmen.

Aus Tabelle 7 und 8 wird deutlich, dass die mit dem Diodenlaser induzierte Gesamtschädigung am Weichgewebe relativ groß ausfällt bei gleichsam geringen Schädigungen am knöchernen Gewebe. Im Vergleich dazu erscheint diese Beobachtung bei CO₂-Laseranwendungen eher umgekehrt.

Tabelle 7: Übersicht Diodenlaser - entstehende Kollateralschäden bei unterschiedlichen Ablationstiefen anhand der Regressionsgeraden

Diodenlaser					
Ablationstiefe am Cholesteatom	applizierte Energie	Ablationsfläche	Karbonisations- & Vakuolisierungszone	Gesamtzone	Ablationstiefe am Ossikel
800 µm	13,9 J	0,33 mm ²	130,9 µm	529,6 µm	13,6 µm
1000 µm	17,1 J	0,41 mm ²	139,5 µm	506,8 µm	20,8 µm
1200 µm	20,3 J	0,48 mm ²	148,2 µm	484 µm	28 µm
1400 µm	23,5 J	0,55 mm ²	156,8 µm	461,2 µm	35,2 µm
1600 µm	26,7 J	(0,62 mm ²)	165,4 µm	438,4 µm	42,4 µm
1800 µm	29,9 J	(0,69 mm ²)	(174,1 µm)	(415,6 µm)	(49,6 µm)

Tabelle 8: Übersicht CO₂-Laser - entstehende Kollateralschäden bei unterschiedlichen Ablationstiefen anhand der Regressionsgeraden

CO ₂ -Laser					
Ablationstiefe am Cholesteatom	applizierte Energie	Ablationsfläche	Karbonisations- & Vakuolisierungszone	Gesamtzone	Ablationstiefe am Ossikel
800 µm	0,1 J	0,02 mm ²	36,5 µm	81,2 µm	47,9 µm
1000 µm	0,4 J	0,03mm ²	42,5 µm	102,4 µm	242,7 µm
1200 µm	0,7 J	0,04 mm ²	48,5 µm	123,7 µm	(437,5 µm)
1400 µm	1 J	0,05 mm ²	54,6 µm	144,9 µm	(632,3 µm)
1600 µm	1,3 J	0,06 mm ²	60,6 µm	166,1 µm	(827,2 µm)
1800 µm	1,6 J	0,07 mm ²	(66,6 µm)	187,3 µm	(1022 µm)

5. Diskussion

5.1 optische Eigenschaften

Als absorbierende Medien innerhalb eines Gewebes fungieren vor allem Hämoglobin, Melanin und Wasser (Wang und Wu 2007). Betrachtet man die Absorptionseigenschaften von Hämoglobin findet sich ein lokales Maximum im Wellenlängenbereich von ca. 400 - 450 nm mit einem anschließenden Abfall der Werte für den Absorptionskoeffizienten bis ca. 500 nm. Im Anschluss zeigt sich ein weiteres lokales Maximum für Desoxyhämoglobin im Bereich zwischen 550 - 560 nm bzw. für Oxyhämoglobin ein Doppelmaximum bei ca. 540 nm und 575 nm. Die Absorptionskurve fällt im Anschluss ab bis zu einem anschließenden erneuten Anstieg bei ca. 700 nm (siehe Abbildungen 43 und 44) (Friebel et al., 2006; Furukawa & Fukuda, 2012; Grevers, 2001; Meng & Alayash, 2017; Vogel & Venugopalan, 2003). Dieser charakteristische Kurvenverlauf zeigt sich ebenfalls in den Absorptionskurven für die Cholesteatomproben mit höherem Hämoglobingehalt (vgl. 4.1.1).

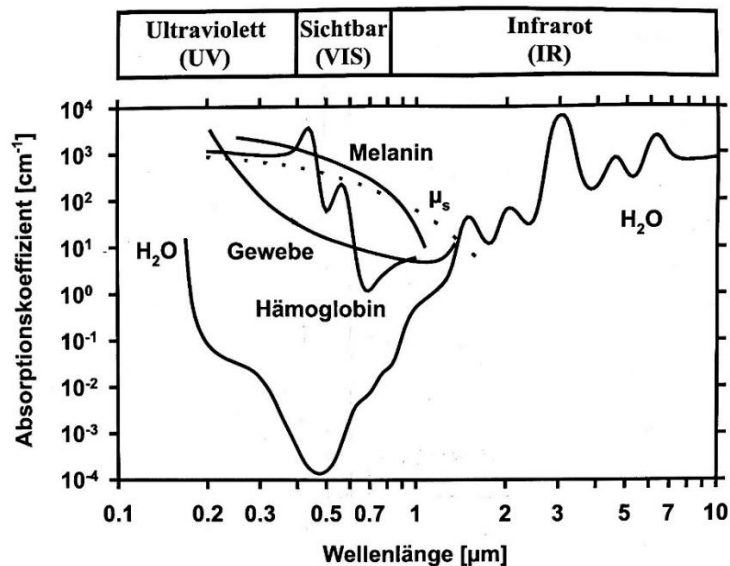


Abbildung 43: Absorptionseigenschaften verschiedener absorbierender Medien (Grevers, 2001)

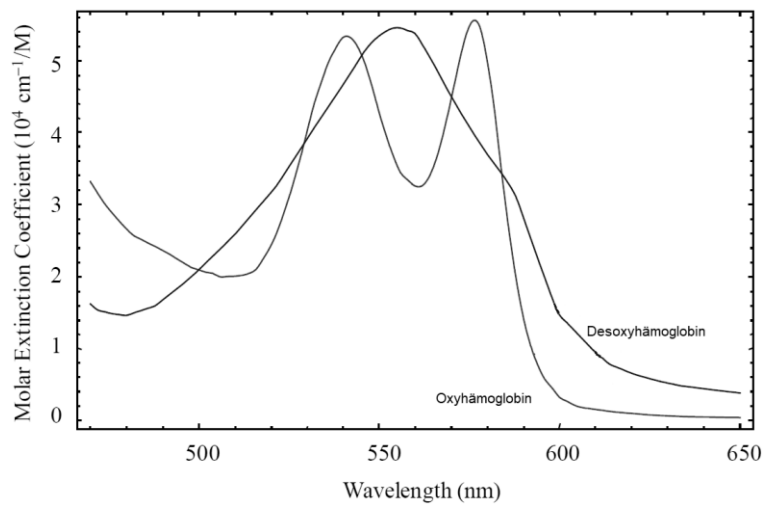


Abbildung 44: molarer Extinktionskoeffizient von Oxyhämoglobin (Doppelpeak) und Desoxyhämoglobin (einfacher peak) (Furukawa & Fukuda, 2012)

Für den Absorptionskoeffizienten der Cholesteatomgewebe zeigte sich im sichtbaren Wellenlängenbereich die deutliche Abhängigkeit vom vorhandenen Hämoglobinanteil der Probe. Hier wiesen die hämoglobinreichen und hämoglobinarmeren Proben einen charakteristischen Kurvenverlauf mit entsprechenden „Hämoglobin-Maxima“ vor. Da in Probe 4 makroskopisch drei unterschiedliche Areale erkennbar waren, wurden diese ebenfalls als hämoglobinreich, hämoglobinarmer und hämoglobinfrei eingestuft. Durch den in 3.4.1 beschriebenen Vorgang zur Präparation der Proben ist davon auszugehen, dass durch das Zusammendrücken der Probe zwischen den beiden Objektträgern Blut mit „ausgepresst“ wird, sich zwischen den Objektträgern verteilt und somit auch in makroskopisch hämoglobinarmeren bzw. hämoglobinfreien Arealen noch ein größerer Hämoglobineinfluss auf den gemessenen Absorptionskoeffizienten besteht. Zusätzlich war der hämoglobinfreie Bereich von Probe 4 auch rein makroskopisch zwar als deutlich hellerer Bereich innerhalb dieser Probe abzugrenzen, in seiner „Hämoglobinfreiheit“ jedoch nicht direkt vergleichbar mit der hämoglobinfreien Probe 3. Aufgrund dieser Faktoren erscheint es plausibel, dass sich für das hämoglobinfreie Areal von Probe 4 höhere Absorptionswerte ergaben als für die restlichen Proben P1 - P3. Eine genauere Betrachtung der einzelnen Areale innerhalb von Probe 4 erscheint dennoch sinnvoll. Es zeigte sich im hämoglobininärmsten Areal

von Probe 4 (P4 weiß) ein deutlich abgeflachtes lokales Maximum im Bereich von 400 - 430 nm im Vergleich zu den hämoglobinreicheren Arealen. Ebenso war der Messwertanstieg im Bereich von 542 nm und 571 nm geringer ausgeprägt (siehe Abbildung 29). Dies verdeutlicht den Einfluss von Hämoglobin auf die Absorptionseigenschaften der Cholesteatomgewebeprobe. Je weniger hier äußerlich der Einfluss von Hämoglobin vermutet wurde, desto geringer zeigte sich der Absorptionskoeffizient und desto kleiner war der Einfluss von Hämoglobin auf die Absorptionseigenschaften der Probe. In einer aktuellen Studie von Wisotzky *et al* konnten für 2 hämoglobinreiche Proben ebenfalls die charakteristischen Hämoglobin-Maxima dargestellt werden, wobei sich die Kurvenverläufe der nahezu hämoglobinfreien Proben vergleichbar mit der hier vermessenen hämoglobinfreien Probe 3 zeigten. Auch hinsichtlich der Absolutwerte konnten hier mit steigendem Hämoglobingehalt höhere Absorptionswerte im gemessenen Spektrum ermittelt werden (Wisotzky et al., 2020). Befindet sich das Cholesteatomgewebe in einem stark entzündlich veränderten Mittelohrmilieu geht dies aufgrund des Entzündungsprozesses mit einer erhöhten Perfusion und entsprechend erhöhter Präsenz von Hämoglobin einher. Für die klinische Anwendung ergibt sich folglich die Annahme, dass bei Anwendung eines Lasers, welcher Licht im Hb-sensitiven Wellenlängenbereich emittiert, die applizierte Laserenergie durch den erhöhten Hämoglobingehalt zu einem höheren Prozentsatz absorbiert wird. Somit sollte das Cholesteatomgewebe in stark entzündlich verändertem Milieu mit einer geringeren Energie bestrahlt werden.

Ein weiterer möglicher Einflussfaktor auf die Absorptionseigenschaften des Cholesteatomgewebes könnte ein unterschiedlicher Grad an Hydratation und Degeneration des Gewebes während der operativen Exzision und während des Transports im Probengefäß bis zur abschließenden Untersuchung im Labor sein. Wie bereits in Abschnitt 3.4.1 beschrieben, wurden die Proben direkt im Anschluss an die Exzision in einen luftdicht verschlossenen Probenbehälter gegeben und sofort im Anschluss vermessen, um eine Austrocknung der Proben möglichst zu vermeiden.

Verschiedene Faktoren wie beispielsweise die Menge an intraoperativ verwendeter Spülflüssigkeit und gegebenenfalls eine längere Bearbeitungsdauer der Proben bis zur abschließenden Messung müssen mit in Betracht gezogen werden. Zhu *et al.* konnten in einer durchgeführten Studie zu optischen Eigenschaften von Schweineleber zeigen, dass eine Dehydratation der Proben den Absorptionskoeffizienten erhöht (Zhu *et al.*, 2003). Wisotzky *et al.* untersuchten den Einfluss der zunehmenden Gewebedegeneration auf den Absorptionskoeffizienten im Wellenlängenbereich von 250 nm bis 800 nm an menschlichen Gewebeproben nach Parotidektomie. Hierzu wurden einige Proben nach Entnahme mehrfach zu unterschiedlichen Zeitpunkten vermessen. Mit steigender Zeit und somit fortschreitender Gewebedegeneration konnte eine Abnahme des Absorptionskoeffizienten festgestellt werden (Wisotzky *et al.*, 2019). In einer weiteren, an Cholesteatomen durchgeführten Studie, konnte mit steigender Zeit jedoch keine Abnahme des Absorptionskoeffizienten festgestellt werden, was vermutlich daran liegt, dass Cholesteatome *per se* weitgehend avital sind und der Einfluss von sich auflösenden Zellverbänden deshalb geringer ist (Wisotzky *et al.*, 2020). Somit scheint der Einfluss des Hydratationsgrades und der zunehmenden Gewebedegeneration auf den Absorptionskoeffizienten unterschiedlicher Gewebeproben recht kontrovers. Inwiefern diese Prozesse einen Einfluss auf die ermittelten Ergebnisse des Absorptionskoeffizienten an Cholesteatomgewebe in dieser Studie haben könnten, kann somit nicht geklärt werden. Naheliegend scheint hier der Vergleich zur oben genannten Studie von Wisotzky *et al.*, in welcher ebenfalls die optischen Eigenschaften von Cholesteatomproben im Wellenlängenbereich von 250 nm bis 800 nm bestimmt wurden und kein größerer Einfluss auf den Absorptionskoeffizienten festgestellt werden konnte (Wisotzky *et al.*, 2020).

