AUS DEM LEHRSTUHL FÜR HALS-, NASEN- UND OHRENHEILKUNDE
PROF. DR. STRUTZ
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

ENTWICKLUNG EINES IN VITRO MODELLS ZUR STIMMLIPPENAUGMENTATION

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Ulrike Arnold

2010

Dekan:	**Prof. Dr. Bernhard Weber**
1. Berichterstatter:	**Prof. Dr. Dr. h. c. T. Hacki**
2. Berichterstatter:	**PD Dr. Ralf Bürgers**
Tag der mündlichen Prüfung:	**26.05.2010**

Meinen Eltern gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG 9

1.1 Die Bedeutung der Stimme 9

1.2 Anatomie des Kehlkopfes 9

1.3 Ablauf der Phonation 11

2 ZIELSETZUNG 14

2.1 Beschreibung der Stimmlippenaugmentation 14

2.2 Synopsis herkömmlicher Augmentationsmittel 17

2.3 Eigenschaften von Fibringel 19

3 MATERIAL UND METHODEN 23

3.1 Präparation des Kehlkopfmodells 23

3.2 Versuchsaufbau 25

3.3 Hochgeschwindigkeitsglottographische Aufnahmen 27

3.4. Histologische Untersuchungen 29

3.5. Untersuchung zu den rheologischen Eigenschaften des Augmentationsmaterials 32

4 ERGEBNISSE DER STUDIE 34

4.1 Hochgeschwindigkeitsglottographische Auswertung 34

4.2 Histologische Ergebnisse 39

4.3 Rheologisches Verhalten 43

5 DISKUSSION 49

5.1 Alternative Versuchstiere 49

5.2 Vergleich verschiedener Kehlkopfmodelle 51

5.3 Reproduzierbarkeit des Modells und des Versuchsaufbaus 53

5.4 Fibringelmodifikation 55

6 ZUSAMMENFASSUNG 57

6.1 Hintergrund 57

6.2 Material und Methoden 57

6.3 Ergebnisse 58

6.4 Schlussfolgerungen 59

7 ABBILDUNGSVERZEICHNIS 60

8 LITERATURVERZEICHNIS 61

DANKSAGUNGEN 66

LEBENSLAUF 67

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG 68

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
Aufl.	Auflage
B	Bel
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cm	Zentimeter
D	Dimension
DAPI	4`,6- Diamidino-2-phenylindol
dB	Dezibel
Diss.	Dissertation
DNA	Desoxyribonukleinsäure
et al.	et alii/-ae (und andere)
evtl.	eventuell
EZM	Extrazelluläre Matrix
f.	folgende
ff.	fortfolgende
g	Gramm
G*	komplexes Schermodul
griech.	griechisch
HE	Hämatoxylin-Eosin
herv.	hervorgehoben
HNO	Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde
Hz	Hertz
Jg.	Jahrgang
l	Liter
lat.	lateinisch
m	Meter

m	milli-
M	mol/l
M.	Musculus
min	Minute(n)
Mio.	Million(en)
Mrd.	Milliarde(n)
ms	Millisekunde
µ	mikro
n	nano
N	Newton
N.	Nervus
Op.	Operation
Pa	Pascal
PBS	phosphat buffered saline (Phosphat gepufferte Salzlösung)
PFA	Paraformaldehyd
pH	potentia/pondus Hydrogenii (lat. pondus = Gewicht / potentia = Kraft, hydrogenium = Wasserstoff)
U	Unit
US$	amerikanische Dollar
S.	Seite
Sec	Sekunde(n)
sog.	so genannte
SPL	Sound Pressure Level
Tab.	Tabelle
usw.	und so weiter
Verf.	Verfasser
Vergr.	Vergrößerung
vgl.	vergleiche
z. B.	zum Beispiel

1 EINLEITUNG

1.1 Die Bedeutung der Stimme

„Zeichnen ist Sprache für die Augen, Sprache ist Malerei für das Ohr."

[Herv. durch den Verf.] (J. JOUBERT, 1838)

Die Stimme ist neben dem Augenlicht eines der wichtigsten Güter des Menschen. Dies verdeutlichen Aussagen von DUFLO et al. (2006, S. 2171), die in Stimmerkrankungen eine Einschränkung der **Lebensqualität** in jedem Lebensbereich sehen. Untersuchungen von RUBEN (2000, S. 241ff.) zu Folge, liegt der volkswirtschaftliche Verlust durch eine beeinträchtigte Kommunikationsfähigkeit allein in den USA bei über 150 Mrd. US$ jährlich. Besonders schwer in eine Arbeitsstelle zu vermitteln sind diejenigen, deren stimmliche Kommunikation eingeschränkt ist. Ganz unabhängig davon ist es für den Betroffenen und dessen Angehörige ein schwerer Schicksalsschlag, wenn durch Stimmfunktionsstörungen der Informationsaustausch beeinträchtigt ist.

Aus den genannten Gründen sind Maßnahmen zur Wiederherstellung der physiologischen Stimmfunktion erklärtes Ziel der **Phonochirurgie** und Inhalt dieser Arbeit. Das erste Kapitel befasst sich mit den Voraussetzungen für eine physiologische Phonation. Im Mittelpunkt des zweiten Kapitels steht der Vergleich gängiger Verfahren zur **Stimmrehabilitation** sowie herkömmlicher Kehlkopfmodelle. Gegenstand des dritten Kapitels ist die Entwicklung eines Modells zur **Stimmlippenaugmentation** am Beispiel von **Kollagen, Hyaluronsäure und Fibringel**. Die Auswertung der Experimente erfolgt im vierten Kapitel und berücksichtigt hochgeschwindigkeitsglottographische, histologische sowie rheologische Eigenschaften der drei Augmentationsmaterialien. Zum Abschluss wird diskutiert, inwieweit das Modell den Anforderungen genügt und Fibringel klinisch einsetzbar ist.

1.2 Anatomie des Kehlkopfes

Die folgende Darstellung lehnt sich an ALZHEIMER et al. (2007 S. 154), BOENNINGHAUS et al. (2005, S.239ff.) und SOMMER (2006, S. 7ff.) an. Sie haben die Anatomie des menschlichen Kehlkopfs wie folgt beschrieben:

Der Kehlkopf, **Larynx**, befindet sich auf Höhe des 5. und 6. Halswirbels, wobei die Lage abhängig von der Funktion bis zu zwei Zentimeter variieren kann. Die Kehlkopfknorpel, **Cartilagines laryngis**, bilden das Wandskelett des Kehlkopfes; durch die inserierende Muskulatur sind die Knorpel im Bereich der Gelenke gegeneinander beweglich. Der Schildknorpel, **Cartilago thyroidea**, und der Ringknorpel, **Cartilago cricoidea**, zählen zu den großen Kehlkopfknorpeln. Die beiden Stellknorpel, **Cartilagines arytenoideae**, und der Kehldeckel, **Cartilago epiglottica**, gehören zu den kleineren. Zwei paarige Schleimhautfalten, die Taschenfalten, **Plicae vestibulares**, und die Stimmlippen, **Plicae vocales**, teilen die Kehlkopfhöhle, **Cavitas laryngis**, in drei Etagen:

- **Vestibulum laryngis**, supraglottischer Raum
- **Cavitas laryngis intermediale**, Glottis
- **Cavitas infraglottica**, subglottischer Raum

Der Kehlkopfeingang und die mechanisch stark beanspruchten Stimmlippen sind mit mehrschichtigen Plattenepithel ausgekleidet. Alle anderen Bereiche sind von respiratorischen Epithel (mehrreihiges Flimmerepithel) bedeckt.

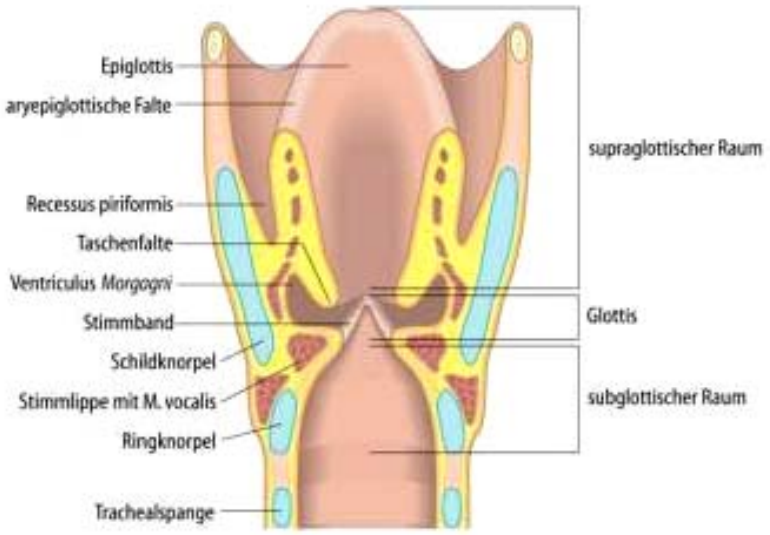


Abb. 1: Querschnitt durch das Kehlkopfinnere (Quelle: BOENNINGHAUS et al. 2005, S. 241)

Die Abbildung von BOENNINGHAUS et al. (2005, S. 241) zeigt das Kehlkopfinnere schematisch. Besondere Relevanz besitzt nach Meinung des Autors die Lage der Stimmlippen. Deren Aufgabe liegt sowohl in der **Modulation des Luftstroms** (vgl. KOB 2002, S. 114), als auch im **Verschluss der Trachea**. Dies ermöglicht den physiologischen Ablauf der Atmung und des Schluckvorgangs (vgl. BOENNINGHAUS et al. 2005, S. 239; ALZHEIMER et al. 2007, S. 154). Folgt man den Überlegungen von BOENNINGHAUS et al. (2005, S. 239), wirken sich Störungen in diesem Mechanismus negativ auf die Lebensqualität aus.

1.3 Ablauf der Phonation

Was hat eine Trompete mit der Phonation gemeinsam?

Abb. 2: Trompete mit Mundstück (Quelle: ARNOLD, U. Privatbild)

Gemäß der Ausführungen von KHOSLA et al. (2008, S. 134) entsteht der Klang durch die **Stimmlippenvibration** und wird anschließend vom Vokaltrakt gefiltert. TITZE et al. (1996, S. 2234) bezeichnen den Epilarynx (den zum Mund gerichteten Anteil des Kehlkopfes) treffend als **Mundstück** einer Trompete. Seine Aufgabe besteht darin, die hohe innere Impedanz (körpereigener Widerstand) der Glottis der niedrigen Impedanz des Stimmtraktes und des freien Raumes anzupassen. Mit Hilfe von Tierversuchen wiesen KHOSLA et al. (2008, S. 136) nach, dass ein stabiler Ton aus Flussraten von 350-410 cm^3/s resultiert.

Exakt beschreiben ALZHEIMER et al. (2007, S. 155) den Vorgang bei der Phonation: Vorraussetzung ist die **BERNOULLI-Schwingung der Stimmlippen**. Diese entsteht durch Ausatmen gegen die verschlossenen Stimmlippen. Kennzeichen sind periodische Änderungen von Druck und Strömungsgeschwindigkeit. Hat der subglottische Druck Werte über 500-1500 Pascal [Pa] erreicht, öffnet sich die Stimmritze und die Luft kann hindurch strömen. Dem Gesetz von BERNOULLI folgend, führt eine erhöhte Strömungsgeschwindigkeit in Glottisnähe zu einem Unterdruck, der die Stimmlippen wieder annähert und die Glottis verschließt. Bei der Exspiration steigt der subglottische Druck wieder, bis die Luft durch die Stimmritze erneut entweichen kann. Dabei hat die Spannung der Stimmlippen Einfluss auf die Stimmfrequenz. Diese ist definiert als die Häufigkeit mit der das Öffnen und Schließen der Stimmlippen aufeinander folgt. Das Stimmspektrum variiert zwischen 80 und 1400 Hertz [Hz] und ist zusätzlich von der Stimmlippenlänge abhängig.
Man findet folgende Einteilung (vgl. ALZHEIMER et al. 2007, S. 155):

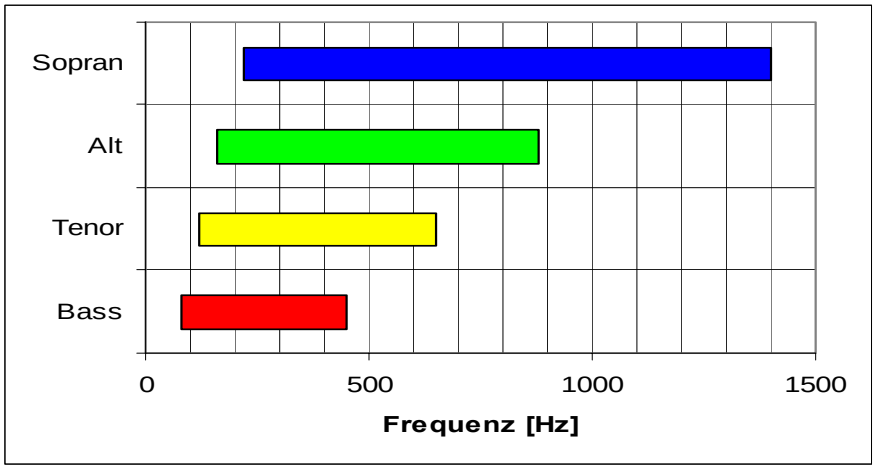


Abb. 3: Einteilung der Stimmfrequenzen (Quelle: ARNOLD, U. Privatbild)

- Bass: 80-450 Hz
- Tenor: 120-650 Hz
- Alt: 160-880 Hz
- Sopran: 220-1400 Hz

Der Klang enthält ein reiches Spektrum an verschiedenen Tönen. Geschulte Stimmen erzielen Werte über 100 Dezibel [dB] SPL (Sound Pressure Level, zu deutsch Schalldruckpegel) gemessen in einem Meter Entfernung zur Schallquelle. Es handelt sich dabei um eine technische Größe, die in Dezibel angegeben wird und nur bedingt Rückschlüsse auf die wahrgenommene Empfindung zulässt. Dies entspricht einem subglottischen Druck von 1500 Pa (vgl. ALZHEIMER et al. 2007, S. 155).

Anschließend folgt die **Artikulation**: Im Ansatzrohr, das Mund-, Rachen- und Nasenraum umfasst, wird die Stimme moduliert. Ebenfalls Einfluss auf das Frequenzspektrum haben Rachenwand, Zunge und Wangen, welche die Resonanzeigenschaften des Ansatzrohres ändern. Der niedrigste Druck, der gerade eine Schwingung erzeugt, wird als Grenzdruck bezeichnet (vgl. ALZHEIMER et al. 2007, S. 155). Stimmlippengeometrie und viskoelastische Eigenschaften bestimmen die Stimmlippenschwingungen. Viskoelastizität ist durch ein partiell elastisches und zugleich viskoses Verhalten gekennzeichnet. Diese besonderen Merkmale bezeichnen TAO et al. (2007, S. 1637) und TITZE (1988 S. 1536, 1989 S. 901) als **proportional** zu der Glottiskonfiguration und den Gewebeeigenschaften. Das Ziel TITZEs (1988, S. 903) war, die Relation zwischen Schwingungsamplitude und subglottischem Druck zu quantifizieren. Dies gelang durch Beobachtungen des Kehlkopfes mittels Videostroboskopie: größere Drucke erzeugen größere Amplituden. Er kommt zu dem Ergebnis, dass die Amplitude annähernd mit der **Quadratwurzel** des subglottischen Drucks korreliert.

2 ZIELSETZUNG

2.1 Beschreibung der Stimmlippenaugmentation

Wenn nach Recurrensparesen kein Anhaltspunkt zur Remission besteht, kann eine Stimmlippenaugmentation indiziert sein (vgl. LÜERßEN 2005, S.1, ROSANOWSKI et al. 1996, S. 290). Der folgende Abschnitt lehnt sich an BOENNINGHAUS et al. (2005, S. 290) an, welche die Auffassung vertreten, dass eine Schädigung des **N. recurrens** negative Auswirkungen auf eine bzw. beide Stimmlippen haben kann. Lähmungen der Stimmlippe sind grundsätzlich als Symptom zu werten und können unterschiedlichste Ursachen haben (vgl. BÖHME 2003, S. 242):

- Bronchialkarzinome: Recurrensparesen infolge von Bronchialkarzinomen nehmen an Häufigkeit zu. Vorwiegend linksseitig, häufigste Ursache einer Stimmlippenlähmung
- Strumektomie: Zweithäufigste Ursache einer Stimmlippenlähmung
- Ösophaguskarzinom: oberes Drittel, postoperativ
- Mediastinalerkrankungen: M. Hodgkin, Non-Hodgkin-Tumoren, Metastasen
- Ösophagusoperationen: Pulsionsdivertikel
- Neck dissection
- scharfes oder stumpfes Halstrauma
- Intubationsnarkose: Überdehnung des N. vagus durch Lagerung
- Entzündliche Erkrankungen: Grippe, Neuroborreliose
- Neurotoxisch: medikamentös bedingte Vagus-/Recurrensparesen (z.B. Zytostatika wie Vincristin)
- Herz- und Gefäßerkrankungen:
  a. Aneurysma der Aorta
  b. Ortner Syndrom bei Vitien, Perikarditis
  c. nach herzchirurgischen Eingriffen (Ductus Botalli, Herz-Lungen-Transplantation)
  d. rekonstruktive Karotischirurgie

Ein weiterer Grund besteht in **myogenen Lähmungen** durch direkte Schädigung der Kehlkopfmuskulatur (Entzündungen, Diphtherie). Danach bleibt gelegentlich ein

ungenügender Glottisschluss zurück, eine so genannte **Internusschwäche**. Bei Spiegeluntersuchungen zeigt sich ein ovolärer Spalt zwischen den Stimmlippen. Ein ähnlicher Befund besteht bei sehr geschwächten Patienten oder im hohen Alter aufgrund geringerer Spannung der Stimmlippen. Man spricht dann von **Presbysphonie** (vgl. BÖHME, S. 239f.). Gemäß der klinischen Erfahrung von HACKI et al. (1999, S. 508) hat die temporäre Behandlung von **Glottisschlussinsuffizienzen** mittels Stimmlippenaugmentation bestehende Relevanz. Diese Technik erlaubt eine Annäherung der Stimmlippen von extern bzw. intern. Der erzielte Glottisschluss ist Grundvoraussetzung zur Phonation.

Lähmungen der Stimmlippe können außerdem bei Schädigung des **N. vagus** auftreten. Neben der Parese aller Muskeln verharrt die gelähmte Stimmlippe in Mittelstellung zwischen Öffnung und Schluss, so dass kein Glottisschluss möglich ist. Die geeignete Therapie besteht in einer Stimmlippenaugmentation bzw. einer Thyreoplastik (vgl. BÖHME 2003, S. 203f.).

Eine weitere Indikation stellen Substanzdefekte dar wie der **Sulcus glottidis**, der sowohl angeboren als auch erworben sein kann: Die Längsfurche entlang der medianen Stimmlippe beruht auf Adhäsion des Stimmlippenepithels mit dem Ligamentum vocale und ist einseitig häufiger zu finden. Dabei sind keine geschlechtsspezifischen Unterschiede bekannt (vgl. BÖHME 2003, S. 203f.). Neben konservativer Stimmtherapie wird ein phonochirurgischer Eingriff empfohlen. Maßnahmen zur Wiederherstellung der Stimme werden unter dem Begriff **Phonochirurgie** subsumiert. Grundsätzlich stellt die Phonochirurgie bei klarer Indikationsstellung eine Alternative zur konservativen Stimmtherapie dar (vgl. BÖHME 2003, S. 265). Diese Eingriffe sollten jedoch nicht isoliert durchgeführt werden. Nachstehend aufgeführte Behandlungen sind im Rahmen des Eingriffs ebenfalls durchzuführen (vgl. BÖHME 2003, S. 265):

- Medikamente
- Stimmtherapie (prä- und postoperativ)
- Psychotherapie
- Chirurgie

Diese komplexe Behandlung sollte präoperativ entsprechend vorbereitet werden. Es erfolgt eine Absprache der zu erwartenden Stimmfunktion sowie der Patientenwünsche hinsichtlich Klang, Belastbarkeit und Durchdringlichkeit. Zusätzlich sind in diesem Zusammenhang konservative Verfahren zu überprüfen. Die Phonochirurgie umfasst auch die postoperative Behandlung: Diese sieht zehn Tage Stimmruhe bei Glottisplastik vor (Gefahr der Nahtdehiszenz und der Lappendestruktion) sowie eine modifizierte Stimmruhe. Diese Maßnahme bedeutet kein Sprechen über längere Zeit, kein Schreien, Singen oder Unterrichten, kein Sprechen im Lärm, kein Telefonieren, kein Räuspern oder Husten, kein Flüstern, kein Alkohol und kein Rauchen. Auf eine begleitende stroboskopische Untersuchung sollte keinesfalls verzichtet werden (vgl. BÖHME 2003, S. 265).

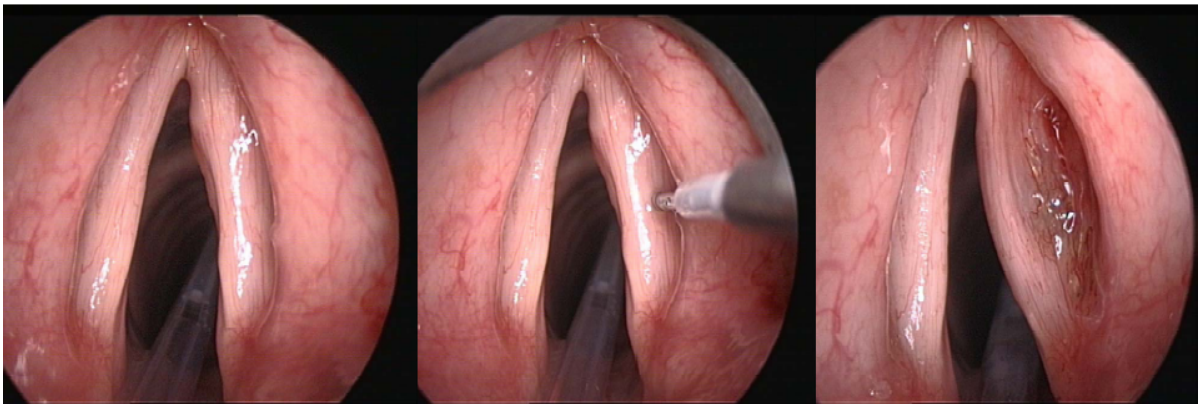


Abb. 4: Procedere bei der Stimmlippenaugmentation (Quelle: WITTEKINDT 2008, S. 46)

Die Abbildung von WITTEKINDT (2008, S. 46) veranschaulicht die übliche Vorgehensweise bei einer Stimmlippenaugmentation. Unter **Lokalanästhesie** wird mit einer Kanüle die entsprechende Stimmlippe augmentiert, wobei bei den Versuchen auf eine Applikation in den **lateralen** Bereich des M. vocalis oder **zwischen** M. vocalis und M. thyroarytenoideus geachtet wird. Nach Ansicht von HACKI et al. (1999, S. 509) verhindert dies eine Füllung des **REINKE´schen Raumes,** die negative Auswirkungen auf die Stimmbildung hätte, da es zu einer Versteifung der Stimmlippen kommen kann. Dies stellt eine Innovation dar, da üblicherweise in die Lamina propria **randkantennah** augmentiert wird. Der Sinn besteht darin, die Stimmlippe nach medial zu verlagern und somit einen Glottisschluss und damit auch die für die Phonation benötigte Schwingung zu erzielen. ROSANOWSKI et al. (1996, S. 290)

betonen, dass diese phonochirurgischen Maßnahmen lege artis nicht vor Ablauf eines Jahres nach Auftreten der Parese indiziert sind, da es häufig zu einer Spontanremission kommen kann.

Vorteile der Stimmlippenunterfütterung sind laut WITTEKINDT (2008, S. 46):
Die kurze Operationszeit für einen endoskopisch durchführbaren Eingriff mit niedriger Komplikationsrate ohne sichtbare Narben. Dies ist gerade im ästhetisch anspruchsvollen Kopf-, Halsbereich für den Patienten relevant. Für diesen Eingriff stehen verschiedene Materialien zur Verfügung, die sowohl resorbierbar, als auch nicht resorbierbar sind. Eine Korrektur ist bei allen Materialien möglich. Auf die einzelnen Produkte soll im folgenden Abschnitt eingegangen werden.