Der unterschiedliche Hämoglobingehalt der Proben erschwert eine Vorhersage über die Absorption im bestrahlten Gewebe im Wellenlängenbereich von ca. 200 nm bis ca. 1500 nm, in welchem Hämoglobin als einer der Hauptabsorber fungiert (Grevers, 2001). Ab 1500 nm wird die Absorption im Gewebe nahezu ausschließlich durch Wasser bestimmt (Grevers, 2001). Wasser ist zu einem großen Anteil in jeder Zelle

vorhanden. Laser, welche in einem Wellenlängenbereich größer 1500 nm emittieren, unterliegen in ihrer Absorption weniger Schwankungen durch unterschiedliche Zellbestandteile. In dieser Eigenschaft liegt jedoch wiederum die Problematik eines solchen Lasers. Wird die Absorption nahezu ausschließlich durch Wasser bestimmt, ist es plausibel, dass umliegendes, vitales Gewebe einen ebenso hohen Schaden durch den Laser erfahren kann wie das eigentliche Zielgewebe, sofern sich die beiden Gewebe in ihrem Wassergehalt ähneln.

Der Anwender steht somit im klinischen Alltag bei der Auswahl des geeigneten Lasers vor der Entscheidung, mit Hilfe eines Lasers größerer Wellenlänge aufgrund des konstanten Wassergehalts der Proben auch eine entsprechend konstante Absorption der emittierten Strahlung im Gewebe zu erzielen, hier jedoch auch das umliegende Gewebe zu schädigen, oder einen Laser zu wählen, welcher deutlich sensitiver auf einen unterschiedlichen Hämoglobingehalt in einem Gewebe reagiert, jedoch möglicherweise zielgerichteter auf das Cholesteatom angewendet werden kann und umliegendes Gewebe somit schonen könnte.

Lasersysteme im Wellenlängenbereich von 10600 nm (CO₂-Laser) (Jovanovic, 2003), 2940 nm (Er:YAG-Laser) (Nagel, 1997), 810 nm (Diodenlaser) (Caffier et al., 2008; Sedlmaier et al., 2005), 532 nm (Diodenlaser, KTP-Laser, Argonlaser) (Hamilton, 2004; McCaffer et al., 2018; Yau et al., 2015) und 499 nm (Argonlaser) (Caffier et al., 2008; Sedlmaier et al., 2005) kamen bereits in mehreren klinischen und einer *In-vitro*-Studie zur Resektion von Cholesteatomen zum Einsatz.

Diese Auswahl umfasst bereits ein sehr breites Spektrum von kurzen Wellenlängen im Bereich des sichtbaren Lichts bis zu sehr langen Wellenlängen im infraroten Bereich. Anhand der gemessenen Absorptionseigenschaften der untersuchten Cholesteatome konnte in dieser Studie die höchste Absorption im Wellenlängenbereich zwischen ca. 400 - 430 nm ermittelt werden. Wisotzky *et al.* erzielten die höchsten Absorptionswerte im ultravioletten Spektrum bei ca. 250 - 290 nm mit, je nach Hämoglobingehalt mehr oder weniger stark ausgeprägten weiteren Hämoglobin-Peaks bei ca. 430 nm und 555 nm, wie sie bereits in dieser Studie analog festzustellen waren

(Wisotzky et al., 2020). Bei reiner Betrachtung der Absorptionswerte scheint somit die Anwendung von Lasern im ultravioletten Bereich bzw. bei hämoglobinhaltigeren Cholesteatomen die Anwendung von Lasern im sichtbaren Bereich am sinnvollsten. Überträgt man diese Informationen nun auf die beiden in dieser Studie angewendeten Laser, erscheint es sinnvoll für eine höhere Absorption bei hämoglobinreichen Proben den Diodenlaser mit einer Wellenlänge von 940 nm zu wählen. Dem Anwender muss hierbei jedoch bewusst sein, dass ein schwankender Hämoglobingehalt der Proben die Vorhersage, zu welchem Anteil die emittierte Strahlung im Gewebe absorbiert wird, deutlich erschwert. Der CO₂-Laser agiert bei einer Wellenlänge von 10600 nm. Da die Absorption im Gewebe hier nahezu ausschließlich von Wasser dominiert wird (Grevers, 2001) sind die Wechselwirkungen des CO₂-Lasers mit dem bestrahlten Gewebe von der Änderung der Absorptionseigenschaften aufgrund eines veränderten Hämoglobingehalts nicht betroffen. Wählt man zur Resektion den CO₂-Laser, trifft man dementsprechend die Entscheidung zur weniger selektiven Absorption der Strahlung in hämoglobinreichen Proben und somit auch einer wahrscheinlicheren Schädigung von umliegendem Gewebe, ist jedoch unabhängiger in der Anwendung auch in hämoglobinarmer Proben und Probenarealen ausreichend Absorption zu erzielen.

Wie bereits in Abschnitt 3.4.4 erwähnt, beschränkt sich diese Arbeit aufgrund der hohen Anfälligkeit von μ_s bei Variation des Anisotropiefaktors auf die Ausarbeitung des reduzierten Streukoeffizienten μ_s' .

Ein großer Streukoeffizient spricht für ein hohes Maß an unkontrollierter Ausbreitung von Strahlung im Gewebe. Beispielsweise findet beim Nd:YAG-Laser kaum Absorption in Wasser bzw. in Urin statt, weshalb dieser vorwiegend durch Wechselwirkung mit dem zu behandelnden Gewebe interagiert. Dies hat bei der Anwendung eine großvolumige Koagulation zur Folge. Es findet keine primäre Karbonisation oder Vaporisation statt. Vielmehr kommt es aufgrund des koagulativen Prozesses zur Denaturierung des Gewebes und der damit verbundenen weißlichen Verfärbung (*Lasergestützte Operationsverfahren in der Urologie*, 2003). Diese

Eigenschaften scheinen im Hinblick auf die Auswahl des geeigneten Lasersystems zur Cholesteatomresektion ungeeignet. Im Bereich des Mittelohrs muss aufgrund der anatomischen Voraussetzungen auf engstem Raum gezielt und kontrolliert gearbeitet werden. Großflächige und möglicherweise unkontrollierte Koagulationsprozesse gilt es dabei vor allem in Bereichen mit sensiblen Strukturen wie beispielsweise im Verlauf des *N. facialis* zu vermeiden. Bereits oberhalb von 45°C können bei entsprechender Dauer der Temperaturapplikation dauerhafte Gewebeschädigungen hervorgerufen werden. Koagulation findet ab einer Temperatur von >65°C statt und führt durch Denaturierung von Proteinen zu einer irreversiblen Schädigung des Gewebes. Darüber hinaus möchte man sich zur gezielten Resektion eines Cholesteatoms schneidende und ablativ Eigenschaften eines Lasers zu Nutze machen. Diese setzen eine deutlich höhere Temperatur voraus, zeigen aber aufgrund des sofortigen Wärmeabtransports zusammen mit dem vaporisierten Gewebe weniger thermische Wechselwirkungen mit dem umliegenden Gewebe (Grevers, 2001). In diesem Zusammenhang sollte die Wirkung des ausgewählten Lasers nicht vorwiegend durch Streuprozesse erzielt werden, um eine unkontrollierte großflächige Koagulation zu vermeiden und möglichst gezielt schneidend und ablativ vorgehen zu können. In der durchgeführten Studie konnte eine gewisse Hämoglobinabhängigkeit mit den entsprechenden Hämoglobin-Maxima und einem starken Messwertabfall nach dem ersten Maximum nur für das hämoglobinreiche und hämoglobinarmer Areal von Probe 4 nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 26). Liegt ein sehr dichtes Gewebe zur Messung der optischen Eigenschaften mittels Ulbrichtkugel vor, kann es sein, dass bei der Messung nicht mehr zwischen Absorption und Streuung unterschieden werden kann. Somit kann der Kurvenverlauf für den reduzierten Streukoeffizienten durch das Absorptionsspektrum überlagert werden. Dies bietet einen möglichen Erklärungsansatz für die Ähnlichkeit des Kurvenverlaufs des reduzierten Streukoeffizienten für die beiden Anteile von Probe 4 (P4 rot und P4 mix) zum Kurvenverlauf des Absorptionskoeffizienten. Insgesamt zeigte der Hämoglobingehalt der Proben jedoch weniger Einfluss auf den reduzierten Streukoeffizienten. Dies spiegelte sich sowohl im generell geringer

ausgeprägten Messwertabfall als auch durch die insgesamt deutlich weniger vorhandenen Hämoglobin-Peaks wider. Auch Wisotzky *et al.* kamen in ihrer Studie für den reduzierten Streukoeffizienten von Cholesteatomen im Wellenlängenbereich von 250 - 800 nm zu einem ähnlichen Ergebnis. Darüber hinaus zeigte sich ein weiterer kontinuierlicher Messwertabfall bis zu einer Wellenlänge von 800 nm (Wisotzky et al., 2020). Auch Studien zu optischen Eigenschaften der menschlichen Haut legen nahe, dass auch bei Wellenlängen bis 750 nm mit einem weiteren kontinuierlichen Abfall des reduzierten Streukoeffizienten zu rechnen ist (Lister et al., 2012). Wisotzky *et al.* konnten bei zunehmender Gewebedegeneration eine Abnahme des reduzierten Streukoeffizienten ab ca. 310 nm beobachten (Wisotzky et al., 2020). Dies bietet neben der geringeren Abhängigkeit von Hämoglobin eine weitere Erklärung für den unterschiedlichen Kurvenverlauf, insbesondere für die unterschiedlichen Areale innerhalb von Probe 4 (siehe Abbildung 26).

Demzufolge scheinen zur Resektion von Cholesteatomen hinsichtlich einer möglichst geringen Streuung Laser im höherwelligen sichtbaren Bereich in Betracht zu kommen. Diese Annahme bleibt aktuell allerdings noch auf den hier vermessenen Wellenlängenbereich von 400 - 700 nm bzw. 250 - 800 nm (Wisotzky et al., 2020) beschränkt.

Neben den optischen Eigenschaften des Zielgewebes sollten jedoch stets weitere Faktoren wie etwa die intraoperative Handhabbarkeit mit möglicher Koppelung des Lasers an eine Glasfaser sowie die spezifischen laserinduzierten Wirkungen wie etwa die Möglichkeit zur Koagulation, Ablation oder zur Durchführung von schneidenden Prozessen in der Auswahl eines geeigneten Lasersystems zur chirurgischen Resektion mit in Betracht gezogen werden (Grevers, 2001).

5.2 Methodikvergleich: Kryohistologische Schnittführung versus OCT-Aufnahmen in der Ablationstiefenbestimmung

Ein wichtiges Ziel dieser Studie war die möglichst exakte Bestimmung des verursachten Schadens der verwendeten Laserstrahlung am Zielgewebe. Zur Quantifizierung dieses Schadens wurden die Ablationstiefe und -fläche sowie thermische Veränderungen am Gewebe bestimmt (siehe Abschnitt 4.1). Zur Bestimmung der Ablationstiefe standen die kryohistologische Schnittführung und Schnittbildaufnahmen mittels optischer Kohärenztomographie (OCT) zur Verfügung. Die Ergebnisse der kryohistologischen Auswertung der Ablationstiefe konnten mit Hilfe der OCT-Aufnahmen in ihrer Tendenz bestätigt werden (siehe 4.2.3.2).