2.2 Synopsis herkömmlicher Augmentationsmittel

FORD (2008, S. 1711ff.) beschreibt chronologisch die Entwicklung der verschiedenen Injektionsmittel:
1911 wurde zur ersten Stimmlippenaugmentation Paraffin benutzt. 50 Jahre später gelang es ARNOLD (1963, S. 179ff.) Teflon (Polytef Paste) zu injizieren. Die heute immer noch aktuellen Grundsätze für Stimmlippenaugmentationsmaterial wurden ebenfalls von ihm festgelegt:

1. vom Host toleriert
2. leicht zu applizieren
3. ausreichend stabil

Dem ersten Anschein nach entsprach Teflon diesen Kriterien. Laborstudien hingegen wiesen Granulombildung und Teflonpartikelwanderung nach. ROSANOWSKI et al. (1996, S. 292) betonen, dass durch die Teflonmigration der REINKE´sche Raum obliterieren kann. Dies führt zu ungünstiger Narbenbildung. Objektive Untersuchungsmethoden (wie z.B. Videostroboskopie) bestätigten die schlechten Eigenschaften und forcierten die Suche nach einem optimalen Injektionsmaterial gemäß den **ARNOLD´schen Paradigmen**. Frühe

Teflonvariationen wie Silikon und Bioplastik wurden zu Polyacrylamid Hydrogel und Hydroxylapatit weiterentwickelt. Zusätzlich erleichterte der technische Fortschritt die exakte Positionierung des Implantats. HIRANOs (1974, S. 89ff.) histologische Aufarbeitung der Stimmlippenstruktur führte zu Versuchen, Rinderkollagen in die tiefe Lamina propria zu injizieren, die von Natur aus besonders kollagenreich ist. Kollagen erfüllte zwei Vorraussetzungen für ein gelungenes Implantat, leichte Injektion bei guter biologischer Verträglichkeit, hatte aber in vivo eine ungewiss lange Persistenz. Studien von HACKI et al. (1999, S. 511) zeigen, dass Kollageninjektionen hinsichtlich des Schwingungsverhalten der Stimmlippen, verglichen mit Teflon und Gelatine, klinisch akzeptabel sind. Negative Aspekte sind voraussichtlich auf Diffusion in den paraglottischen Raum zurückzuführen. Ein weiterer Nachteil besteht in der relativ kurzen Resorptionszeit von vier bis zwölf Monaten. Bedingung ist zudem ein negativer, intrakutaner Allergietest, der mindestens vier Wochen erfordert. Diese Nachteile führten zur Entwicklung weiterer Biomaterialien wie Kollagenvariationen, Fett, Faszie und azelluläre Matrix. Autologe Faszie ist besonders tauglich für Injektionen in den REINKE´schen Raum, weniger geeignet dagegen für den Muskel. Langzeitstudien über 36 Monate von TSUNODA et al. (2001, 453ff.) und REIJONEN (2002, S. 523ff.) wiesen positive Eigenschaften nach.

Eine weitere Eigenschaft von Augmentationsmitteln konnte nachgewiesen werden:
Die entsprechende Porosität ermöglicht das Einsprossen von Blutgefäßen im Empfängerorganismus. Diese **Vaskularisierung** ist Basis der Gewebeintegration. Fett hat sich entsprechend der Meinung von HSIUNG et al. (2000, S.1026ff.), REMACLE et al. (2001, S. 393ff.) und Mc CULLOCH et al. (2002, S.1235ff.) nicht durchsetzen können. Histologische Analysen kombiniert mit biomechanischen Versuchen rückten Hyaluronsäure in den Fokus wissenschaftlicher Untersuchungen. Interessant ist ihr vermehrtes Vorkommen in fetalen Wunden, die narbenfrei abheilen (vgl. ROUSSEAU et al. 2004, S. 767). Diese Eigenschaften stammen daher, dass Hyaluronsäure früher als Kollagen in der Lage ist, Gewebe umzubauen. Postoperative Erfolge sorgen für einen steigenden Einsatz von Hyaluronsäure. Auf molekularer Ebene erklärt sich ihr Erfolg darin, dass die extrazelluläre Matrix (EZM) der Stimmlippe aus unterschiedlichen Molekülen besteht, die für das charakteristische Schwingungsverhalten sorgen. Das Glycosaminoglycan Hyaluronsäure beeinflusst die

viskoelastischen Eigenschaften durch Flüssigkeitsgehalt und Dicke der Lamina propria und ist ein besonders geeignetes Biomaterial zur Geweberegeneration. Die enzymatische Entfernung von Hyaluronsäure aus der Lamina propria sorgte für eine nachlassende Steifigkeit der Stimmlippe um 35 %, während die dynamische Viskosität bei Frequenzen über 1 Hz um 70 % anstieg. CHAN et al. (2001, S. 607ff.) zog daraus den Schluss, dass Hyaluronsäure wahrscheinlich die Gewebeviskosität einstellt, die die Grundvoraussetzung für eine physiologische Phonation ist (vgl. ROUSSEAU et al. 2004, S. 767). Hyaluronsäure-Hydrogele verursachen keine immunologischen Abwehrreaktionen. Sie verweilen länger im Körper als reine Hyaluronsäure, wie DUFLO (2006, S. 2172) betont, dennoch werden sie vom Organismus nach und nach resorbiert.

FORD (2008, S. 1712) sieht das Ziel von **Tissue engineering** darin**,** injizierbare Materialien zu entwickeln, die nicht allein passive Füllstoffe sind, sondern physiologisches Gewebe wiederherstellen sollen. Stimmlippen erfordern wie jedes andere Gewebe eine Kombination aus Zellen, Stützgerüst und Signalmolekülen.

Ex vivo Modelle können die mechanischen Eigenschaften simulieren. Von extern bieten sich weitere Möglichkeiten zur Wiederherstellung der Stimmlippenkontur an:
Autologer Knorpel und Fremdmaterial wie Metalllegierungen oder Polymerisate. Wegbereiter war die HNO- Abteilung des Krankenhauses der Barmherzigen Brüder in Wien, die erstmals Hydroxylapatit implantierten. Physiologisch kommt dieses biokompatible Material im Knochen und im Zahnschmelz vor und hat den Vorteil, in der Röntgendiagnostik keine Artefakte zu bilden. Gerade bei Tumorpatienten mit Rezidivgefahr ist dies ein entscheidender Faktor. Negative Aspekte dieser Materialien bestehen in der potentiellen Allergisierungstendenz sowie Migrationsgefahr.

2.3 Eigenschaften von Fibringel

Angesichts der Nachteile der auf dem Markt befindlichen Augmentationsmaterialien, wächst das Interesse an einem Material, das optimierte biomechanische Eigenschaften mit Langzeitstabilität und Verträglichkeit kombiniert. Fibringel stellt eine Modifikation von

Fibrinkleber dar, der seit über 20 Jahren medizinisch genutzt wird (vgl. EYRICH 2006, S.13). Laut EYRICH (2006, S. 52) kann man annehmen, dass Fibringel in vitro wenigstens zwölf Monate stabil ist. Von EYRICH et al. wurde das Fibringel wie folgt modifiziert:
5 Units (U) **Thrombin** mit der gleichen Menge an 10 % **Fibrinogen** mischen. Nach 45 Sekunden geliert es aus und ist bereits nach zehn Minuten schnittfest. Nach weiteren 40 Minuten ist das Gel komplett polymerisiert (vgl. EYRICH 2006, S. 69).

Da Fibringel in vitro exzellente Ergebnisse geliefert hat, bietet sich der Schritt an, im Kehlkopfmodell weitere Erfahrungen zu sammeln, um die klinische Praktikabilität zu erforschen. Durch das spezielle Mischkanülensystem werden die beiden Komponenten erst kurz vor der Injektion gemischt. Dies ermöglicht die einfache Applikation im flüssigen Zustand bevor das Gemisch am Zielort aushärtet. Aufgrund der Zeitspanne von 45 Sekunden kann die Strecke in der 10,4 cm langen Kanüle zwischen Mund und Stimmlippe problemlos überwunden werden.

Abb. 5: Fibringel-Mischkanüle (Quelle: ARNOLD, U. Privatbild)

Den ARNOLD´schen Paradigmen folgend, ist neben der einfachen Applizierbarkeit und der Langzeitstabilität besonders die biologische Verträglichkeit von Relevanz (vgl. ARNOLD 1963, S. 179ff.). Auch in dieser Hinsicht zeigt Fibringel klinisch akzeptable Ergebnisse. Da

die einzelnen Bestandteile in der intrinsischen Blutgerinnungskaskade vorkommen, sollten sie im menschlichen Organismus keine allergischen Reaktionen hervorrufen (vgl. EYRICH 2006, S. 14), insbesondere wenn sie vor der Augmentation aus dem Empfängerblut isoliert wurden. Die folgende Abbildung zeigt, dass Thrombin im letzten Schritt der Blutgerinnung Fibrinogen in Fibrin umwandelt (vgl. LÖFFLER et al. 1998, S. 923).

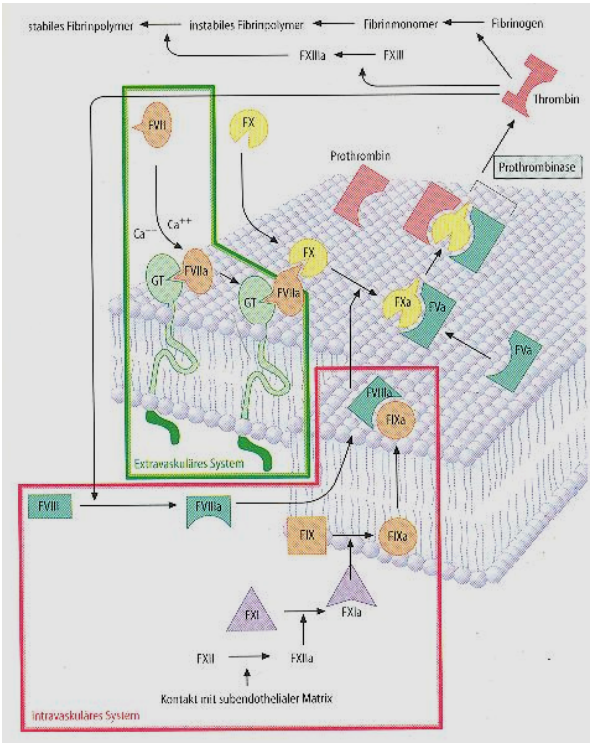


Abb. 6: Fibrin in der menschlichen Blutgerinnung (Quelle: LÖFFLER et al. 1998, S. 923)

Diese Schritte laufen physiologisch ständig im Körper ab und befinden sich durch die Fibrinolyse im Gleichgewicht. Plasmin lysiert das Fibringerinnsel wieder und beugt der Thrombenbildung vor.

Um ein Augmentationsmaterial zu kreieren, das auf lange Sicht hin mechanisch stabil ist, gibt es die Möglichkeit, Fibringel als Matrix für andere Zellen zu nutzen. Die Überlegungen von EYRICH (2006, 15ff.) führten dazu, **Chondrozyten** (5 Mio. in 200 µl Fibringel) als „Füllkörper“ zu verwenden. Diese Zellpopulation zeichnet sich dadurch aus, dass sie physiologisch im Kehlkopf vorkommt und zudem ein inertes Verhalten zeigt. Das bedeutet,

dass sie nicht proliferativ oder kanzerogen ist. Ein ungehemmtes Wachstum wäre katastrophal, da der Kehlkopf die engste Stelle der Atemwege ist. Knorpel gilt entsprechend der Ausführungen von BÜCHELER et al. (2003, S. 549) als Goldstandard in der rekonstruktiven Chirurgie. Da er normalerweise avaskuläres Gewebe ist, besitzt er ein niedriges Regenerationspotential. Im Fibringel behalten die Chondrozyten ihre runde Form, sie dedifferenzieren nicht und produzieren extrazelluläre Matrix (vgl. HOMMINGA et al. 1993, S. 441ff., FORTIER et al. 1998, S. 514ff.). In der Studie von EYRICH (2006, S. 52) wurde nachgewiesen, dass Fibringel als dreidimensionales Gerüst für die Kultivierung von Chondrozyten geeignet ist. Der Vorteil besteht darin, dass die Zellen im Fibringel suspendiert werden können. Das Gemisch wird anschließend in den Defekt injiziert. Dieses Procedere ist minimal invasiv und wenig belastend für den Patienten (vgl. EYRICH 2006, S. 16).

Ziel des modernen Tissue Engineerings ist, wie FORD (2008, S. 1712) eingehend darlegte, eine interdisziplinäre Zusammenarbeit, die im Idealfall, verglichen mit einer rein passiven Implantation, zu einer **Geweberegeneration** führt. Eine Stimmlippenaugmentation mit Fibringel und Zellen würde im Sinne der „zellulären Therapie“ eine Regeneration statt einer Reparatur zur Folge haben.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Präparation des Kehlkopfmodells

Schweinekehlköpfe wurden so präpariert, dass die extralaryngale Muskulatur entfernt wurde und die Trachea übrig blieb. Anschließend wurden sie gesäubert und vor der endgültigen Verarbeitung bei -20 °C gelagert. Kein Schwein wurde zum Zweck dieser Arbeit getötet. Zum Zeitpunkt des Schlachtens waren die Tiere 90 Tage alt. Entscheidend für die Klangqualität ist die **Art des Einfrierens**: Ideal ist, wenn dieses schnell erfolgt und die Kehlköpfe langsam wieder aufgetaut werden. Diese Vorgehensweise bewahrt die viskoelastischen Eigenschaften des Gewebes (vgl. CHAN et al. 2003, S. 384ff.).

Die Kehlköpfe wurden so präpariert, dass sie die vergleichenden Untersuchungen ermöglichten. Dabei wurde sowohl auf Übersichtlichkeit als auch auf Funktionalität geachtet. Dank der anatomischen Ähnlichkeit zum menschlichen Kehlkopf ist es möglich, Rückschlüsse auf die klinische Anwendung zu ziehen. Es liegt die Intention zu Grunde, alle labortechnischen Vorraussetzungen zu schaffen, um in einem zweiten Schritt die in vivo Verträglichkeitsstudien am Versuchstier sowie am menschlichen Probanden zu starten. Für das Modell wurde das supraglottische Gewebe entfernt, um eine bessere **Übersicht** zu gewährleisten. Von den beiden Stimmlippenpaaren wurden die oberen Stimmlippen anhand zweier Einzelknopfnähte lateral fixiert. Dafür eignen sich **monofile, nicht resorbierbare Resolon® Nähte** (Resorba® Nürnberg). Abbildung 7 zeigt exemplarisch einen vorbereiteten Kehlkopf.

Abb. 7: Stimmlippenfixierung mit Resolon® -Fäden (Quelle: ARNOLD, U. Privatbild)

Die ursprünglichen Bestrebungen, die **oberen Stimmlippen** zu entfernen, wurden verworfen, weil durch die zwangsläufige Verletzung des Epithels keine saubere Unterscheidung zwischen unteren und oberen Stimmlippen vorgenommen werden konnte, ein intaktes Epithel jedoch die Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche in vitro Augmentation ist. Die Länge der Luftröhre, Trachea, hat ebenfalls Auswirkungen auf den Klang. Entscheidend ist, dass die Strömungsverhältnisse an den Stimmlippen **linear** sind.

Abb. 8: Testreihe mit Kehlköpfen, sortiert nach Trachealänge von 3-8 cm aufsteigend
(Quelle: ARNOLD, U. Privatbild)

In zahlreichen Vorversuchen erwies sich eine Länge der Trachea von **acht bis zehn Zentimeter** als optimal, um das Risiko von Resonanzen zu reduzieren. Diese Trachealänge wurde auch in anderen Studien als geeignet betrachtet (vgl. ZHANG et al. 2006, S. 1558). Die Abbildung 8 zeigt eine Testreihe von Kehlköpfen mit einer Trachea von drei bis acht Zentimeter Länge.

3.2 Versuchsaufbau

Für einen dichten Abschluss wurde die Trachea auf einem stabilen Kunststoffadapter mit 0,8 cm Durchmesser mittels einer Schelle fixiert. Der Druck wurde auf 0,2-0,3 bar eingestellt. Die Stimmlippen wurden in der Stativklemme angenähert. Bei provozierten Glottisschluss wurden die Stimmlippen in einem 45° Winkel am besten zum Schwingen angeregt. Die Luft wurde in Anlehnung an ALIPOUR et al. (1997, S. 187) **erwärmt und befeuchtet**. Statt einer Conchathermeinheit wurde ein selbstgebauter Luftbefeuchter dazwischen geschaltet. Dieser besteht aus einem mit Wasser gefüllten Glas, das auf einer Heizplatte auf 75 °C erwärmt wird. So wird ein Aerosol erzeugt, das in das System eingeschleust werden kann. Die Abbildung zeigt den Luftbefeuchter, dessen zu- und abführender Schlauch nicht in das Wasser reichen darf, damit der Widerstand im Gesamtsystem nicht zu hoch ist.

Abb. 9: Luftbefeuchter mit Stativklemme (Quelle: ARNOLD, U. Privatbild)

Folgender Versuchsaufbau wurde entwickelt: Mithilfe eines Manometers wird die zuführende Luft reguliert und über den Luftbefeuchter geleitet. Dieser ist mittels eines Adapters direkt an die Trachea angeschlossen und in einem Stativ in der Höhe von 23 cm fixiert, so dass die Trachea senkrecht hängen kann. Strömungsgünstig ist ein 45° Winkel der Stimmlippen in 6,5 cm Abstand zum Endoskop der Hochgeschwindigkeitsglottographie-Kamera. Dieses ist in ein zweites Stativ eingebaut, um die nötige Standruhe für qualitativ hochwertige Bilder zu liefern. **Extern ausgelöst** können störende Eingriffe in den Versuchsaufbau vermieden werden. Der Kameraabstand sollte so groß wie möglich gewählt werden. Die Aufnahmen dürfen nicht zu lang dauern, weil die **Hitze** der Kamerabeleuchtung das Gewebe austrocknet. Bei einem Kamera-Objektabstand von 6,5 cm lässt sich außerdem das Beschlagen des Kameraobjektivs in Grenzen halten. Das folgende Schema skizziert den Versuchsaufbau.

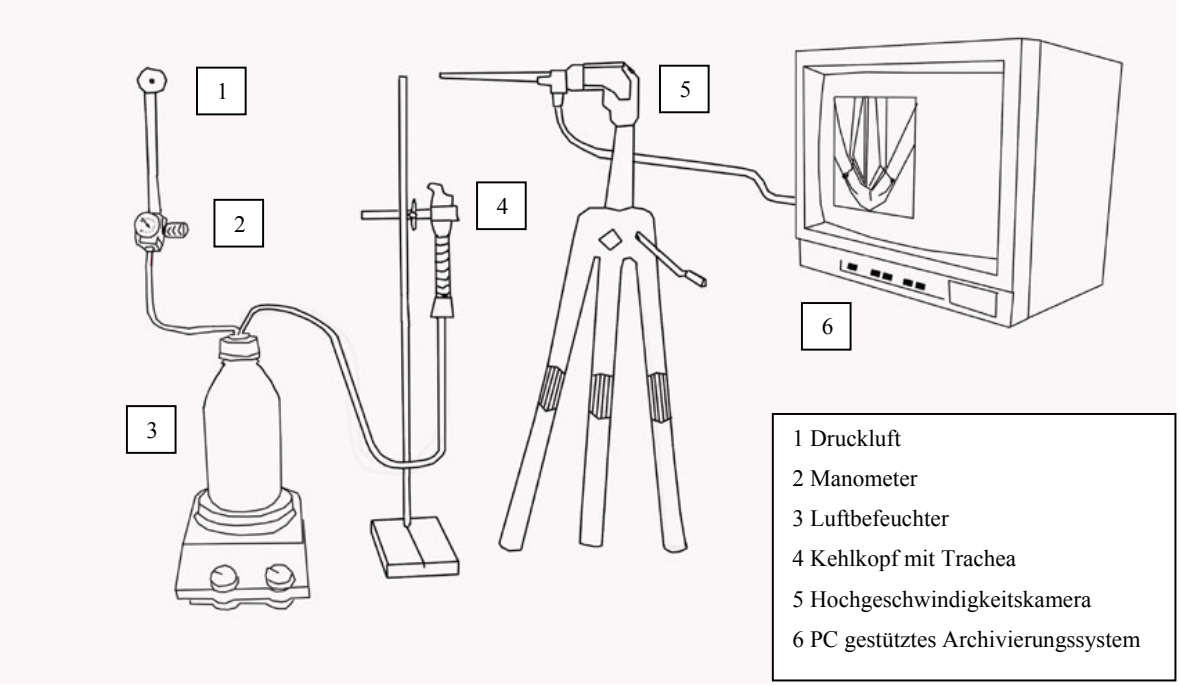


Abb. 10: Schema zum Versuchsaufbau (Quelle: ARNOLD, U. Privatbild)

3.3 Hochgeschwindigkeitsglottographische Aufnahmen

Stimmlippenschwingungen sind so hochfrequent, dass sie klassischerweise mit Hilfe eines Stroboskops beobachtetet werden können (vgl. BÖHME 2003, S. 170). BERGHAUS et al. (1996, S. 651) sprechen hierbei von einer **visuellen Täuschung**, die diese Vorgänge sichtbar macht. Mit der Entwicklung computergestützter Hochgeschwindigkeitskameras wurde es möglich, die tatsächlichen Stimmlippenbewegungen zu untersuchen und zu beurteilen. Für eine Aufnahme von 4000 Bildern ist bei einem Hochgeschwindigkeitsglottographen eine Aufnahmezeit von nur einer Sekunde nötig, so dass zum Einen der gesamte Schwingungsumfang der menschlichen Stimme reproduziert werden kann, zum Anderen die Belichtungszeit minimiert wird. Zwischen den einzelnen Aufnahmesequenzen wurden die Kehlköpfe mit einem feuchten Tuch **rehydriert**, was nach JIANG et al. (1999, S. 51) möglich ist. Ideal zur Augmentation eignen sich große Schwingungsamplituden, die mit einem tiefen Ton einhergehen.

Abb. 11: Bedienung der Hochgeschwindigkeitskamera (Quelle: ARNOLD, U. Privatbild)

Zuerst wurden alle Versuchskehlköpfe in den Versuchsaufbau eingespannt und im nicht augmentierten Zustand glottographisch aufgenommen. Die Abbildung 11 zeigt die Vorbereitung der Augmentation. Das Stativ mit dem Kehlkopf fand auf einem Behandlungsstuhl Platz und die glottographische Kamera wurde an einem weiteren Stativ befestigt. Zur Augmentation wurde unter dem Operations-Mikroskop ein Volumen von 0,1 ml sowohl in die rechte als auch in die linke Stimmlippe injiziert. Die Injektion erfolgte lateral des M. vocalis mit der Absicht, die Randkanten intakt zu lassen und den REINKE´schen Raum nicht zu füllen. Dies beugt gemäß der Ausführungen von HACKI et al. (1999, S. 509) einer Versteifung der Stimmlippen vor.

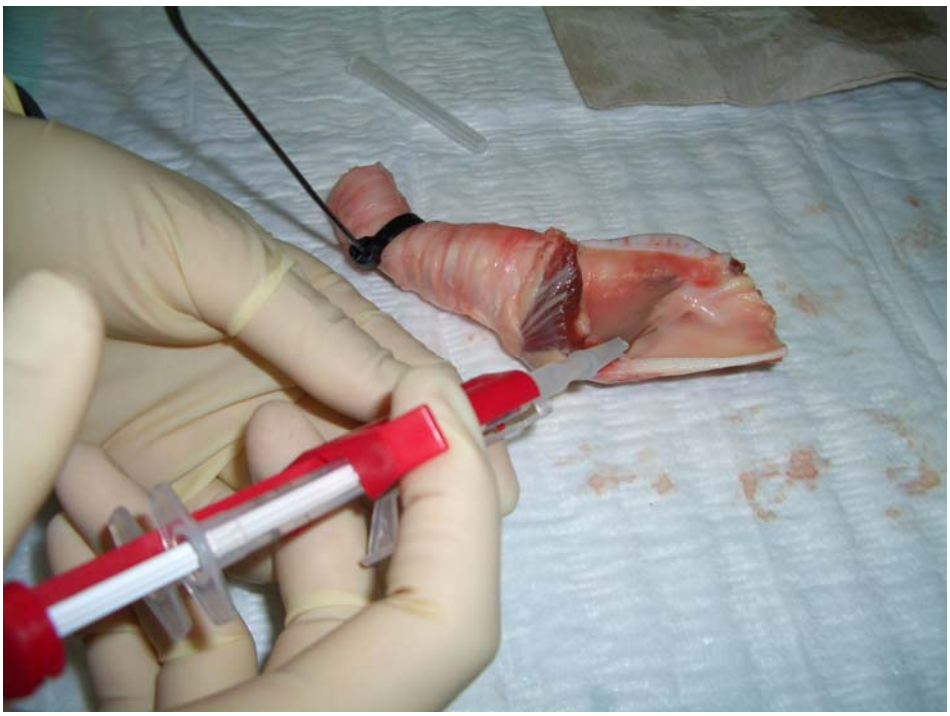


Abb. 12: Augmentation an einem halbierten Kehlkopf (Quelle: ARNOLD, U. Privatbild)

Die Abbildung 12 zeigt exemplarisch die Fibringel-Augmentation an einem halbierten Kehlkopf. Das Fibringel wird dabei erst unmittelbar vor der Injektion in einer Duploject® (Baxter, Unterschleißheim) Mischkanüle gemischt: In der einen Spritze befindet sich bovines **Fibrinogen** (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) in der anderen humanes **Thrombin** (Bestandteil

von Tissucol®, Baxter Unterschleißheim). Durch ein gemeinsames Endstück mit Mischspirale werden die beiden Bestandteile homogen vermischt und können im flüssigen Zustand eingespritzt werden.

Als Materialien wurden sowohl **Kollagen** (Zyplast® Collagen Implant, Inamed Corporation, Santa Barbara CA USA), **Hyaluronsäure** (Hydra Fill Softline®**,** Pharm Allergan GmbH) sowie **Fibringel (mit und ohne Chondrozyten)** verwendet. Jeweils 0,1 ml Material wurden in die beiden Stimmlippen augmentiert. Nach 20 min wurden die Stimmlippen mit Hilfe des durch die Trachea zugeführten Luftstromes von 0,2-0,3 bar zum Schwingen angeregt und die Stimmlippenbewegungen mittels Hochgeschwindigkeitsvideolaryngoskopie (Hres Endocam 5562, Wolf) digital aufgezeichnet.