Die exakte histologische Aufarbeitung der Proben stellt eine sehr aufwändige und zeitintensive Methodik dar. Die Proben müssen sorgfältig eingebettet und asserviert werden. Je nach Lochtiefe ist eine sehr hohe Anzahl von Schnitten notwendig. Fehlschnitte müssen zur möglichst exakten Tiefenbestimmung genauestens dokumentiert werden. In dieser Studie wurden deshalb mehr als 1000 Objektträger mit jeweils 2-3 Schnitten gefärbt und mikroskopisch untersucht. Die histologische Aufarbeitung gibt dem Anwender jedoch auch zusätzliche Informationen. Beispielsweise können Aussagen zur Gewebeart getroffen werden. Folglich kann unterschieden werden, ob es sich beim bestrahlten Gewebe tatsächlich um reines Cholesteatom, Gewebe mit knöchernen Anteilen oder entzündlich veränderte Mittelohrmukosa handelt. Zudem ist es mit Hilfe der mikroskopischen Beurteilung möglich, Aussagen über thermische Schäden durch die verwendeten Lasersysteme zu treffen. Ein zusätzlicher Vorteil der kryohistologischen Schnittführung stellt die Unabhängigkeit von der Probendicke dar, während die Eindringtiefe der OCT begrenzt ist. Das in dieser Studie verwendete OCT-Gerät ermöglicht je nach Gewebebeschaffenheit eine Einsicht ins Gewebe in bis zu ca. 2,9 mm Tiefe. Um ein Austrocknen der Proben vor der Tiefenbestimmung mit Hilfe der OCT zu vermeiden, müssen diese im Anschluss an die Laseranwendung erneut befeuchtet werden, was das Absetzen eines Flüssigkeitsfilms im Ablationskrater zur Folge haben kann. Dies führt

in der OCT-Aufnahme aufgrund der erhöhten Reflektivität zur Spiegelbildung und erschwert somit die Tiefenbestimmung.

Insgesamt erwies sich die OCT in dieser Studie einfacher in der Anwendung. Zur Beurteilung der exakten Tiefe sind lediglich eine korrekte Einstellung der Tiefenschärfe des Gerätes und dessen korrekte Anwendung sowie eine Ermittlung des tiefsten Schnittes nötig. Die histologische Aufarbeitung ist hingegen deutlich anwenderabhängig. Zur mikroskopischen Ausarbeitung ist eine sehr hohe Qualität der Schnitte nötig. Risse innerhalb der Kryoschnitte erschweren die weitere Beurteilung erheblich. Eine erhöhte Anzahl an Fehlschnitten am Ende des Ablationskonus kann zu falsch hohen Messergebnissen führen. Durch Leer- und Fehlschnitte entstehen systematische Fehler in der Tiefenbestimmung. Der systematische Fehler fällt insbesondere bei einer geringen Ablationstiefe stark ins Gewicht (siehe 4.2.3.3). Auch die Bewertung von Beginn und Ende des Ablationskonus bei der kryohistologischen Schnittführung ist sehr subjektiv. Unebenheiten in der Probenoberfläche erschweren diese Beurteilung zusätzlich. Hier ermöglicht die vertikale Schnittbildführung der OCT-Aufnahmen, wie in Abschnitt 3.3.2.2 beschrieben, einen nachträglichen Ausgleich dieser Inhomogenitäten zur exakteren Tiefenbestimmung. Eine exakt horizontale Einstellung der kryohistologischen Probe zur genauen Schnittführung gestaltet sich jedoch sehr schwer. Zum einen kommt es zum Aufschwimmen der Proben bei deren Einbettung und anschließenden Schockfrierung in Tissue Tek, zum anderen muss beim Aufblocken auf den Haltezylinder und bei der Einstellung des Kryotoms eine ebene Schnittfläche zur exakt horizontalen Schnittführung gewährleistet werden. Ein schräges Anschneiden der Proben ist somit bis zu einem gewissen Grad nahezu unvermeidbar. Das OCT-Gerät ermöglicht in diesem Zusammenhang eine dreidimensionale Darstellung des Gewebes mit allen Schnittebenen und der beschriebenen Möglichkeit des Ausgleichs von Inhomogenitäten ohne die Problematik einer schrägen Schnittführung zur Oberfläche. In Zusammenschau der aufgezeigten Argumente zeigte sich für die OCT-Aufnahme in dieser Studie eine deutliche Zeit- und Materialersparnis und eine geringere

Fehleranfälligkeit sowohl anwenderbezogen als auch systematisch. Insbesondere bei der Bestimmung geringer Kratertiefen fiel der systematische Fehler der Kryoschnitttechnik mit einer maximalen Ungenauigkeit von 27 μm bzw. 28 μm stark ins Gewicht. Die OCT wies in allen Messungen einen deutlich geringeren systematischen Fehler vor (siehe 4.2.3.3). Auch eine *in-vivo*-Darstellung des bestrahlten Zielgewebes scheint mit geeigneten OCT-Geräten durchaus denkbar. So sind *In-vivo*-OCT-Aufnahmen zur Beurteilung der Netzhaut bereits seit einigen Jahren bedeutend in der nicht-invasiven Diagnostik von Netzhauterkrankungen (Iorga et al., 2018). In einer Studie von Djalilian *et al.* konnte die OCT *in vivo* bereits erfolgreich zur Differenzierung von Cholesteatomen von der umliegenden Mittelohrmukosa angewandt werden (Djalilian et al., 2010).

Sind weitere Analysen zur Gewebebeschaffenheit oder genaueren Auswirkungen von Anwendungen am Zielgewebe nötig, kann die mikroskopische Beurteilung histologischer Bilder jedoch nicht ersetzt werden.

5.3 Vergleich der beiden Laser hinsichtlich ihrer Anwendung am Cholesteatom und der verursachten Kollateralschäden

Für den CO₂-Laser findet Absorption im Gewebe aufgrund seiner Wellenlänge von 10600 nm nahezu ausschließlich durch Wasser statt. Der histologische Aufbau des Cholesteatoms ähnelt dem der menschlichen Haut (siehe 1.2.3). Unter der Annahme, dass in beiden Geweben ein ähnlicher Wassergehalt vorliegt, welcher für die Haut mit ca. 69 -74 % angegeben wird (Stüttgen & Schaefer, 1974) ist auch für Cholesteatomgewebe von einem hohen Wassergehalt auszugehen. In Knochen liegt der Wasseranteil bei ca. 25 % (Aumüller, 2007). Liegt somit der Wassergehalt des Zielgewebes vergleichsweise hoch vereinfacht dies eine Vorhersage des Ablationsverhaltens des CO₂-Lasers, da von einer hohen Absorption im Zielgewebe ausgegangen werden kann. Dies bestätigte sich auch bei den durchgeführten Laserversuchen dieser Studie. Mit dem CO₂-Laser konnte bei jeder durchgeführten

Laserapplikation sowohl an unterschiedlichen Cholesteatomproben, als auch am Gehörknöchelchen, eine punktförmige Ablation im bestrahlten Gewebe, unabhängig von der Gewebeart, erzielt werden. Für den Diodenlaser mit einer Wellenlänge von 940 nm wird die Absorption sowohl durch Wasser als auch durch den Hämoglobingehalt beeinflusst (siehe Abbildung 43). Ein schwankender Hämoglobingehalt der Cholesteatomproben kann somit das Ablationsverhalten des Diodenlasers maßgeblich beeinflussen. Hiermit können die teils starken Schwankungen im Ablationsverhalten begründet werden. Bei relativ hohen applizierten Energien konnte auch bei weniger gut durchbluteten Cholesteatomproben Ablation erzeugt werden, wohingegen selbst unter Applikation der höchsten verwendeten Energiemengen für Ablation am Cholesteatom keine nachweisbaren Schäden am Gehörknöchelchen entstanden. Dies lässt sich durch den eher sehr geringen Anteil an Hämoglobin im Ossikel erklären. (siehe 4.2.3.4). Im Gegensatz dazu zeigten sich beim CO₂-Laser bereits bei Energiemengen, welche für die Ablation am Cholesteatom nötig waren, deutliche Schäden am Gehörknöchelchen. Beim Cholesteatom lag für den CO₂-Laser die geringste, zur Ablation notwendige Energiemenge bei 0,2 J. Bei entsprechender Applikation am Gehörknöchelchen zeigte sich hier bereits eine durchschnittliche Lochtiefe von $124 \pm 48 \mu\text{m}$ (vgl. 4.2.3.4 und 4.2.3.5). Das ungünstige Schädigungsprofil des CO₂-Lasers bei Anwendung am Gehörknöchelchen wurde ebenfalls durch den hohen Zusammenhang der ermittelten Messwerte für die Ablationstiefe am Gehörknöchelchen ($R^2 = 66,4\%$) bei gleichzeitig großer Steigung ($m = 649$) deutlich. Um mit dem CO₂-Laser Ablation am Cholesteatom zu erzeugen, müssen Energiemengen verwendet werden, für die bei Anwendung am Gehörknöchelchen noch kein Sättigungswert erreicht ist. Demnach ist davon auszugehen, dass eine weitere Erhöhung der Energie zu einer deutlichen Zunahme der Schädigung an den Gehörknöchelchen führt. Bei direkter Anwendung am Gehörknöchelchen ist der Diodenlaser dem CO₂-Laser in seinem Risikoprofil folglich deutlich überlegen.

Ein weiterer wichtiger Unterschied im Wirkungsprofil der beiden Laser konnte für die Tiefenwirkung im Zusammenhang mit der lateralen Ausdehnung der Koagulationszone gezeigt werden. Zum Hervorrufen von Ablation am Cholesteatom waren beim Diodenlaser deutlich höhere Energiemengen nötig. Vergleicht man nun die laterale Ausdehnung der Gewebewechselwirkungen beider Laser bei identischer Ablationstiefe wird die ausgeprägtere thermische Wirkung des Diodenlasers in die Breite deutlich. So zeigte sich im Vergleich bei gleicher Ablationstiefe eine ca. zehnmal größere Ablationsfläche für den Diodenlaser. Die erhöhte radial-laterale Koagulation durch laterale Ausdehnung der Wärme bestätigte sich zudem in den ermittelten thermischen Schäden im Zielgewebe. Hier zeigten sich bei gleicher Ablationstiefe eine ca. zwei bis vierfach erhöhte Karbonisations- & Vakuolisierungszone und Gesamtzone für den Diodenlaser im Vergleich zum CO₂-Laser (vgl. Tabellen 7 und 8 in 4.2.3.5). Der CO₂-Laser arbeitet am Zielgewebe somit bei einer deutlich niedrigeren Energie wesentlich präziser, allerdings führen bereits geringe Änderungen der Energie zu einer erheblichen Steigerung der Ablationstiefen (vgl. Tabellen 7 und 8 in 4.2.3.5). Für die praktische Anwendung erscheint der CO₂-Laser aufgrund der im ermittelten Ablationsbereich geringeren Flächenwirkung als chirurgisch schneidendes Instrument in der Anwendung beispielsweise zur Resektion eines Cholesteatomsacks geeignet. Wohingegen ein Vorteil der größeren Wirkung in die Breite des Diodenlasers beispielsweise bei einer notwendigen Resektion von Cholesteatomrestgewebe im Bereich der Gehörknöchelchenkette läge. Eine breitflächigere Laserwirkung zur Entfernung von Cholesteatomgewebe unter Schonung des Ossikels erscheint hier zweckmäßig. Auf Basis der ermittelten Daten scheint ein direktes Aufsetzen der Glasfaser auf einen mit Cholesteatom-Restgewebe besetzten Ossikel mit dem Ziel der vollständigen Ablation (in Breite und Tiefe) unter Schonung der noch intakten Ossikelstruktur durchaus denkbar (siehe 4.2). Betrachtet man den Kurvenverlauf der durch den Diodenlaser verursachten thermischen Schäden am Cholesteatom (Abbildungen 28 und 30) wird deutlich, dass sowohl für die Karbonisations- und Vakuolisierungszone als auch die Gesamtzone mit Erreichen der

Ablationsschwelle ab ca. 5J ein Sättigungsbereich vorliegt. Somit besteht aufgrund des erreichten Sättigungsbereichs für die thermischen Schäden am Cholesteatom eine gute Wirkung in die Breite, ohne bei weiterer Erhöhung der Energie unvorhersehbar größere thermische Schäden befürchten zu müssen. Der Diodenlaser eignet sich somit mehr zur breiten Schädigung des Zielgewebes und verfügt in seiner Anwendung über eine größere therapeutische Anwendungsbreite, während der CO₂-Laser eine höhere chirurgische Präzision bietet, jedoch die Gefahr der Verletzung tiefer liegender Strukturen birgt.

Stellt man die beiden Laser hinsichtlich ihrer chirurgischen Handhabung gegenüber, ermöglicht der CO₂-Laser eine theoretische höhere chirurgische Präzision, welche in einem *Ex-vivo-Setting* mit exakter Versuchsanordnung unter genauer Einhaltung des Abstands und der Zielrichtung des Lasers relativ leicht zu erreichen ist. Wird der Laser intraoperativ über einen Spiegelreflektor händisch geführt, können jedoch bereits geringe Änderungen der Richtung zur Schädigung sensibler umliegender Strukturen führen. Ebenso muss der Abstand zum bestrahlenden Gewebe genau eingehalten werden, um mögliche Schäden, hervorgerufen durch eine Änderung der Fokusfläche zu vermeiden. Bereits ein physiologischer händischer Tremor des Operators, die Atmung des Patienten oder eine Aufwachreaktion während der Narkose könnten eine Änderung der Strahlungsrichtung oder der Fokusfläche bedingen. Somit erfordert die Anwendung des CO₂-Lasers in der Cholesteatomchirurgie, auch aufgrund der engen Verhältnisse im Bereich des Mittelohrs, ein hohes Maß an Präzision und operativem Geschick. In diesem Zusammenhang bietet die Möglichkeit der Glasfaserkopplung des Diodenlasers einen deutlichen Vorteil. Die Laserenergie kann durch gezieltes Aufsetzen im zu bestrahlenden Areal sicher am gewünschten Ort abgegeben werden. Durch die Biegsamkeit der Faser ist eine Anwendung des Diodenlasers auch in schwer zu erreichenden Arealen des Mittelohrs denkbar. Hierdurch könnte sich eine Überlegenheit von flexiblen, fasergekoppelten Systemen insbesondere bei Verwendung der *Intact-canal-wall*-Technik zur Cholesteatomresektion in sonst schwer erreichbaren Paukenanteilen ergeben, wenn eine entsprechend sichere

Applikation durch z.B. endoskopische Sichtkontrolle erreicht werden kann. Neuere Systeme ermöglichen auch für den CO₂-Laser eine Führung durch einen Hohlleiter. Ein entsprechendes System kam in dieser Studie noch nicht zum Einsatz, scheint jedoch angesichts der sichereren Applikation sehr vorteilhaft und einer komplexen Strahlumleitung mittels Spiegelgelenkarmen überlegen (Wang et al., 2006). Durch eine korrekte Lokalisation der Glasfaser am Zielgewebe sollte angesichts der engen Mittelohrverhältnisse und der empfindlichen anatomischen Strukturen ein hohes Maß an Sicherheit gewonnen werden.

Der Nachteil eines fasergekoppelten Systems zeigte sich in dieser Studie durch stetige Verschleißerscheinungen während der Laserapplikation. Um den tatsächlichen Energieoutput möglichst nahe an der eingestellten Energiemenge zu halten, muss eine glatte Faseroberfläche vorliegen. Dies macht es notwendig, die Glasfaser bei häufigeren Anwendungen intraoperativ regelmäßig zu schleifen oder auszutauschen und kann somit mit entsprechenden Zeitverlusten während der Operation behaftet sein. Vollständig kontaktfreies Arbeiten könnte ebenfalls einen Vorteil in der Resektion von Cholesteatomen darstellen. Die Risiken des nicht-kontaktfreien Arbeitens im Bereich der Ossikelkette wurden bereits in Abschnitt 1.2.4 ausführlich erläutert. In dieser Studie erfüllte der CO₂-Laser dieses Anforderungsprofil. Hier war eine vollständig kontaktfreie Ablation des Zielgewebes möglich. Mit dem Diodenlaser konnte Ablation mit den verwendeten Energiemengen nur durch Kontakt zwischen Glasfaser und Zielgewebe hervorgerufen werden. Allerdings war die reine Kontaktaufnahme mit dem Gewebe ausreichend. Eine Manipulation wie etwa bei der chirurgischen Resektion mittels Tellermesser und 45°-Häkchen dürfte hier somit seltener notwendig sein. Folglich könnte man das konventionelle chirurgische Vorgehen sowohl durch die Verwendung des CO₂-Lasers im Sinne eines vollständig kontaktfreien Arbeitens als auch durch die Verwendung des Diodenlasers mit einer Reduktion von Manipulationen insbesondere für Resektionen im Bereich der Ossikelkette ergänzen. In der Literatur beschriebene temporäre Hörschwellenminderungen im Bereich niedriger Frequenzen, hervorgerufen durch Manipulation an Gehörknöchelchen

mittels chirurgischer Instrumente könnten hierdurch möglicherweise reduziert werden. Insbesondere bestünde in diesem Zusammenhang durch vollständig oder nahezu kontaktfreies Arbeiten bei notwendigen Resektionen im Bereich der Stapesfußplatte ein geringeres Risiko für die Entstehung von Perilymphfisteln, welche im Zuge einer chirurgischen Resektion durch Dislokationen, Mobilisierung oder Frakturierung der Stapesfußplatte entstehen können (Jovanovic, 2003; Theissing et al., 2006; Vartiainen & Seppä, 1997). Es muss allerdings gewährleistet sein, dass nicht die Laserstrahlung selbst eine Schädigung der Stapesfußplatte verursacht.

Die Vor- und Nachteile der beiden Lasersysteme sind als Übersicht in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9: Vor- und Nachteile der verwendeten Laser

Diodenlaser	CO ₂ -Laser
– eingeschränkte Vorhersagbarkeit des Ablationsverhaltens bei schwankendem Hb-Gehalt im Zielgewebe + hohe Absorption im Cholesteatomgewebe + keine Schäden am Ossikel	+ gut vorhersagbares Ablationsverhalten aufgrund nahezu vollständiger Absorption in Wasser – hohe Absorption in Weichgewebe und knöchernem Gewebe: somit Schäden am Ossikel
– geringe Präzision + große therapeutische Breite	+ hohe Präzision – geringe therapeutische Breite
+ einfachere Handhabung durch Glasfaser + Erreichen schwer zugänglicher Areale durch Glasfaser – Glasfaserverschleiß – Kontakt zum Zielgewebe nötig	– hohe Anforderung an Anwender: exakte Abstandseinhaltung – Zielgewebe muss frei zugänglich sein + kein Verschleiß + vollständig kontaktfreies Arbeiten

5.4 Limitationen & Ausblick: Ist eine klinische Anwendung von CO₂- und Diodenlaser in der Cholesteatomchirurgie sinnvoll?

Die Größe der resezierten Cholesteatome gestattete häufig nur eine einzelne oder wenige Laseranwendungen pro Probe. Mit Hilfe, der in 3.3.1.3 beschriebenen Technik zur Markierung der Laserapplikationen konnten für größere Proben bereits mehrere Laserapplikationen durchgeführt – und dennoch eine sichere Zuordnung gewährleistet werden. Jedoch waren aufgrund der limitierten Probenanzahl nur vereinzelt mehrfache Laseranwendungen bei gleicher Energiemenge möglich. Auch eine Differenzierung von Laserapplikationen mit gleicher Energie nach längerer Bestrahlungsdauer im Vergleich zu einer höheren Leistung mit kürzerer Bestrahlungsdauer, war infolge der begrenzten Probenanzahl nicht möglich und bleibt Inhalt weiterer Studien. Aufgrund der meist geringen Probendicken zeigte sich der erzeugte Ablationskrater häufig durchgängig. Folglich war eine exakte Angabe der Ablationstiefe in diesen Fällen nicht möglich, was die statistische Darstellung und Auswertung erschwerten. Demnach sind die hier ermittelten Werte zunächst vorsichtig zu interpretieren.

Zur Bestimmung der optischen Eigenschaften mit Hilfe der Ulbrichtkugel war der Versuchsaufbau technisch auf einen Wellenlängenbereich von 400 - 700 nm optimiert. Somit konnten neben der Studie von Wisotzky *et al.* erstmals Daten für optische Eigenschaften von Cholesteatomgewebe in diesem Spektralbereich gewonnen werden (Wisotzky et al., 2020). Eine spektrale Erweiterung des Systems bis auf 10.600 nm würde eine direkte Interpretation der angewandten Lasersysteme (CO₂- und Diodenlaser) ermöglichen.

Bei der Präparation größerer Proben für eine mehrfache Laserbestrahlung müssen diese bis zur abschließenden Laserapplikation zwangsweise länger asserviert werden. Um eine Austrocknung der Proben zu vermeiden, wurde eine einheitliche Vorgehensweise etabliert (siehe 3.3.1.1 und 3.4.1). Der äußere Einfluss auf die optischen Eigenschaften der einzelnen Proben war somit gering, jedoch nicht vollständig zu eliminieren. Eine Übertragbarkeit der Ergebnisse auf eine *in-vivo*-Situation gilt es zu prüfen.

Einige Vorteile der Verwendung von Lasern gegenüber der rein konventionellen chirurgischen Resektion wurden in dieser Arbeit bereits angeführt. Die Vorteile eines nahezu- oder vollständig kontaktfreien Arbeitens im Bereich der Gehörknöchelchenkette wurden bereits hinreichend aufgezeigt (siehe 1.2.4 & 5.3). Der besondere Nutzen fasergekoppelter Laser wurde ebenfalls bereits beleuchtet. Der große Nutzen einer flexiblen Resektionsmöglichkeit innerhalb der engen Mittelohrverhältnisse besteht in einer verbesserten Erreichbarkeit des erkrankten Gewebes. Dies birgt die Möglichkeit, selbst bei ausgedehnten Befunden eine minimalinvasive Operationsmethode wie die *Intact-canal-wall*-Technik anzuwenden, Bohrungen zur Verbesserung der Übersicht und Erreichbarkeit und die hiermit verbundenen akustischen Bohrtraumata zu reduzieren und trotzdem die Rezidivraten durch gezielte Laserlichtapplikationen möglichst gering zu halten (Hamilton, 2004; Hamilton, 2005; Kylan & Arlinger, 1976). Ein zusätzlicher Einsatz der Endoskopie zur verbesserten visuellen Darstellung der Mittelohrstrukturen erscheint in diesem Zusammenhang sinnvoll. Dieses Vorgehen könnte dem erfahrenen Chirurgen trotz minimalinvasivem Zugang die nötige Übersicht verleihen und zusätzlich mittels flexibler Glasfaser das entscheidende Instrument zur Entfernung von schwer zu erreichendem Cholesteatomgewebe liefern (James et al., 2016; Marchioni et al., 2011; Presutti et al., 2014; Yau et al., 2015). So besteht die Indikation zu einer Second-look-Operation vorwiegend bei nicht sicherem Entfernen aller Cholesteatomreste (Adamic et al., 2007; Reiß, 2009; Stark et al., 2011). Eine Reduzierung dieser Eingriffe scheint durch eine Kombination aus optimierter Visualisierung unter Einsatz der Endoskopie und einer verbesserten Erreichbarkeit des erkrankten Gewebes durch flexible, fasergekoppelte Lasersysteme durchaus denkbar.