Die humanen Chondrozyten stammen aus dem Nasenseptum, Ohr- und Rippenknorpel. Der Knorpel wurde in kleine Stücke geschnitten und dreimal mit Phosphatpuffer (PBS) (Gibco®, Karlsruhe) gewaschen. Dieser enthielt 50 U/ml Penicillin und 50 U/ml Streptomycin. Der enzymatische Verdau erfolgte über Nacht in einem kompletten Chondrozyten-Medium (Dulbecco´s modifiziertes Eagle´s Medium DMEM), das 4.5 g/l Glucose, 584 mg/l Glutamin, 10 % fötales, bovines Serum, 50 U/mg Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin, 0,1 mM nicht-essentielle Aminosäuren, 0,4 mM Prolin, 50 µg/ml Ascorbinsäure und 470 U/ml Typ II Kollagenase. Der Verdau wurde durch einen Filter mit 149 µm Porengröße gefiltert und dreimal mit PBS gewaschen. Die Zellzahl wurde mit einer NEUBAUER Zählkammer in einem umgekehrten Phasenkontrast Mikroskop bestimmt. 5 Mio. Zellen wurden in 200 µl Fibringel eingesetzt.

3.4. Histologische Untersuchungen

Zur Kontrolle des Augmentationsergebnisses wurden zusätzlich histologische Schnitte augmentierter Stimmlippen angefertigt. Dafür wurden acht weitere Kehlköpfe präpariert und jeweils eine Stimmlippe mit Kollagen, Hyaluronsäure und Fibringel (mit und ohne Zellen) augmentiert. Als Vergleich diente die nicht augmentierte Stimmlippe der Gegenseite. Es wurde zuerst eine Stimmlippe augmentiert. Dann wurde die Muskulatur an der Hinterseite des

Kehlkopfs durchtrennt. Der Kehlkopf wurde halbiert und anschließend die obere und untere Stimmlippe entfernt (Abb. 13: Vorbereitung für die histologischen Schnitte).

Abb. 13: Vorbereitung für die histologischen Schnitte (Quelle: ARNOLD, U. Privatbild)

Bei Kollagen und Hyaluronsäure wurden die Präparate in 4 % Paraformaldehyd (PFA) maximal 24 Stunden bei 4 °C fixiert. Zum Entwässern durchliefen die Präparate eine ansteigende Alkoholreihe mit 50 %, 70 % und 96 % Ethanol und wurden mit Isopropanol entfettet. Anschließend wurden die Histo-Blöcke in **Paraffin** eingebettet, mit dem Mikrotom (Mikrom® HM 500 OM, Heidelberg) auf 8 µm geschnitten und mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt. Dafür wird zuerst Hämatoxylin verwendet, danach erscheinen die basophilen Strukturen rötlich-braun. Zum Erhöhen des pH-Wertes wird mit Leitungswasser gespült und der Farbton schlägt in das typische Blauviolett um. Anschließend folgt die Zytoplasmafärbung in einer wässrigen Eosin-Lösung. Durch weitere Spülschritte über Alkohollösungen aufsteigender Konzentration bis zu 100 % Alkohol wird das Wasser aus dem Gewebeschnitt verdrängt. Schließlich wird der entwässerte Schnitt in Xylol (organisches Lösungsmittel) geklärt und mit einem Glas bedeckt, dabei wurde Entellan® (Merck, Darmstadt) als Eindeckmittel verwendet. Die Schnitte wurden mikroskopiert (Nikon Eclipse TE 2000-U) und digital photographiert (NIS-Elements AR 3.0 und Nikon DS-5Mc Kamera).

Da durch die beschriebene Vorgehensweise Fibringel nicht sichtbar gemacht werden konnte, wurde das Fibringel vor der Augmentation mit Tusche schwarz gefärbt (10 µl Tusche auf 1 ml Fibringel) und sofort nach der Entnahme **Kryo-Schnitte** angefertigt. Dabei wurde folgendermaßen vorgegangen:
Die Gewebeproben wurden mit Tissue-Tek® (Sakura Finetek USA) eingebettet und in flüssigen Stickstoff langsam tief gefroren. Mit dem Mikrotom (Mikrom® HM 500 OM,

Heidelberg) wurden 10 µm dicke Schnitte gewonnen, die auf Gelatine beschichtete Glasträger (SuperFrost® Plus, Menzel GmbH, Braunschweig) gebettet wurden. Die mikroskopische Dokumentation erfolgte ebenfalls photographisch.

Um die Zellen sichtbar zu machen wurden sie mit 4`,6- Diamidino-2-phenylindol (DAPI) Nucleid Acid Stain markiert, welches an DNA der Chondrozyten bindet und bei Anregung mit ultravioletten Licht blaue Fluoreszenz zeigt. In Verbindung mit doppelsträngiger DNA liegt das Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 358 nm und das Emissionsspektrum bei 461 nm. DAPI Stock Lösung wurde zu 300 nM mit PBS verdünnt. 300 µl von dieser Lösung wurden zu den Zellen gegeben, wobei darauf geachtet wurde, dass die Zellen komplett bedeckt waren. Unter Lichtabschluss wurden die Zellen zehn Minuten lang inkubiert und dann wie gewohnt dem Fibringel zugesetzt und injiziert. Die augmentierten Stimmlippen wurden nach 45 Min präpariert und mit Tissue Teck® eingebettet. Die 16 µm dicken Kryo-Schnitte wurden ohne zusätzliches Licht angefertigt, auf Gelatine beschichtete Glasträger gebettet und im Floureszenzmikroskop aufgenommen.

Das Muskelgewebe wurde ebenfalls angefärbt und fluoresziert rot. Dafür wurden die Kryo-Schnitte mit Aceton für zehn Minuten fixiert und dann dreimal mit PBS waschen. Die Blockierung erfolgt mit einer Lösung aus 5 % Ziegenserum (Dako, Dänemark) und Protease-Inhibitor (Complete Mini®, Roche, Deutschland) in PBS (phosphate buffered saline). Daraufhin wird der Primärantikörper gegen alpha-smooth-muscle actin inkubiert; der Antikörper (Dako, Dänemark) wurde in der Maus in einer Verdünnung von 1:75 in Blockierungspuffer für eine Stunde bei 37 °C in einer feuchten Kammer generiert. Nachdem dreimal mit PBS gewaschen wurde, wird der Sekundärantikörper in einer Verdünnung 1:400 in PBS für eine Stunde bei 37 °C in der feuchten Kammer inkubiert. Der Sekundärantikörper ist ein Fluorophor aus der Gruppe der Alexafarbstoffe: Anti-Maus-Alexa Fluor 568. Dieser wird dreimal in PBS gewaschen, anschließend werden die Schnitte in Fluoromount (Dako, Dänemark) eingedeckt.

3.5. Untersuchung zu den rheologischen Eigenschaften des Augmentationsmaterials

In verschiedenen Versuchen wurde das **Schwingungsverhalten** analysiert und die **Histologie** untersucht, zusätzlich sollte auch die **Rheologie** Beachtung finden. Darunter versteht man die Fließeigenschaften eines Materials. Die Viskoelastizität der Stimmlippen hat Einfluss auf die Stimmfunktion (vgl. JIANG et al. 1999, S. 55).

Die Augmentationsmaterialien wurden zwei Versuchen unterzogen, wobei die Versuchbedingungen immer gleich waren. Die 160 µl Probe wurden auf 37 °C zwei Minuten lang erwärmt und dann in einen Spalt von 500 µm auf den Untersuchungstisch gepresst. Abbildung 14 zeigt Herrn Dr. F. Brandl bei der Versuchsvorbereitung.

Abb. 14: Herr Dr. F. Brandl bereitet das Rheometer vor (Quelle: ARNOLD, U. Privatbild)

Das Rheometer (Advanced Rheometer AR 2000, TA Instruments, Alzenau) wurde auf folgende Versuche programmiert:
In der ersten Versuchsreihe wurde die **Frequenzabhängigkeit** der Viskoelastizität untersucht. In dem folgenden Experiment wurde getestet wie belastbar das Material bei zunehmendem **Stress** ist. Stress ist in diesem Fall als zunehmendes Drehmoment bei konstanter Frequenz definiert.

Kollagen und Hyaluronsäure wurden direkt verwendet. Das Fibringel wurde zusätzlich 45 min lang während des Geliervorgangs beobachtet. Anschließend wurde es den gleichen Tests unterzogen wie Hyaluronsäure und Kollagen. Um einer Dehydration vorzubeugen, wurden die Materialien mit einer runden Kapsel verschlossen, die mit destilliertem Wasser gefüllt war.

4 ERGEBNISSE DER STUDIE

Objektive Bewertungskriterien sind Grundvoraussetzung für das Verständnis von Stimmlippenschwingungen und Basis für den Vergleich möglicher Augmentationsverfahren. Im folgenden Kapitel erfolgt dies unter glottographischen, histologischen und rheologischen Gesichtspunkten.

4.1 Hochgeschwindigkeitsglottographische Auswertung

Die physiologische Stimmlippenschwingung ist gekennzeichnet durch regelmäßige, symmetrische Bewegungen von mittlerer Amplitude, vollständigem Schluss und freier Schleimhautverschiebung. In den tiefen Frequenzen schwingen die Stimmlippen in ihrer gesamten Länge und Breite und zeigen deutliche Randkantenverschiebungen. Mit zunehmender Tonhöhe nehmen die Amplituden sowie die Randkantenverschiebungen ab. Die Schwingungsbewegungen der Stimmlippen sind zusätzlich von der Lautstärke abhängig. Mit zunehmender Stimmintensität werden die Amplituden weiter und die Randkantenverschiebung prägt sich deutlicher aus (vgl. BÖHME 203, S. 171f.).

WOO (1996, S.1ff.) beurteilt die Grundlagen zur stroboskopischen Auswertung kritisch. Seinen Ausführungen nach beruht die aktuelle Literatur über Stroboskopie auf klinischer Erfahrung. Trotz dieser Untersuchungen fehlen normierte Daten zur Interpretation solcher Ergebnisse. Dies wirft folgende Fragestellungen auf:
Wie groß ist die physiologische Stimmlippenamplitude? Sollten männliche und weibliche Stimmlippenschwingungen bezüglich der Schlussphase und Amplitude ähnlich erscheinen? Wie lange dauert die Schlussphase?

Objektive Beurteilungskriterien sind ein erster wichtiger Schritt für das Verständnis pathologischer Stimmlippenschwingungen. In Anlehnung an BÖHME (2003, S. 171ff.) wurden die Aufnahmen unter folgenden Gesichtspunkten untersucht, die für die Phoniatrie relevant sind:

1. **Glottisschluss**

Normalerweise tritt der komplette Glottisschluss bei mäßigen Stimmlautstärken oder leichten Intensitätssteigerungen ein. Es bestehen unterschiedliche Varianten eines pathologischen, inkompletten Glottisschlusses im hochgeschwindigkeitsglottographischen Bild. Ein schmaler posteriorer Spalt im hochgeschwindigkeitsglottographischen Schwingungsablauf muss jedoch nicht unbedingt als pathologischer Befund gewertet werden.

2. **Amplitude**

Dieses Kriterium beinhaltet die medio-laterale Auslenkung der Stimmlippe. Beobachtet man die Amplituden beider Stimmlippen gleichzeitig, wird die Schwingungsweite der Stimmlippen und simultan die Öffnung der Glottis betrachtet.

3. **Symmetrie**

Physiologisch verlaufen alle Bewegungen der zwei Stimmlippen in einer 180° Symmetrie. Sind die Schwingungsphasen beider Stimmlippen gegeneinander verschoben, spricht man von einer Phasenverschiebung.

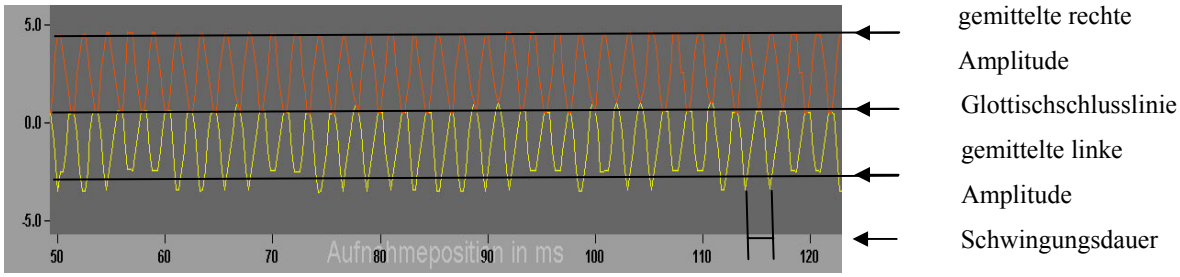
4. **Periodizität**

Eine Periodizität, d. h. eine zeitliche Regelmäßigkeit, besteht, wenn die Schwingungen der Stimmlippen in gleichen Zeitabständen erfolgen. Ist dies nicht der Fall, besteht eine Aperiodizität, eine Synchronisationsstörung.

Für den Versuch wurden 12 Kehlköpfe augmentiert, wobei jeweils drei Kehlköpfe mit dem gleichen Material augmentiert wurden. Untersucht wurde der jeweilige Kehlkopf vor und nach Augmentation beider Stimmlippen mit den verschiedenen Augmentationsmaterialien. Die Stimmlippenbewegungen in der entsprechenden Zeit wurden durch die Auswertungssoftware des Hochgeschwindigkeitsglottographen automatisch graphisch dargestellt. Dafür wird die Bewegung von jeweils einem Punkt auf der rechten Stimmlippe und gleichzeitig auf der linken Stimmlippe über die Zeit aufgezeichnet.

Abbildung 15 zeigt exemplarisch zwei Graphen von Schwein 4, anhand derer die Auswertung nachvollzogen werden kann. Untersucht wurde der Schweinekehlkopf Nummer 4 sowohl vor als auch nach Augmentation mit Hyaluronsäure. Für den **Glottisschluss** wurde beobachtet, ob sich die dargestellten Schwingungsamplituden treffen. Die Höhe der Ausschläge wurde für die Stimmlippen gemittelt und gibt Aufschluss über die **Amplitude**. Anschließend wurden die beiden Amplituden der rechten und linken Stimmlippe verglichen und die **Symmetrie** untersucht. Als letzter Punkt wurde die Regelmäßigkeit der Schwingungen ermittelt (**Periodizität**).

Schwein 4 vor Augmentation



Schwein 4 augmentiert mit Hyaluronsäure

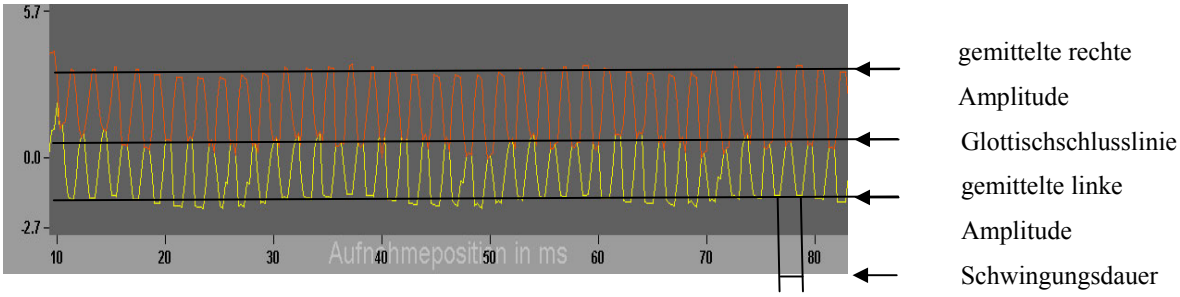


Abb. 15: Glottographische Aufnahmen vor und nach der Augmentation mit Hyaluronsäure von Schwein 4 (Quelle: ARNOLD, U. Auswertungssoftware)

Zu 1: Betrachtet man die Graphen vor und nach der Augmentation fällt auf, dass hinsichtlich des **Glottisschlusses** alle untersuchten Kehlköpfe (n=12) einen vollständigen Glottisschluss sowohl vor als auch nach der Augmentation aufweisen. Dies ist zu erwarten, da keine Parese vorhanden ist. Somit liegt kein signifikanter Unterschied vor.

Zu 2: In Bezug auf die **Amplitude** zeigen Abbildung 16a und 16b:
Auf der x-Achse finden sich die einzelnen Augmentationsmaterialien wieder und die y-Achse ist in Millimeter skaliert. Aufgetragen ist der jeweilige Durchschnittswert für die Stimmlippenamplitude vor und nach der Augmentation mit dem jeweiligen Material. Dies zeigt deutlich, dass alle Augmentationsmaterialien die Stimmlippenschwingungen verändern, diese aber nicht verhindern.

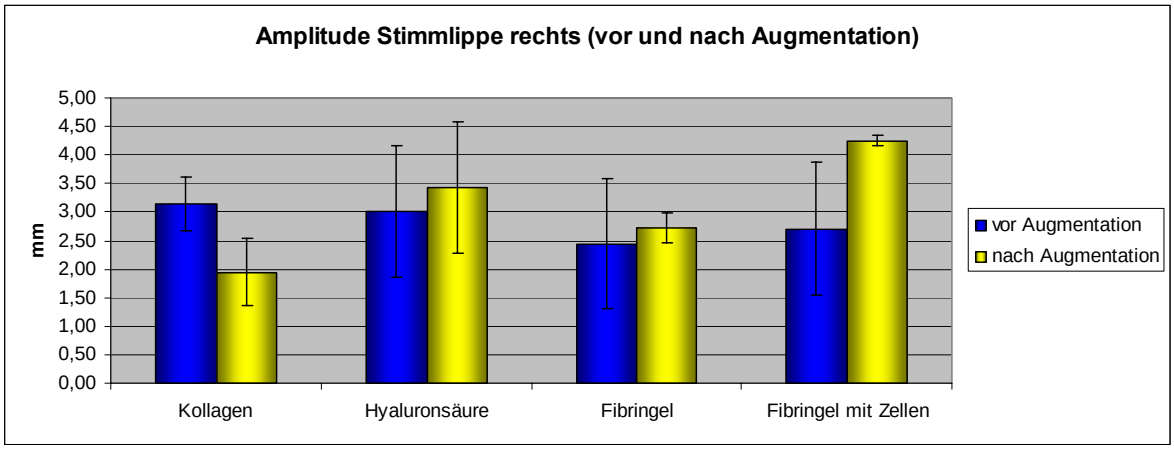


Abb. 16a: Amplitude Stimmlippe rechts (vor und nach Augmentation)
(Quelle: ARNOLD, U. Auswertungssoftware)

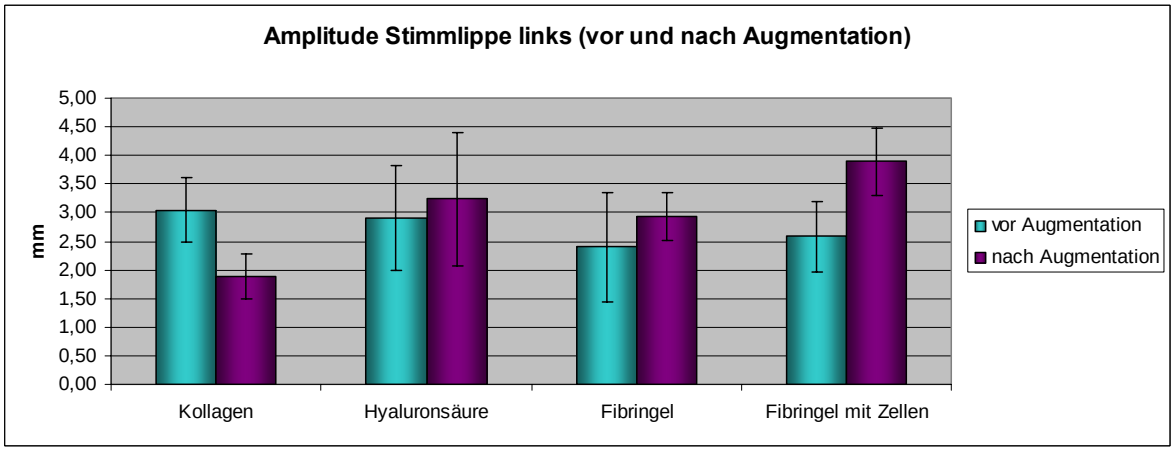


Abb. 16b: Amplitude Stimmlippe links (vor und nach Augmentation)
(Quelle: ARNOLD, U. Auswertungssoftware)

Zu 3: Die Analyse der **Symmetrie** ergab:

Für die Symmetrie wurden die gemittelten Stimmlippenamplituden vor und nach der Augmentation miteinander verglichen. Die Differenzen der Werte wurden in Abbildung 17 graphisch dargestellt. Diese zeigt, wie ähnlich die rechte und die linke Stimmlippe schwingen. Liegt der Wert exakt bei Null, sind die Stimmlippenamplituden identisch und damit symmetrisch. Vergleicht man die rechte mit der linken Stimmlippenschwingung vor und nach der Augmentation, fällt auf, dass die Stimmlippen nach der Augmentation mit Kollagen symmetrischer schwingen als zuvor. Das heißt, bestehende Differenzen konnten durch das Augmentieren ausgeglichen werden.

Bei den anderen drei Materialien wurden die Stimmlippenschwingungen minimal asymmetrisch. Möglicherweise wurden die Augmentationsmaterialien nicht an exakt korrespondierende Stellen appliziert, was zu einer asymmetrischen Bewegung führen kann.

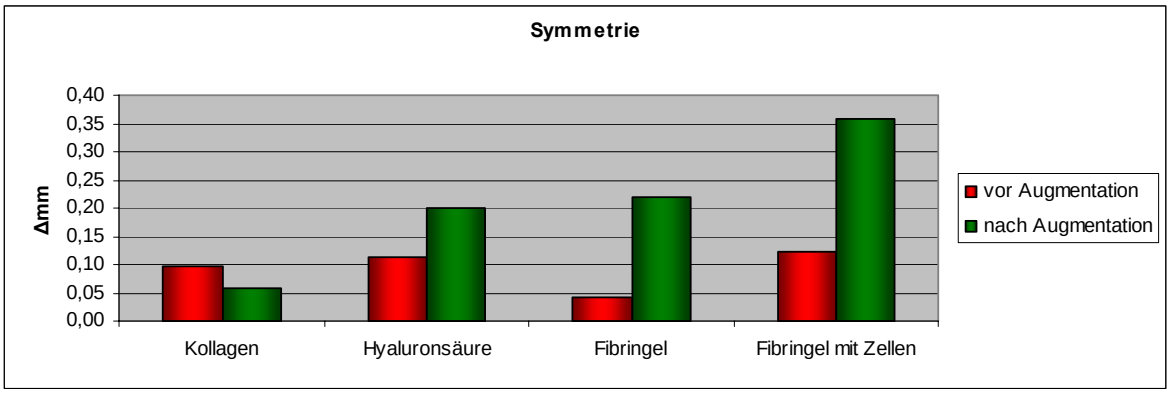


Abb. 17: Gemessener Unterschied beider Stimmlippenamplituden (vor und nach Augmentation)
(Quelle: ARNOLD, U. Auswertungssoftware)

Zu 4: Das Kriterium der **Periodizität**

Stimmlippenschwingungen erfolgen physiologisch mit gleichen Zeitabständen, sonst liegt eine zeitliche Irregularität vor. Mittelt man die Werte der Stimmlippenschwingungsdauern vor dem Augmentieren und vergleicht sie mit den Ergebnissen nach der Augmentation, stellt sich heraus, dass nach dem Augmentieren die Stimmlippendauer für jedes Material verlängert ist und sich damit ein minimal tieferer Ton ergibt (vgl. Abbildung 18). Dies könnte an der

zunehmenden Masse liegen bzw. der veränderten Stimmlippenviskosität. Insgesamt sind die Frequenzen gleichmäßig verlängert, so dass keine Aperiodizität vorliegt.

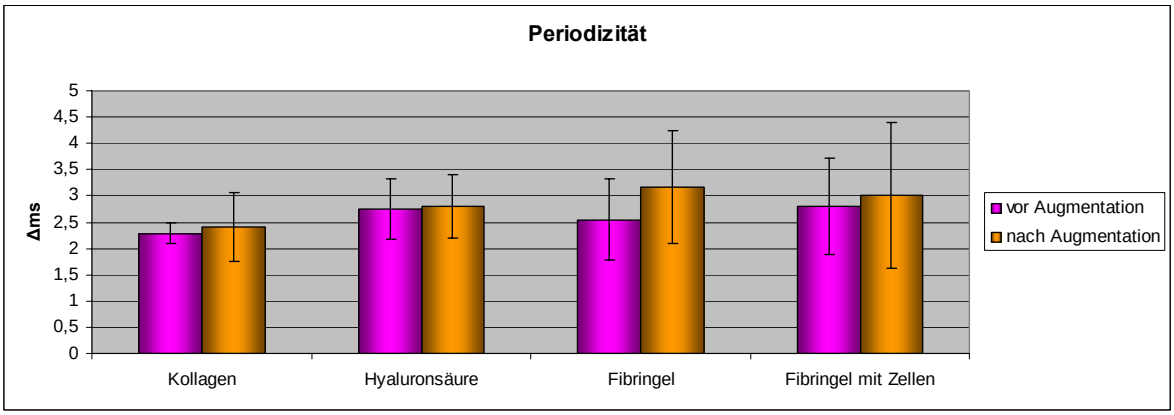


Abb. 18: Schwingungsdauer in ms (vor/nach der Augmentation) (Quelle: ARNOLD, U. Auswertungssoftware)

Zusammenfassend lassen sich die glottographischen Ergebnisse wie folgt interpretieren:
Fibringel mit und ohne Zellen zeigt keine signifikanten Unterschiede zu den herkömmlichen Materialien Kollagen und Hyaluronsäure und ist damit aus glottographischen Gesichtspunkten zur Augmentation geeignet. Ob mit Fibringel eine tatsächliche Stimmverbesserung erreicht werden kann, muss in Zukunft untersucht werden. Aufgrund der durchgeführten Versuche kann jedoch eine grundsätzliche Eignung zur Stimmlippenaugmentation erwartet werden.