Auch die Problematik von nicht reseziertem Cholesteatomrestgewebe und einer hiermit verknüpften erhöhten Rezidivrate könnte durch Bestrahlung mittels fasergeführten Lasersystemen möglicherweise reduziert werden. Die Gefahr eines Rezidivs besteht vor allem durch nicht reseziertes, erkranktes Gewebe im Bereich der Gehörknöchelchen und in schwer zugänglichen Arealen. Auf Grundlage der

ermittelten Daten in dieser Studie scheint die Anwendung des Diodenlasers hierfür geeignet. Diese Annahme zur Reduktion der Rezidivraten durch einen gezielten Lasereinsatz wird unterstützt durch Studienergebnisse von Hamilton *et al.* unter Verwendung eines KTP-Lasers bei *Intact-canal-wall*-Technik. Hier konnten bei Verwendung des KTP-Lasers gegenüber der konventionellen Operationstechnik signifikant geringere Rezidivraten erzielt werden (Hamilton, 2004; Hamilton, 2005). Der Erhalt von Anteilen der Gehörknöchelchenkette spielt eine große Rolle im postoperativen Hörerergebnis. So zeigt eine Studie von Wilson *et al.* verbesserte langfristige Hörergebnisse bei Erhalt des Stapes und/oder Hammergriffs (Wilson *et al.*, 2013). Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, ist es mit dem Diodenlaser möglich, selbst mit großer Energie im Bereich bzw. in unmittelbarem Kontakt mit der Ossikelkette zu arbeiten, ohne diese hierdurch wesentlich zu schädigen (siehe 4.2.3.4). Lediglich bei einer Probe konnten durch den Diodenlaser Schäden am Ossikel erzeugt werden. An dieser Probe lag eine kongenitale Fehlbildung der Gehörknöchelchenkette vor. Es bleibt hier also zu diskutieren, inwiefern die entstandenen Schäden mit der vorliegenden Fehlbildung in Zusammenhang zu bringen sind, zumal teils höhere Energien an anderer Stelle desselben Ossikels keine Schäden verursachten (siehe 4.2.3.4). Der Diodenlaser ermöglicht dem Operateur somit die Ablation von Cholesteatomgewebe direkt an der befallenen Ossikelkette ohne das Risiko einer iatrogenen Schädigung der Gehörknöchelchen. Inwiefern der Diodenlaser auch *in-vivo* eine großflächige Ablation des erkrankten Gewebes unter Erhalt der Gehörknöchelchenkette ermöglicht bleibt Ziel weiterer Studien. Da für den CO₂-Laser ebenfalls ein signifikant höherer Schaden für Cholesteatomgewebe im Vergleich zum Ossikel nachgewiesen werden konnte, scheint eine klinische Anwendung des Lasers zur Resektion von Cholesteatom am Ossikel ebenfalls denkbar. Aufgrund des Schädigungsprofils ist diese jedoch mit einem deutlich höheren Anspruch an den Anwender verbunden (siehe 5.3). In einer klinischen Studie von Hamilton *et al.* konnte eine sichere Entfernung von Cholesteatomgewebe im Bereich der Gehörknöchelchenkette durch einen fasergekoppelten Laser bei 90% der Patienten

erzielt werden, ohne hierbei die Kette unterbrechen zu müssen. Darüber hinaus konnten sowohl eine signifikant verbesserte postoperative Schallleitung als auch eine signifikant höhere Patientenzufriedenheit bei Erhalt der Gehörknöchelchenkette gegenüber dem konventionellen Vorgehen mit iatrogener Unterbrechung und anschließender Rekonstruktion der Ossikelkette nachgewiesen werden (Hamilton, 2010).

In der vorliegenden Untersuchung wurden insgesamt vier Bestrahlungen mit dem Diodenlaser ausgeschlossen, welche nach mikroskopischer Betrachtung nachweislich an ligamentären Strukturen durchgeführt wurden. Hier kam es in allen Fällen auch bereits bei niedrigeren Energiemengen zu einer Schädigung des Ligaments. Um die Kontinuität der Gehörknöchelchenkette zu wahren, sollte somit eine direkte Laserapplikation im Bereich von ligamentären Strukturen möglichst vermieden werden (siehe 4.2.3.4). Nishizaki *et al.* konnten dies in ihrer Studie bei Verwendung eines KTP-Lasers zur gezielten Amputation von Anteilen der Gehörknöchelchenkette unter Schonung einzelner Ligamente zum Kontinuitätsverlust der Ossikelkette gewährleisten (Nishizaki et al., 2001).

Eine exakte Vorhersage des Ablationsverhaltens des Diodenlasers kann sich aufgrund der in 5.3 genannten Umstände für den Anwender anspruchsvoll darstellen. Um die aktuellen Wechselwirkungen des Lasers mit dem vorliegenden Gewebe beurteilen zu können, kann es zur Ermittlung der Ablationsschwelle erforderlich sein, mehrere Laserbestrahlungen durchzuführen. Durch dieses „Herantasten“ kann die nötige Energie zur Resektion des Zielgewebes schrittweise ermittelt werden. Dieses präzise Vorgehen kann dazu beitragen, das Zielgewebe kontrolliert zu resektieren, wobei die Operationszeit im Vergleich zur konventionellen Methode möglicherweise leicht erhöht wird. Mit einiger klinischer Erfahrung lässt sich das nötige „Herantasten“ jedoch mit Sicherheit verkürzen. Auch in dieser Studie konnte in der Anwendung des Diodenlasers bereits mit einer entsprechenden Lernkurve eine sichere Einstellung der notwendigen Ablationsenergie durch Erfahrungswerte mit unterschiedlicher Probenbeschaffenheit erreicht werden.

Auch das Einhalten des geeigneten Abstands zur korrekten Fokussierung des CO₂-Laserstrahls könnte sich intraoperativ durchaus als äußerst anspruchsvoll erweisen. Eine ähnliche Problematik wird in einer Studie von Schrötzlmair *et al.* zur laserassistierten Fixierung von Stapesprothesen beschrieben. Um ein optimales Ergebnis zu generieren, musste die Bestrahlung mit dem CO₂-Laser hier ebenfalls exakt im Fokus erfolgen. Ebenso wird in dieser Studie bei einer Laseranwendung außerhalb des Fokus auf die möglichen Schäden an umliegendem Gewebe wie beispielsweise den Gehörknöchelchen hingewiesen (Schrötzlmair *et al.*, 2018). Inwiefern die bisherigen Lasersysteme auch im Sinne eines schneidenden Resektionswerkzeuges zur *In-toto*-Resektion eines Cholesteatomsacks genutzt werden können, bleibt Ziel weiterer Studien.

Somit könnte die moderne Cholesteatomchirurgie durch die Nutzung geeigneter Laser vor allem hinsichtlich der Rezidivraten, einem verbesserten Erhalt der Gehörknöchelchen und bei der Erreichbarkeit schwer zugänglicher Bereiche profitieren. Eine Kombination aus konventioneller chirurgischer Vorgehensweise und Laserresektion erscheint momentan am praktikabelsten. Die klinischen Erfahrungswerte und Anwendungsgebiete von Lasern in der Medizin erweitern sich jedoch stetig. Folglich scheint auch eine rein lasergestützte Cholesteatomresektion in Zukunft denkbar.

6. Zusammenfassung

Diese ex-vivo-Studie untersucht den Einsatz der Lasertechnologie bei der Cholesteatomresektion und vergleicht dabei die Wirksamkeit und Sicherheit des Diodenlasers (940 nm) und des CO₂-Lasers (10600 nm). Hierzu wurden vergleichende Ablationstiefenbestimmungen mittels zweier unterschiedlicher Messmethoden (H.E. gefärbte kryohistologische Schnitte und optische Kohärenztomographie) durchgeführt. Die zur Ablation am Cholesteatom notwendigen Energiemengen wurden ebenfalls an Gehörknöchelchen angewendet, um mögliche Kollateralschäden zu ermitteln. Hierfür wurde mittels optischer Kohärenztomographie eine vergleichende Ablationstiefenmessung am Ossikel durchgeführt. Ablationsfläche und die entstehenden thermischen Schäden am Cholesteatom wurden mittels H.E. gefärbten kryohistologischen Schnitten bestimmt. Für den Diodenlaser konnte hier eine ausgeprägtere Wirkung in die Breite dargestellt werden, wohingegen sich der CO₂-Laser als präziseres, ablativ-schneidendes Instrument mit ausgeprägterer Tiefenwirkung zeigte. Mit den in dieser Studie zur Cholesteatomablation notwendigen Energiemengen konnte eine sichere Anwendung des Diodenlasers im Bereich der Gehörknöchelchenkette aufgezeigt werden.

Zur zukünftigen Optimierung der Auswahl eines geeigneten Lasers und dessen sichereren Anwendung wurden die optischen Eigenschaften des Cholesteatomgewebes mit Hilfe einer Ulbrichtkugel im Wellenlängenbereich von 400 nm bis 700 nm bestimmt. Hier konnte gezeigt werden, dass der Absorptionskoeffizient im ermittelten Wellenlängenbereich maßgeblich durch das Vorhandensein von Hämoglobin innerhalb der Probe beeinflusst wird.

Aufgrund äußerer Einflüsse wie etwa einer Austrocknung der Proben bei der Asservation bis zur Verarbeitung und der unterschiedlichen Eigenschaften der Cholesteatomproben, insbesondere den Hämoglobingehalt betreffend, gilt es die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf eine *in-vivo*-Situation in zukünftigen Studien zu prüfen. Zusammenfassend liefert diese Studie neue Erkenntnisse zu optischen

Eigenschaften des Cholesteatoms, notwendigen Energiemengen zur Ablation am Cholesteatomgewebe für die beiden verwendeten Laser, den thermischen Wechselwirkungen am Zielgewebe und den hiermit verbundenen Kollateralschäden am Gehörknöchelchen, um die Anwendung von Lasern in der Cholesteatomchirurgie verständlicher und sicherer zu gestalten.

Summary

This ex-vivo study investigates the use of laser technology in cholesteatoma resection and compares the efficacy and safety of the diode laser (940 nm) and the CO₂ laser (10600 nm). For this purpose, comparative ablation depth measurements were performed using two different measurement methods (H.E. stained cryohistologic slides and optical coherence tomography). The energy settings required to create ablation on the Cholesteatoma were used on ossicles to determine possible collateral damage. Therefore a comparative ablation depth measurement on ossicles was also carried out using optical coherence tomography. The ablation area and the resulting thermal damage on the Cholesteatoma were determined using H.E. stained cryohistological slides. The diode laser was shown to have a more extensive effect in width, whereas the CO₂ laser proved to be a more precise, ablative-cutting instrument with a more extensive effect in depth. Using the energy settings required to create ablation on cholesteatoma in this study, a safe application of the diode laser in the area of the ossicular chain was demonstrated.

For future optimization of the selection of a suitable laser and its safer application, the optical properties of the cholesteatoma tissue were determined using an integrating sphere in the wavelength range from 400 nm to 700 nm. Here it could be shown that the absorption coefficient in the determined wavelength range is significantly influenced by the presence of hemoglobin within the sample.

Due to external influences such as dehydration of the samples during preservation until processing and the different characteristics of the cholesteatoma samples, in particular with regard to the haemoglobin content, the transferability of the results to an in vivo situation must be examined in future studies. In summary, this study provides new insights into the optical properties of the cholesteatoma, the amount of energy required for ablation on the cholesteatoma tissue, the thermal interactions on the target tissue and the associated collateral damage to the ossicular chain, in order to make the use of lasers in cholesteatoma surgery more comprehensible and safer.