Zusätzlich wurden die unterschiedlichen Stoffe unter Berücksichtigung anderer Kriterien genauer untersucht, diese schließen sowohl die Histologie als auch das rheologische Verhalten ein.

4.2 Histologische Ergebnisse

Die folgende Darstellung lehnt sich an KÜHNEL (1995, S. 324) an:
Betrachtet man einen Frontalschnitt durch einen physiologischen Kehlkopf, fällt auf, dass die Schleimhaut der luftleitenden Organe ein mehrreihiges, hochprismatisches Flimmerepithel mit schleimbildenden Becherzellen trägt. Ausnahmen stellen die Stimmfalten des Kehlkopfes dar.

Dieser 4-5 mm breite Streifen wird auch als Stimmlippe, **Labium vocale**, bezeichnet und ermöglicht den suffizienten Glottisschluss. Das Schleimhautbindegewebe im Kehlkopfeingang und im Vestibulum laryngis ist locker gebaut, an den Stimmfalten dagegen fest verwachsen.

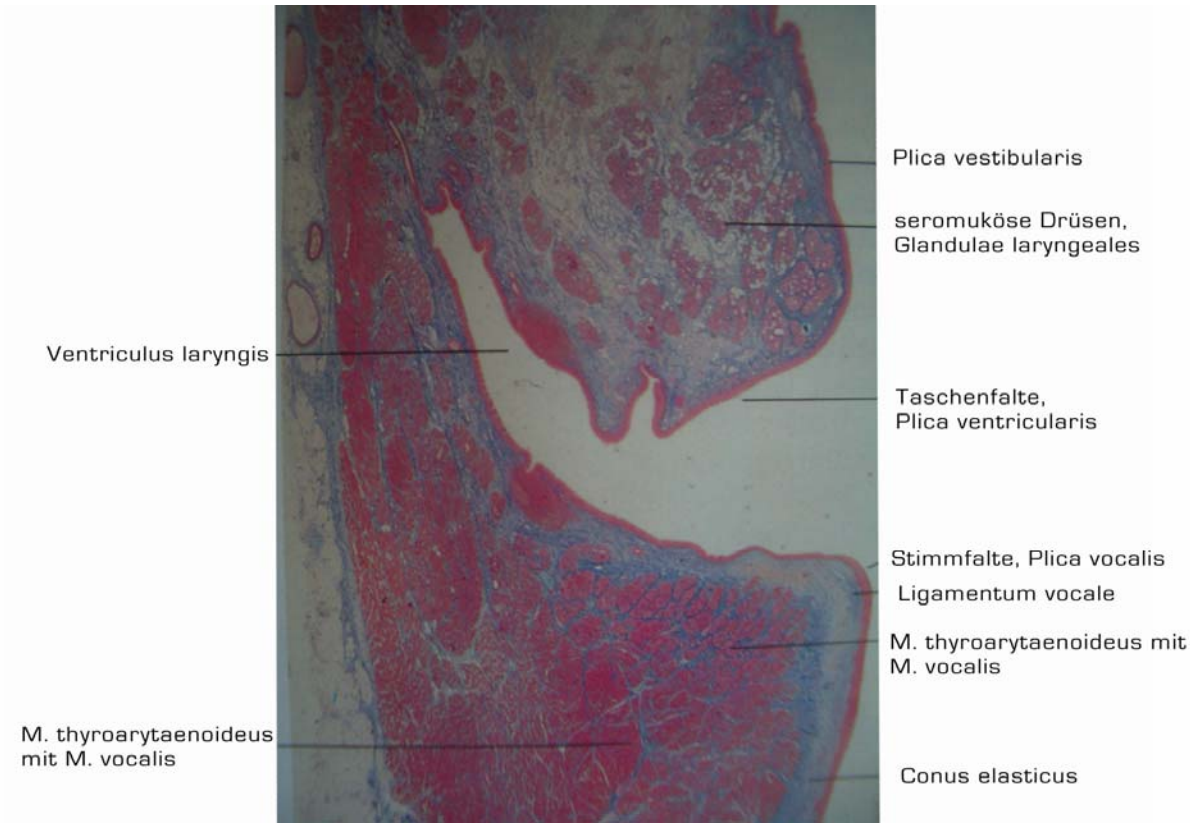


Abb.19 : Frontalschnitt durch einen Kehlkopf, Färbung: Azan; Vergr. 8fach, Quelle: KÜHNEL (1995, S. 324)

Die Abbildung zeigt einen kindlichen Kehlkopf im Frontalschnitt. Dargestellt ist die Taschenfalte, **Plica ventricularis**, und Stimmlippe, **Plica vocalis**, mit respiratorischen Epithel, das darunter liegende Stimmband, **Ligamentum vocale**, umgeben von seromukösen tubuloalveolären Drüsen, **Glandulae laryngeales**, und Muskulatur (**M. thyroarytenoideus, M. vocalis**) (vgl. KÜHNEL 1995, S. 324).

Wird die Stimmlippe augmentiert, soll auf eine Applikation in den **lateralen** Bereich des M. vocalis oder **zwischen** M. vocalis und M. thyroarytenoideus geachtet werden (vgl. HACKI et al. 1999, S. 509). Dieses Procedere ist für die Funktion der Stimmlippen vom klinischen Standpunkt aus optimal.

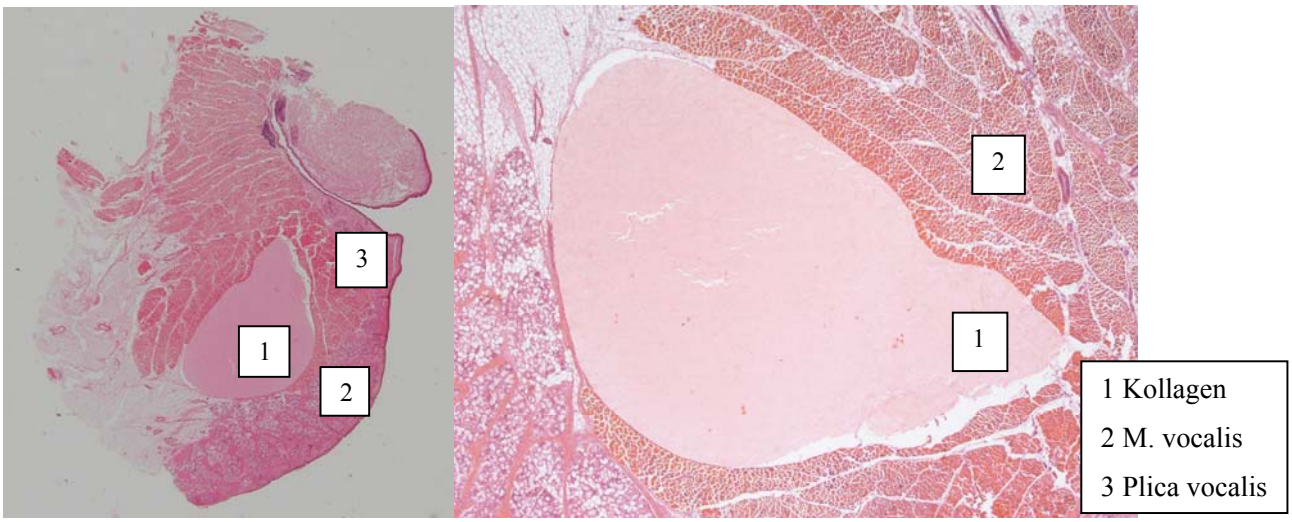


Abb. 20: Injiziertes Kollagen, Färbung: Hämatoxylin-Eosin (HE), Vergr. 1fach und 2fach
(Quelle: ARNOLD, U. Privatbild)

0,1 ml Kollagen wurden in eine Stimmlippe injiziert und anschließend histologische Schnitte angefertigt (Abb. 20). Man erkennt einen klar definierten mit Kollagen gefüllten Raum, der sich an der zur Stimmlippenaugmentation geeigneten Position befindet.

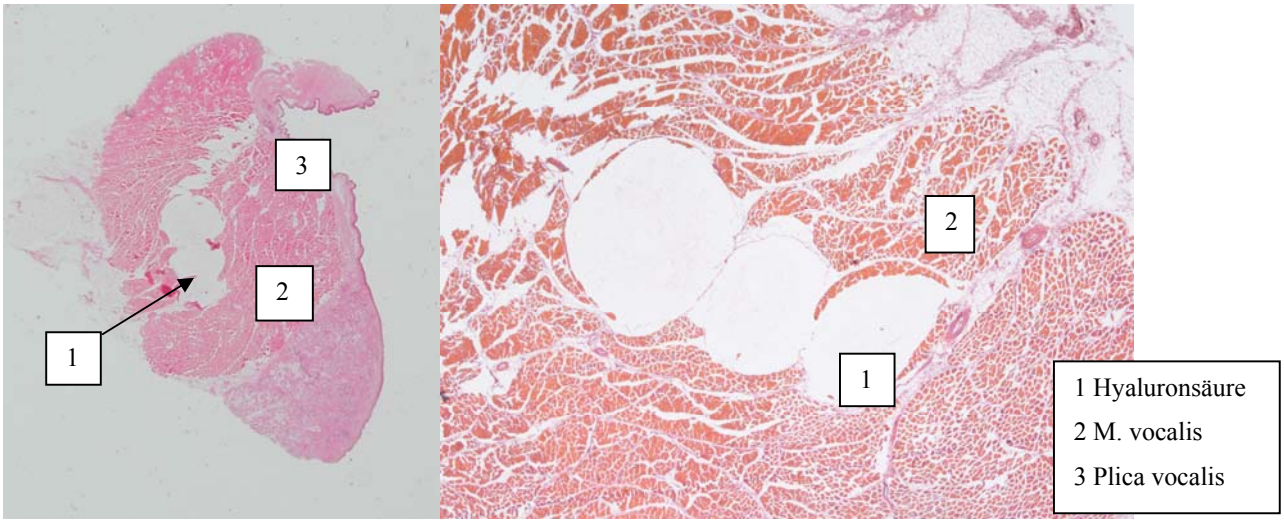


Abb. 21: Augmentierte Hyaluronsäure, Färbung: HE, Vergr.1fach und 2fach (Quelle: ARNOLD, U. Privatbild)

Auch die augmentierte Hyaluronsäure befindet sich an der passenden Stelle, die drei Vakuolen zeigen die dreimalige Injektion von insgesamt 0,1 ml Hyaluronsäure (Abb. 21). Das Augmentationsmaterial ist in Alkohol löslich und beim Entfetten herausgewaschen worden.

Mischt man die Komponenten Fibrinogen und Thrombin erhält man Fibringel, das während der ersten 45 Sec flüssig ist und dann innerhalb von 45 Min zu einem festen Gel ausgeliert. Da Fibringel zum Zeitpunkt des Einspritzens das Material mit der niedrigsten Viskosität ist, verteilt sich das frisch gemischte Gel großflächiger zwischen den Zellen. Auf den HE gefärbten Schnitten zeigte sich Fibringel nicht, weil es entweder wie Hyaluronsäure durch die Alkoholreihe herausgewaschen wurde oder sich zu filigran zwischen den zellulären Strukturen verteilt hat. Es wurde deswegen mit Tusche (10 µl Tusche auf 1 ml Fibringel) gefärbt.

Um nachzuweisen, dass die Zellen nicht aus der Injektionsstelle im Kehlkopf diffundieren, wurden Kryo-Schnitte mit Fibringel angefertigt, das sowohl mit Tusche gefärbt war und zusätzlich Chondrozyten enthielt, die mittels DAPI (4`,6- Diamidino-2-phenylindol) markiert wurden. Der Vergleich der Fotographie des Kyro-Schnittes mit der mikroskopischen Fluoreszenzaufnahme zeigt, dass der blau fluoreszierende Bereich dem mit der Tusche gefärbten Bezirk entspricht (Abb. 22). Das bedeutet, die Chondrozyten bleiben im Fibringel immanent und somit am erwünschten Ort, lateral des M. vocalis.