Der Einsatz der Lasertechnologie bei der Cholesteatomresektion – eine *Ex-vivo-Studie*

Literaturverzeichnis

- Adamic, M., Troilius, A., Adatto, M., Drosner, M. & Dahmane, R. (2007). Vascular lasers and IPLS: guidelines for care from the European Society for Laser Dermatology (ESLD). *Journal of cosmetic and laser therapy : official publication of the European Society for Laser Dermatology*, 9(2), 113–124.
<https://doi.org/10.1080/14764170701280693>
- Albera, R., Canale, A., Piumetto, E., Lacilla, M. & Dagna, F. (2012). Ossicular chain lesions in cholesteatoma. *Acta otorhinolaryngologica Italica : organo ufficiale della Societa italiana di otorinolaringologia e chirurgia cervico-facciale*, 32(5), 309–313.
- Arndt, O. (2010). *Praxis der HNO-Heilkunde, Kopf- und Halschirurgie: 265 Tabellen* (J. Strutz, Hg.) (2., vollst. überarb. und erw. Aufl.). Thieme.
- Aumann, S., Donner, S., Fischer, J. & Müller, F. (Hrsg.). (2019). *High Resolution Imaging in Microscopy and Ophthalmology: New Frontiers in Biomedical Optics [Internet]*. Springer.
- Aumüller, G. (2007). *Anatomie: 208 Tabellen. Duale Reihe*. Thieme.
- Benninghoff, A. & Drenckhahn, D. (2004). *Anatomie: Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen* (16., völlig neu bearb. Aufl.). Urban & Schwarzenberg.
- Bergin, M. J., Bird, P. A., Vlajkovic, S. M. & Thorne, P. R. (2015). High frequency bone conduction auditory evoked potentials in the guinea pig: Assessing cochlear injury after ossicular chain manipulation. *Hearing research*, 330(Pt A), 147–154.
<https://doi.org/10.1016/j.heares.2015.10.009>
- Boulnois, J.-L. (1986). Photophysical processes in recent medical laser developments: A review. *Lasers in Medical Science*, 1(1), 47–66. <https://doi.org/10.1007/BF02030737>
- Caffier, P. P., Marzahn, U., Franke, A., Sudhoff, H., Jovanovic, S., Haisch, A. & Sedlmaier, B. (2008). Laser-assisted cholesteatoma surgery: technical aspects, in vitro implementation and challenge of selective cell destruction. *European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies (EUFOS) : affiliated with the German Society for Oto-Rhino-Laryngology - Head and Neck Surgery*, 265(10), 1179–1188.
<https://doi.org/10.1007/s00405-008-0602-3>
- Cheong, W. F., Prahl, S. A. & Welch, A. J. (1990). A review of the optical properties of biological. *IEEE J. Quantum Electronics*, 26, 2166–2185.
- da Costa, S. S., Teixeira, A. R. & Rosito, Leticia Petersen Schmidt (2016). The contralateral ear in cholesteatoma. *European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies (EUFOS) : affiliated with the German Society for Oto-Rhino-Laryngology - Head and Neck Surgery*, 273(7), 1717–1721. <https://doi.org/10.1007/s00405-015-3736-0>

- Desai, A. A., Aiyer, R. G., Pandya, V. K. & Nair, U. (2004). Post operative sensorineural hearing loss after middle ear surgery. *Indian journal of otolaryngology and head and neck surgery : official publication of the Association of Otolaryngologists of India*, 56(3), 240–242. <https://doi.org/10.1007/BF02974364>
- Djalilian, H. R., Rubinstein, M., Wu, E. C., Naemi, K., Zardouz, S., Karimi, K. & Wong, B. J. F. (2010). Optical coherence tomography of cholesteatoma. *Otology & neurotology : official publication of the American Otological Society, American Neurotology Society [and] European Academy of Otology and Neurotology*, 31(6), 932–935. <https://doi.org/10.1097/mao.0b013e3181e711b8>
- Dornelles, C., Costa, Sady S da, Meurer, L. & Schweiger, C. (2005). Some considerations about acquired adult and pediatric cholesteatomas. *Brazilian journal of otorhinolaryngology*, 71(4), 536–545.
- Dornelles, C., Rosito, Leticia Petersen Schmidt, Meurer, L., Costa, Sady Selaimen da, Argenta, A. & Alves, S. L. (2007). Hystology findings' correlation between the ossicular chain in the transoperative and cholesteatomas. *Brazilian journal of otorhinolaryngology*, 73(6), 738–743.
- Durvasula, Venkata S P, De, R., Baguley, D. M. & Moffat, D. A. (2005). Laser excision of glomus tympanicum tumours: long-term results. *European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies (EUFOS) : affiliated with the German Society for Oto-Rhino-Laryngology - Head and Neck Surgery*, 262(4), 325–327. <https://doi.org/10.1007/s00405-004-0822-0>
- Eisel, M. (2015). *Vergleichende Messung optischer Eigenschaften von biologischem Gewebe mittels Ulbrichtkugel, orts aufgelöster Remission und interstitieller Messmethodik* [unveröffentlichte Masterarbeit]. Ludwig-Maximilians-Universität München, München.
- Ferlito, A. (1993). A review of the definition, terminology and pathology of aural cholesteatoma. *The Journal of laryngology and otology*, 107(6), 483–488.
- Friebel, M., Roggan, A., Müller, G. & Meinke, M. (2006). Determination of optical properties of human blood in the spectral range 250 to 1100 nm using Monte Carlo simulations with hematocrit-dependent effective scattering phase functions. *Journal of biomedical optics*, 11(3), 34021. <https://doi.org/10.1117/1.2203659>
- Furukawa, H. & Fukuda, T. (2012). In vivo absorption spectroscopy for absolute measurement. *Biomedical optics express*, 3(10), 2587–2599. <https://doi.org/10.1364/BOE.3.002587>
- Gambichler, T., Jaedicke, V. & Terras, S. (2011). Optical coherence tomography in dermatology: technical and clinical aspects. *Archives of dermatological research*, 303(7), 457–473. <https://doi.org/10.1007/s00403-011-1152-x>
- Goyal, A., Singh, P. P. & Vashishth, A. (2013). Effect of mastoid drilling on hearing of the contralateral ear. *The Journal of laryngology and otology*, 127(10), 952–956. <https://doi.org/10.1017/S0022215113001965>

- Grevers, G. (2001). *Laser im Kopf-Hals-Bereich: Mit 27 Tabellen*. Springer.
- Hamilton, J. W. (2004). The role of the KTP laser in cholesteatoma surgery. *Acta oto-rhino-laryngologica Belgica*, 58(2), 101–102.
- Hamilton, J. W. (2005). Efficacy of the KTP laser in the treatment of middle ear cholesteatoma. *Otology & neurotology : official publication of the American Otological Society, American Neurotology Society [and] European Academy of Otology and Neurotology*, 26(2), 135–139.
- Hamilton, J. W. (2010). Systematic preservation of the ossicular chain in cholesteatoma surgery using a fiber-guided laser. *Otology & neurotology : official publication of the American Otological Society, American Neurotology Society [and] European Academy of Otology and Neurotology*, 31(7), 1104–1108.
<https://doi.org/10.1097/MAO.0b013e3181e9beb3>
- Hildmann, H. & Sudhoff, H. (1999). Cholesteatoma in children. *International journal of pediatric otorhinolaryngology*, 49 Suppl 1, S81-6.
- Hildmann, H., Sudhoff, H. & Jahnke, K. (2000). Grundzüge einer differenzierten Cholesteatom-Chirurgie. *Laryngo-Rhino-Otologie*, 79(S2), S73-S94.
<https://doi.org/10.1055/s-2000-15919>
- Hildmann, H., Sudhoff, H. & Bernal-Sprekelsen, M. (2006). *Middle ear surgery*. Springer.
- Holmquist, J., Oleander, R. & Hallen, O. (1979). Peroperative drill-generated noise levels in ear surgery. *Acta Oto-Laryngologica*, 87(5-6), 458–460.
- Iorga, R. E., Moraru, A., Ozturk, M. R. & Costin, D. (2018). The role of Optical Coherence Tomography in optic neuropathies. *Romanian journal of ophthalmology*, 62(1), 3–14.
- Jacob, R., Welkoborsky, H. J. & Mann, W. (2001). Epithelium-stroma interaction in cholesteatoma of the middle ear [Untersuchungen der Epithel-Stroma-Interaktion beim Cholesteatom des Mittelohres]. *Laryngo- rhino- otologie*, 80(1), 11–17.
<https://doi.org/10.1055/s-2001-11028>
- Jacques, S. L. (2013). Optical properties of biological tissues: a review. *Physics in medicine and biology*, 58(11), R37-61. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/58/11/R37>
- James, A. L., Cushing, S. & Papsin, B. C. (2016). Residual Cholesteatoma After Endoscope-guided Surgery in Children. *Otology & neurotology : official publication of the American Otological Society, American Neurotology Society [and] European Academy of Otology and Neurotology*, 37(2), 196–201.
<https://doi.org/10.1097/MAO.0000000000000948>
- Jovanovic, S. (2003). Laser in der Otologie [Lasers in otology]. *Laryngo- rhino- otologie*, 82 Suppl 1, S21-53. <https://doi.org/10.1055/s-2003-38925>
- Jung, M.-H., Lee, J. H., Cho, J.-G., Jung, H. H., Hwang, S.-J. & Chae, S.-W. (2008). Expressions of caspase-14 in human middle ear cholesteatoma. *The Laryngoscope*, 118(6), 1047–1050. <https://doi.org/10.1097/MLG.0b013e3181671b4d>
- Kara, N. & Watson, C. (2008). The challenging sinus tympani. *Clinical otolaryngology : official journal of ENT-UK ; official journal of Netherlands Society for Oto-Rhino-*

- Laryngology & Cervico-Facial Surgery*, 33(3), 295–296.
<https://doi.org/10.1111/j.1749-4486.2008.01683.x>
- Kazikdas, K. C., Onal, K. & Yildirim, N. (2015). Sensorineural hearing loss after ossicular manipulation and drill-generated acoustic trauma in type I tympanoplasty with and without mastoidectomy: A series of 51 cases. *Ear, nose, & throat journal*, 94(9), 378–398.
- Kemppainen, H. O., Puhakka, H. J., Laippala, P. J., Sipila, M. M., Manninen, M. P. & Karma, P. H. (1999). Epidemiology and aetiology of middle ear cholesteatoma. *Acta oto-laryngologica*, 119(5), 568–572.
- Kuczkowski, J., Sakowicz-Burkiewicz, M. & Izycka-Swieszewska, E. (2010). Expression of the receptor activator for nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in chronic otitis media. *American journal of otolaryngology*, 31(6), 404–409.
<https://doi.org/10.1016/j.amjoto.2009.06.004>
- Kylen, P. & Arlinger, S. (1976). Drill-generated noise levels in ear surgery. *Acta Oto-Laryngologica*, 82(5-6), 402–409.
- Kylen, P., Arlinger, S. D. & Bergholtz, L. M. (1977). Peroperative temporary threshold shift in ear surgery. An electrocochleographic study. *Acta Oto-Laryngologica*, 84(5-6), 393–401.
- Kylen, P., Arlinger, S., Jerlvall, L. & Harder, H. (1980). Ossicular manipulation in chronic ear surgery. An electrocochleographic study. *Archives of otolaryngology (Chicago, Ill. : 1960)*, 106(10), 598–601.
- Kylen, P., Stjernvall, J. E. & Arlinger, S. (1977). Variables affecting the drill-generated noise levels in ear surgery. *Acta Oto-Laryngologica*, 84(3-4), 252–259.
- Landegger, L. D. & Cohen, M. S. (2016). Use of the flexible fiber CO2 laser in pediatric transcanal endoscopic middle ear surgery. *International journal of pediatric otorhinolaryngology*, 85, 154–157. <https://doi.org/10.1016/j.ijporl.2016.03.039>
- Lasergestützte Operationsverfahren in der Urologie*. (2003). Thieme.
- Lenarz, T. & Boenninghaus, H.-G. (2012). *Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde: Mit 6 Tabellen ; [mit Fallquiz]* (14., überarb. Aufl). *Springer-Lehrbuch*. Springer.
- Lesinski, S. G. (1989). Lasers for otosclerosis. *The Laryngoscope*, 99(Suppl. 46), 1–24.
- Li, S., Zhan, H. & Peng, S. (2008). Expression of epidermal growth factor receptor Ki67 and p16 in human middle ear cholesteatoma. *Lin chuang er bi yan hou tou jing wai ke za zhi = Journal of clinical otorhinolaryngology, head, and neck surgery*, 22(21), 987–991.
- Lister, T., Wright, P. A. & Chappell, P. H. (2012). Optical properties of human skin. *Journal of biomedical optics*, 17(9), 90901-1. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.17.9.090901>
- Luers, J. C. & Huttenbrink, K.-B. (2016). Surgical anatomy and pathology of the middle ear. *Journal of anatomy*, 228(2), 338–353. <https://doi.org/10.1111/joa.12389>
- Marchioni, D., Alicandri-Ciufelli, M., Piccinini, A., Genovese, E., Monzani, D., Tarabichi, M. & Presutti, L. (2011). Surgical anatomy of transcanal endoscopic approach to the

- tympanic facial nerve. *The Laryngoscope*, 121(7), 1565–1573.
<https://doi.org/10.1002/lary.21819>
- McCabe, B. F., Sadé, J. & Abramson, M. (1976). Summary Reports on National—International Conferences. *Annals of Otology, Rhinology & Laryngology*, 85(6), 844–845.
- McCaffer, C. J., Pabla, L. & Watson, C. (2018). Curved adjustable fibre-optic diode laser in microscopic cholesteatoma surgery: description of use and review of the relevant literature. *The Journal of laryngology and otology*, 132(4), 360–363.
<https://doi.org/10.1017/S0022215118000117>
- McNaughton, A. (2010). *ImageJ Thresholding* [Measuring Area Using Thresholds]. Otago Centre for Confocal Microscopy.
- Meng, F. & Alayash, A. I. (2017). Determination of extinction coefficients of human hemoglobin in various redox states. *Analytical biochemistry*, 521, 11–19.
<https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.01.002>
- Meyerhoff, W. L. & Truelson, J. (1986). Cholesteatoma Staging. *The Laryngoscope*, 96(9), 935–939. <https://doi.org/10.1288/00005537-198609000-00002>
- Molony, N. C., Salto-Tellez, M. & Grant, W. E. (1998). KTP laser assisted excision of glomus tympanicum. *The Journal of laryngology and otology*, 112(10), 956–958.
- Moore, K. (2013). *Embryologie: Entwicklungsstadien - Frühentwicklung - Organogenese - Klinik* (6. Aufl.). Urban & Fischer in Elsevier.
- Nagel, D. (1997). The Er:YAG laser in ear surgery: first clinical results. *Lasers in surgery and medicine*, 21(1), 79–87.
- Nishizaki, K., Yuen, K., Ogawa, T., Nomiya, S., Okano, M. & Fukushima, K. (2001). Laser-assisted tympanoplasty for preservation of the ossicular chain in cholesteatoma. *American journal of otolaryngology*, 22(6), 424–427.
<https://doi.org/10.1053/ajot.2001.28081>
- Nitek, S., Wysocki, J., Niemczyk, K. & Ungier, E. (2006). The anatomy of the tympanic sinus. *Folia morphologica*, 65(3), 195–199.
- Olszewska, E., Olszewski, S., Borzym-Kluczyk, M. & Zwierz, K. (2007). Role of N-acetyl-beta-d-hexosaminidase in cholesteatoma tissue. *Acta biochimica Polonica*, 54(2), 365–370.
- Olszewska, E., Wagner, M., Bernal-Sprekelsen, M., Ebmeyer, J., Dazert, S., Hildmann, H. & Sudhoff, H. (2004). Etiopathogenesis of cholesteatoma. *European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies (EUFOS) : affiliated with the German Society for Oto-Rhino-Laryngology - Head and Neck Surgery*, 261(1), 6–24.
<https://doi.org/10.1007/s00405-003-0623-x>
- Palva, A. & Sorri, M. (1979). Can an operation of deaf ear be dangerous for hearing? *Acta oto-laryngologica. Supplementum*, 360, 155–157.
- Palva, T., Karja, J. & Palva, A. (1973). High-tone sensorineural losses following chronic ear surgery. *Archives of otolaryngology (Chicago, Ill. : 1960)*, 98(3), 176–178.

- Park, H. R., Min, S. K., Min, K., Jun, S. Y., Seo, J. & Kim, H. J. (2009). Increased expression of p63 and survivin in cholesteatomas. *Acta Oto-Laryngologica*, 129(3), 268–272. <https://doi.org/10.1080/00016480802251591>
- Perkins, R. C. (1980). Laser stepedotomy for otosclerosis. *The Laryngoscope*, 90(2), 228–240.
- Potsic, W. P., Korman, S. B., Samadi, D. S. & Wetmore, R. F. (2002). Congenital cholesteatoma: 20 years' experience at The Children's Hospital of Philadelphia. *Otolaryngology--head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, 126(4), 409–414.
- Prahl, S. A., van Gemert, M. J. & Welch, A. J. (1993). Determining the optical properties of turbid mediaby using the adding-doubling method. *Applied optics*, 32(4), 559–568. <https://doi.org/10.1364/AO.32.000559>
- Presutti, L., Gioacchini, F. M., Alicandri-Ciuffelli, M., Villari, D. & Marchioni, D. (2014). Results of endoscopic middle ear surgery for cholesteatoma treatment: a systematic review. *Acta otorhinolaryngologica Italica : organo ufficiale della Societa italiana di otorinolaringologia e chirurgia cervico-facciale*, 34(3), 153–157.
- Ramulu, S., Kale, A. D., Hallikerimath, S. & Kotrashetti, V. (2013). Comparing modified papanicolaou stain with ayoub-shklar and haematoxylin-eosin stain for demonstration of keratin in paraffin embedded tissue sections. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology : JOMFP*, 17(1), 23–30. <https://doi.org/10.4103/0973-029X.110698>
- Raulin, C. & Karsai, S. (Hrsg.). (2013). *Lasertherapie der Haut*. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-29910-0>
- Reiß, M. (2009). *Facharztwissen HNO-Heilkunde: Differenzierte Diagnostik und Therapie ; mit 142 Tabellen*. Springer.
- Robinson, P. J., Grant, H. R. & Bown, S. G. (1993). NdYAG laser treatment of a glomus tympanicum tumour. *The Journal of laryngology and otology*, 107(3), 236–237.
- Sade, J. & Fuchs, C. (1994). Cholesteatoma: ossicular destruction in adults and children. *The Journal of laryngology and otology*, 108(7), 541–544.
- Saleh, H. A. & Mills, R. P. (1999). Classification and staging of cholesteatoma. *Clinical Otolaryngology and Allied Sciences*, 24(4), 355–359. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2273.1999.00272.x>
- Schrötzlmair, F., Suchan, F., Kisser, U., Hempel, J.-M., Sroka, R. & Müller, J. (2013). Promising clinical results of an innovative self-crimping stapes prosthesis in otosclerosis surgery. *Otology & neurotology : official publication of the American Otological Society, American Neurotology Society [and] European Academy of Otology and Neurotology*, 34(9), 1571–1575. <https://doi.org/10.1097/MAO.0b013e3182a5d12d>
- Schrötzlmair, F., Suchan, F., Pongratz, T., Krause, E., Müller, J. & Sroka, R. (2018). Laser-assisted fixation of a nitinol stapes prosthesis. *Lasers in surgery and medicine*, 50(2), 153–157. <https://doi.org/10.1002/lsm.22738>

- Schünke, M., Schulte, E. & Schumacher, U. (2018). *Prometheus - Lernatlas der Anatomie: Kopf, Hals und Neuroanatomie* (5. überarbeitete und erweiterte Auflage). Georg Thieme Verlag. <https://doi.org/10.1055/b-006-149644>
- Sedlmaier, B., Franke, A., Sudhoff, H., Jovanovic, S. & Haisch, A. (2005). Photodynamic effect of argon and diode laser on cholesteatoma cell cultures after intravital staining with absorption enhancers. *Lasers in medical science*, 19(4), 248–256. <https://doi.org/10.1007/s10103-004-0322-x>
- Semaan, M. T. & Megerian, C. A. (2006). The pathophysiology of cholesteatoma. *Otolaryngologic clinics of North America*, 39(6), 1143–1159. <https://doi.org/10.1016/j.otc.2006.08.003>
- Silverstein, H., Rosenberg, S. & Jones, R. (1989). Small fenestra stapedotomies with and without KTP laser: a comparison. *The Laryngoscope*, 99(5), 485–488. <https://doi.org/10.1288/00005537-198905000-00003>
- Smyth, G. D. (1977). Sensorineural hearing loss in chronic ear surgery. *The Annals of otology, rhinology, and laryngology*, 86(1 Pt 1), 3–8. <https://doi.org/10.1177/000348947708600102>
- Sorri, M., Palva, A., Honkala, M. & Karma, P. (2009). Hearing Loss and Drilling Noise. *Acta Oto-Laryngologica*, 93(sup386), 301–302. <https://doi.org/10.3109/00016488209108548>
- Stark, T., Gurr, A. & Sudhoff, H. (2011). Prinzipien der sanierenden Cholesteatomchirurgie [Principles of cholesteatoma surgery]. *HNO*, 59(4), 393–9; quiz 400. <https://doi.org/10.1007/s00106-011-2265-4>
- Steiner, R. (2013). Laser-Gewebe-Wechselwirkungen. In C. Raulin & S. Karsai (Hrsg.), *Lasertherapie der Haut* (S. 25–39). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-29910-0_2
- Stüttgen, G. & Schaefer, H. (1974). Der Wassergehalt der Haut. In G. Stüttgen & H. Schaefer (Hrsg.), *Funktionelle Dermatologie: Grundlagen der Morphokinetik Pathophysiologie, Pharmakoanalyse und Therapie von Dermatosen* (S. 152–158). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-93018-8_18
- Suchozebrska-Jesioneck, D., Szymanski, M., Kurzepa, J., Golabek, W. & Stryjecka-Zimmer, M. (2008). Gelatinolytic activity of matrix metalloproteinases 2 and 9 in middle ear cholesteatoma. *Journal of otolaryngology - head & neck surgery = Le Journal d'oto-rhino-laryngologie et de chirurgie cervico-faciale*, 37(5), 628–632.
- Telmesani, L., Sayed, H. & Bahrani, N. (2009). Proposed clinical classification of cholesteatoma. *Egyptian Journal of Ear, Nose, Throat and Allied Sciences*, 10, 50–53.
- Thedinger, B. S. (1990). Applications of the KTP laser in chronic ear surgery. *The American journal of otology*, 11(2), 79–84.
- Theissing, J., A. Werner, J. & Rettinger, G. (2006). *HNO-Operationslehre* (4., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage). Thieme.
- Thumfart, W. F. (1998). *Operative Zugangswege in der HNO-Heilkunde*. Thieme.

- Toran, K. C., Shrestha, S., Kafle, P. & Deyasi, S. K. (2004). Surgical management of sinus tympani cholesteatoma. *Kathmandu University medical journal (KUMJ)*, 2(4), 297–300.
- Tos, M. (1979). Pathology of the ossicular chain in various chronic middle ear diseases. *The Journal of laryngology and otology*, 93(8), 769–780.
- Tos, M. (1988). Incidence, etiology and pathogenesis of cholesteatoma in children. *Advances in oto-rhino-laryngology*, 40, 110–117.
- Tos, M. (1993). *Manual of middle ear surgery*. Thieme.
- Tuchin, V. V. (2007). *Tissue optics: Light scattering methods and instruments for medical diagnosis* (2nd ed.). SPIE: PM166. SPIE/International Society for Optical Engineering.
- Vartiainen, E. & Seppä, J. (1997). Results of bone conduction following surgery for chronic ear disease. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 254(8), 384–386. <https://doi.org/10.1007/BF01642555>
- Vogel, A. & Venugopalan, V. (2003). Mechanisms of pulsed laser ablation of biological tissues. *Chemical reviews*, 103(2), 577–644. <https://doi.org/10.1021/cr010379n>
- Wang, L. V. & Wu, H.-i. (2007). *Biomedical optics: Principles and imaging*. Wiley-Interscience.
- Wang, Z., Devaiah, A. K., Feng, L., Dasai, U., Shapira, G., Weisberg, O., Torres, D. S. & Shapshay, S. M. (2006). Fiber-guided CO₂ laser surgery in an animal model. *Photomedicine and laser surgery*, 24(5), 646–650. <https://doi.org/10.1089/pho.2006.24.646>
- Welch, A. J. & Gemert, M. J. C. (1995). *Optical-Thermal Response of Laser-Irradiated Tissue. Lasers, Photonics, and Electro-Optics*. Springer US; Imprint; Springer.
- Welkoborsky, H.-J. (2011). Aktuelle Konzepte zur Pathogenese des erworbenen Cholesteatoms [Current concepts of the pathogenesis of acquired middle ear cholesteatoma]. *Laryngo- rhino- otologie*, 90(1), 38-48; quiz 49-50. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1268464>
- Welsch, U. (2010). *Lehrbuch Histologie* (3. Aufl.). Elsevier, Urban & Fischer.
- Welzel, J. (2010). Optical coherence tomography [Optische Kohärenztomographie]. *Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete*, 61(5), 416–420. <https://doi.org/10.1007/s00105-009-1879-x>
- Wilson, K. F., London, N. R. & Shelton, C. (2013). Tympanoplasty with intact canal wall mastoidectomy for cholesteatoma: long-term hearing outcomes. *The Laryngoscope*, 123(12), 3168–3171. <https://doi.org/10.1002/lary.24202>
- Wisotzky, E. L., Arens, P., Dommerich, S., Hilsmann, A., Eisert, P. & Uecker, F. C. (2020). Determination of the optical properties of cholesteatoma in the spectral range of 250 to 800 nm. *Biomedical optics express*, 11(3), 1489–1500. <https://doi.org/10.1364/BOE.384742>
- Wisotzky, E. L., Uecker, F. C., Dommerich, S., Hilsmann, A., Eisert, P. & Arens, P. (2019). Determination of optical properties of human tissues obtained from parotidectomy in

- the spectral range of 250 to 800 nm. *Journal of biomedical optics*, 24(12), 1–7.
<https://doi.org/10.1117/1.JBO.24.12.125001>
- Woo, H.-J., Park, J.-C., Bae, C. H., Song, S.-Y., Lee, H.-M. & Kim, Y.-D. (2009). Up-regulation of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in cholesteatoma. *Acta Oto-Laryngologica*, 129(6), 624–629. <https://doi.org/10.1080/00016480802342457>
- Yau, A. Y., Mahboubi, H., Maducdoc, M., Ghavami, Y. & Djalilian, H. R. (2015). Curved adjustable fiberoptic laser for endoscopic cholesteatoma surgery. *Otology & neurotology : official publication of the American Otological Society, American Neurotology Society [and] European Academy of Otology and Neurotology*, 36(1), 61–64. <https://doi.org/10.1097/MAO.0000000000000527>
- Yin, X., Strömberg, A.-K. & Duan, M. (2011). Evaluation of the noise generated by otological electrical drills and suction during cadaver surgery. *Acta Oto-Laryngologica*, 131(11), 1132–1135. <https://doi.org/10.3109/00016489.2011.600725>
- Zhu, D., Luo, Q. & Cen, J. (2003). Effects of dehydration on the optical properties of in vitro porcine liver. *Lasers in surgery and medicine*, 33(4), 226–231.
<https://doi.org/10.1002/lsm.10215>
- Zou, J., Bretlau, P., Pyykkö, I., Starck, J. & Toppila, E. (2001). Sensorineural hearing loss after vibration: an animal model for evaluating prevention and treatment of inner ear hearing loss. *Acta Oto-Laryngologica*, 121(2), 143–148.

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei meinem Betreuer Herrn Dr. med. Florian Schrötzlmair für die zahlreichen persönlichen Treffen bedanken, für die er sich stets viel Zeit genommen hat. Ich bedanke mich für die ständige Bereitschaft zur Hilfestellung und den unkomplizierten persönlichen Kontakt auch über eine längere Zeit hinweg. Nicht zuletzt trug sein großer persönlicher Einsatz maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Ein großer Dank gilt auch meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. rer. biol. hum. Ronald Sroka für die zahlreichen durchdachten und detaillierten Korrekturen. Er war mir stets eine große Hilfestellung bei allen physikalischen Fragestellungen und stand mir in zahlreichen persönlichen Korrektorgesprächen insbesondere zum Ende dieser Arbeit zur Seite.

Auch möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Laserforschungslabors für ihre Hilfsbereitschaft und das gute Arbeitsklima bedanken. Hier bedanke ich mich vor allem bei Bettina Sailer für die Mitarbeit zur Bestimmung der optischen Eigenschaften, Max Eisel für die Hilfestellung bei den physikalischen Grundlagen der Ulbrichtkugel, Thomas Pongratz für die Einarbeitung in die Laserversuchsreihe und Dr. Herbert Stepp für die Ausarbeitung der Sigmaplot-Transformation zur Breitenbestimmung der thermischen Zonen.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, meiner Familie und Freunden, die mich während meines gesamten Studiums und auch darüber hinaus unterstützt haben und stets ein offenes Ohr und Verständnis insbesondere in schwierigen Phasen hatten. Auch dank ihnen war es mir möglich stets am Ball zu bleiben und diese Arbeit schlussendlich zu einem erfolgreichen Abschluss zu bringen.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Überblick Anatomie Ohr (Ansicht von coronar) (Schünke et al., 2018)	8
Abbildung 2: linkes Trommelfell (Ansicht von sagittal) (Schünke et al. 2018)	9
Abbildung 3: Anatomie der Paukenhöhle (Ansicht von coronar) (Schünke et al., 2018)	10
Abbildung 4: Ausbreitung von Licht im Gewebe	19
Abbildung 5: Schematischer Aufbau eines Lasers (Grevers 2001)	23
Abbildung 6: Schematische Darstellung des Laserübergangs in einem Halbleiterlaser (Grevers 2001)	23
Abbildung 7: Laserinduzierte Prozesse in Abhängigkeit der Laserparameter (Grevers et al., 2001)	24
Abbildung 8: Versuchsaufbau CO ₂ -Laser	37
Abbildung 9: Versuchsaufbau Diodenlaser	38
Abbildung 10: Markierungshilfe mittels CO ₂ -Laser	38
Abbildung 11: Optischer Aufbau zur Kohärenztomographie	44
Abbildung 12: Winkelbestimmung	46
Abbildung 13: Tiefenbestimmung mittels Lot nach Drehen des Bildes um α	46
Abbildung 14: Winkelbestimmung bei großen Winkel und schmalen Konus	47
Abbildung 15: Tiefenbestimmung nach Drehung nicht möglich	47
Abbildung 16: Tiefenbestimmung mittels Tangente	47
Abbildung 17: H.E. gefärbtes Präparat zur Bestimmung der thermischen Zonen	51
Abbildung 18: Abbildungsäquivalent der Transformation zur Berechnung der durchschnittlichen Zonenbreite (hier: Berechnung der Gesamtzone)	51
Abbildung 19: Wechselwirkungen von einstrahlendem Licht innerhalb eines Gewebes	54
Abbildung 20: Versuchsaufbau Ulbrichtkugel	55
Abbildung 21: Messung der diffusen Transmission	57
Abbildung 22: Referenzmessung für T_d und R_d	58
Abbildung 23: Messung der diffusen Reflexion	59
Abbildung 24: Messung der kollimierten Transmission	60
Abbildung 25: Absorptionskoeffizient μ_a der vermessenen Proben mit Aufschlüsselung anhand des makroskopischen Erscheinungsbildes	64
Abbildung 26: reduzierter Streukoeffizient μ_s' aller vermessenen Proben mit Aufschlüsselung anhand des makroskopischen Erscheinungsbildes	66

Abbildung 27: Diodenlaser: Breite der zusammengeführten Karbonisations- plus Vakuolisierungszonen in Abhängigkeit der Energie bei Applikation am Cholesteatomgewebe.....	68
Abbildung 28: CO ₂ -Laser: Breite der zusammengeführten Karbonisations- plus Vakuolisierungszonen in Abhängigkeit der Energie bei Applikation am Cholesteatomgewebe.....	68
Abbildung 29: Vergleich CO ₂ - und Diodenlaser: Breite der zusammengeführten Karbonisations- plus Vakuolisierungszonen in Abhängigkeit der Energie bei Applikation am Cholesteatomgewebe.....	69
Abbildung 30: Diodenlaser: Breite der gesamten thermischen Schäden in Abhängigkeit der Energie bei Applikation am Cholesteatomgewebe	70
Abbildung 31: CO ₂ -Laser: Breite der gesamten thermischen Schäden in Abhängigkeit der Energie bei Applikation am Cholesteatomgewebe	71
Abbildung 32: Vergleich CO ₂ - und Diodenlaser: Breite der gesamten thermischen Schäden in Abhängigkeit der Energie bei Applikation am Cholesteatomgewebe.....	71
Abbildung 33: Kryohistologische Schnitte: Vergleich CO ₂ - und Diodenlaser: Ablationsfläche in Abhängigkeit der Energie	72
Abbildung 34: Diodenlaser - kryohistologische Schnitte: induzierte Ablationstiefe in Abhängigkeit der Energie bei Applikation am Cholesteatom	74
Abbildung 35: CO ₂ -Laser - kryohistologische Schnitte: induzierte Ablationstiefe in Abhängigkeit der Energie bei Applikation am Cholesteatom	75
Abbildung 36: kryohistologische Schnitte: Vergleich zwischen induzierten Ablationstiefen von CO ₂ - und Diodenlaser in Abhängigkeit der Energie	75
Abbildung 37: Diodenlaser - OCT: induzierte Ablationstiefe in Abhängigkeit der Energie bei Applikation am Cholesteatom	77
Abbildung 38: CO ₂ -Laser - OCT: induzierte Ablationstiefe in Abhängigkeit der Energie bei Applikation am Cholesteatom	77
Abbildung 39: OCT: Vergleich zwischen induzierten Ablationstiefen von CO ₂ - und Diodenlaser in Abhängigkeit der Energie bei Applikation am Cholesteatom	78
Abbildung 40: Diodenlaser - OCT: induzierte Ablationstiefe in Abhängigkeit der Energie bei Applikation am Gehörknöchelchen	80
Abbildung 41: CO ₂ -Laser - OCT: induzierte Ablationstiefe in Abhängigkeit der Energie bei Applikation am Gehörknöchelchen	81
Abbildung 42: OCT: Vergleich zwischen induzierten Ablationstiefen von CO ₂ - und Diodenlaser in Abhängigkeit der Energie bei Applikation am Gehörknöchelchen...	81
Abbildung 43: Absorptionseigenschaften verschiedener absorbierender Medien (Grevers, 2001)	84

Abbildung 44: molarer Extinktionskoeffizient von Oxyhämoglobin (Doppelpeak) und Desoxyhämoglobin (einfacher peak) (Furukawa & Fukuda, 2012).....	85
---	----

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ablationstiefenbestimmung am Cholesteatom anhand der kryohistologischen Schnitte	43
Tabelle 2: Ablationstiefenbestimmung am Cholesteatom anhand der OCT-Aufnahmen.....	48
Tabelle 3: Ablationstiefenbestimmung am humanen Ossikel anhand der OCT-Aufnahmen.....	49
Tabelle 4: Bestimmung der thermischen Wechselwirkungen – Beurteilung der Karbonisations- & Vakuolisierungszone	52
Tabelle 5: Bestimmung der thermischen Wechselwirkungen - Beurteilung der Gesamtschädigungszone	52
Tabelle 6: Bestimmung der Ablationsfläche am Cholesteatom anhand der kryohistologischen Schnitte	53
Tabelle 7: Übersicht Diodenlaser - entstehende Kollateralschäden bei unterschiedlichen Ablationstiefen anhand der Regressionsgeraden	83
Tabelle 8: Übersicht CO ₂ -Laser - entstehende Kollateralschäden bei unterschiedlichen Ablationstiefen anhand der Regressionsgeraden	83
Tabelle 9: Vor- und Nachteile der verwendeten Laser	99



Eidesstattliche Versicherung

Fuchs, Sebastian

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

Der Einsatz der Lasertechnologie bei der Cholesteatomresektion - eine Ex-vivo-Studie

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.

München, 24.01.2026

Ort, Datum

Sebastian Fuchs

Unterschrift Sebastian Fuchs



Erklärung zur Übereinstimmung der gebundenen Ausgabe der Dissertation mit der elektronischen Fassung

Fuchs, Sebastian

Name, Vorname

Hiermit erkläre ich, dass die elektronische Version der eingereichten Dissertation mit dem Titel:

Der Einsatz der Lasertechnologie bei der Cholesteatomresektion - eine Ex-vivo-Studie

in Inhalt und Formatierung mit den gedruckten und gebundenen Exemplaren übereinstimmt.

München, 24.01.2026

Ort, Datum

Sebastian Fuchs

Unterschrift Sebastian Fuchs