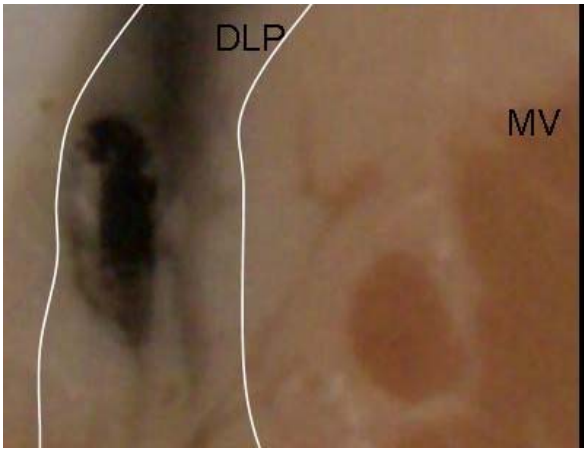


Abb. 22: Photographie Kryo-Schnitt
(Quelle: ARNOLD, U. Privatbild)

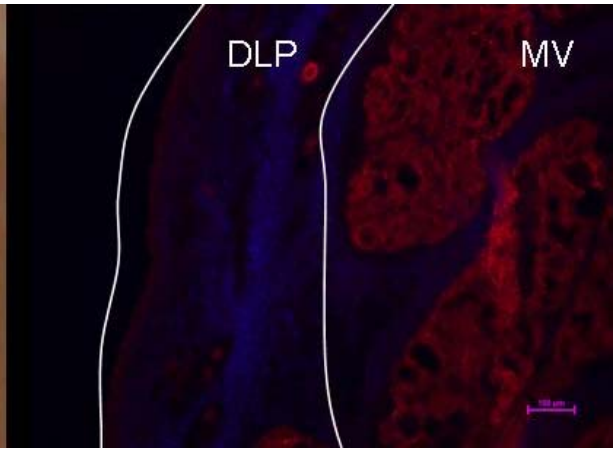


Abb. 23: Fibringel Färbung: DAPI, Vergr. 4fach
(Quelle: ARNOLD, U. Privatbild)

DLP=deep lamina propria (tiefe Lamina propria); MV= musculus vocalis

Übersichtsaufnahme des Kryo-Blocks in Abb. 22. Abb. 23 zeigt einen gefärbten Kryoschnitt. Die rote Floureszenzfarbe repräsentiert glattes Muskelgewebe, während die blaue Färbung von Chondrozyten stammt, die vor der Injektion mit dem Floureszenzfarbstoff DAPI gelabelt wurden. DAPI färbt spezifisch DNA an und erleichtert so die Lokalisierung injizierter Zellen.

4.3 Rheologisches Verhalten

Rheologische Tests sind für die Bewertung von Augmentationsmaterialien essentiell, da die Viskoelastizität der Stimmlippen Einfluss auf die Stimmqualität hat.

DAHLQVIST et al. (2004, S. 138) beschreiben einen Versuch, für den verschiedene Mittel sechs Monate in situ belassen werden und dann sowohl die Stimmlippe als auch das Augmentationsmaterial rheologisch geprüft werden. Sie kommen zu dem Schluss, dass Substanzen mit niedriger Viskoelastizität am besten geeignet sind. Diese Eigenschaft entspricht dem nicht injizierten Gewebe der natürlichen Stimmlippe.

Die rheologischen Experimente wurden mit einem AR 2000 Rheometer (TA Instruments, Alzenau) durchgeführt. Für die Fibringelpräparation wurden die beiden flüssigen Komponenten gemischt und dann auf die untere Platte des Rheometers gegeben. Die Messgeometrie umfasste 20 mm. Das Gemisch konnte im Versuchsspalt bei 37 °C innerhalb von 45 min ausgelieren.

Für die dynamischen Messungen wurde ein zunehmender oszillierender Stress der von 0,1 auf 10000 Pa erhöht wurde bei einer konstanten Frequenz von 1 Hz appliziert. Das **komplexe Schermodul G*** wurde aufgenommen. Dieses ist ein Maß für die Steifigkeit eines Körpers und fasst Speicher- und Verlustmodul eines Werkstoffes zusammen.

Für die Frequenzabhängigkeit wurde ein konstanter Stress von 1 Pa ausgeübt, dabei die Frequenz von 0,01-10 Hz gesteigert. Es wurde ebenfalls das komplexe Schermodul G* dokumentiert. Bei dem Fibringel mit und ohne Zellen wurde das komplexe Schermodul G* während der Zeit des Ausgelierens für 45 Min gemessen.

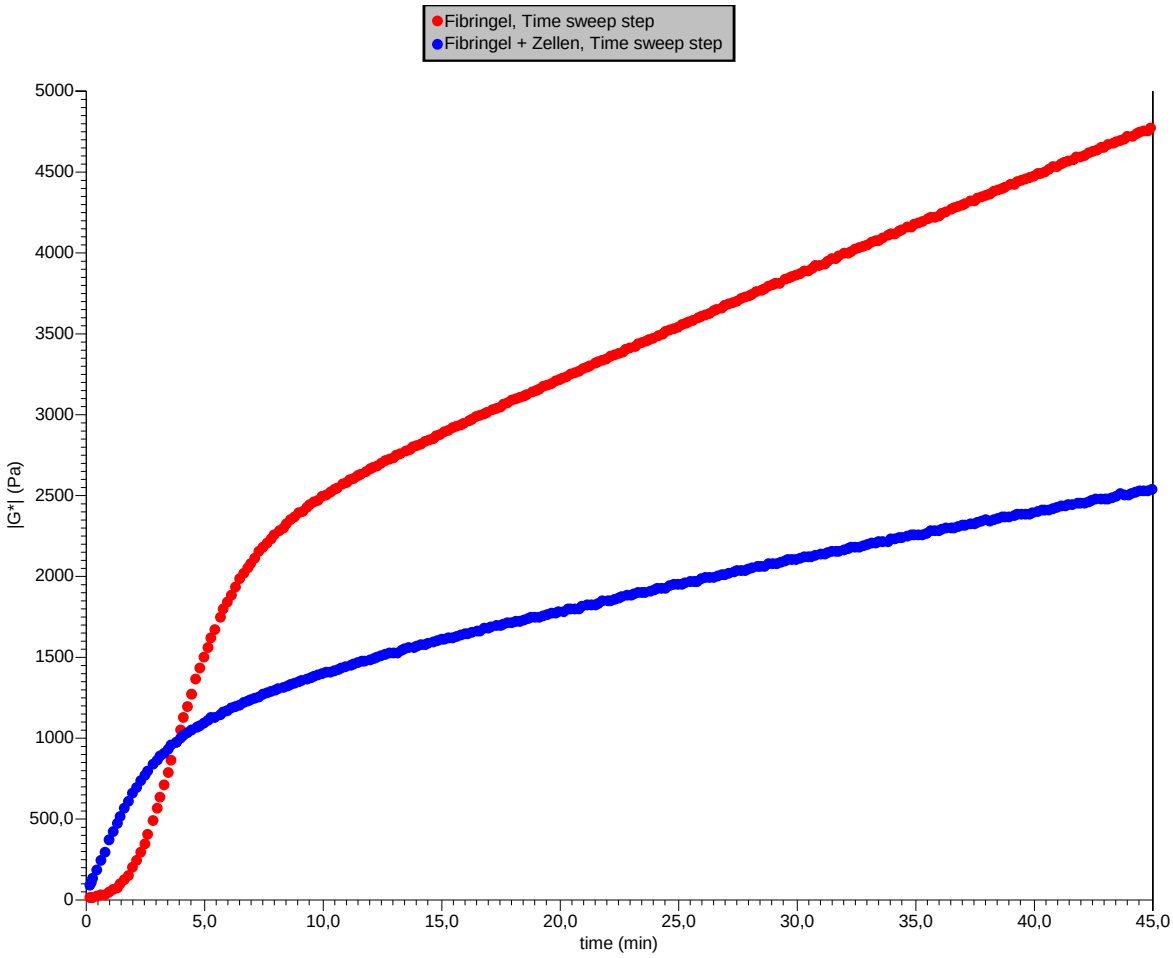


Abb. 24: Fibringel (mit/ohne Zellen) während des Ausgelierens (Quelle: ARNOLD, U. Auswertungssoftware)

Der Graph in Abb. 24 zeigt, dass Fibringel (mit/ohne Zellen) bereits beim Start der Aufnahmen fest war. Das Mischen bis zur Applikation auf die Plattform hat 60 Sec in Anspruch genommen. In dieser Zeitspanne hat bereits der Wechsel vom viskosen zum elastischen Zustand stattgefunden. In den ersten zehn Minuten wird das Fibringel schnell fest und die Festigkeit nimmt langsam zu.

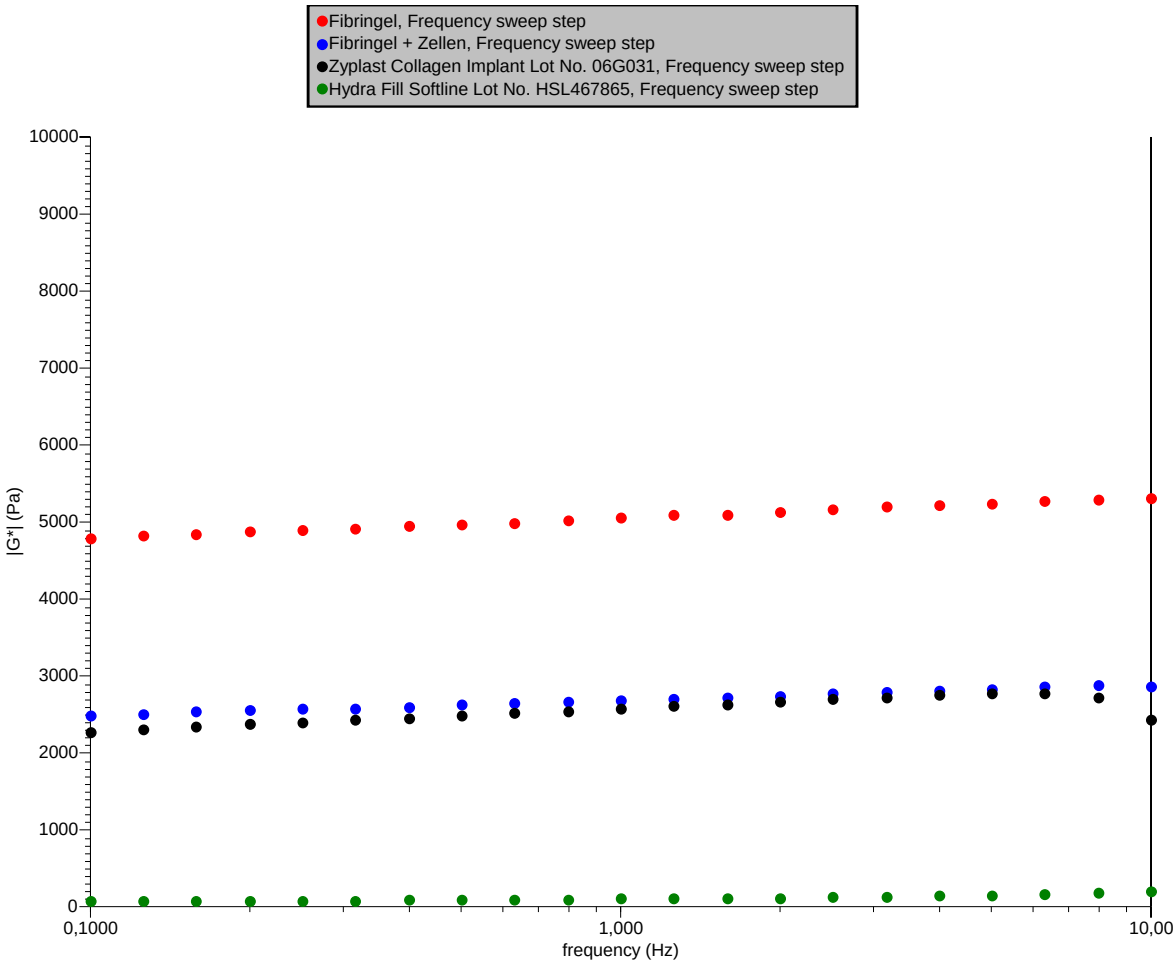


Abb. 25: Frequenzabhängiges komplexes Schermodul G* (Quelle: ARNOLD, U. Auswertungssoftware)

Werden die Materialien einer frequenzabhängigen Prüfung unterzogen, fällt auf, dass Hyaluronsäure (●) elastischer ist als die anderen Materialien. G* von Fibringel (mit/ohne Zellen) ist mit Kollagen (●) vergleichbar (Abb. 23: Frequenzabhängiges komplexes Schermodul G*).

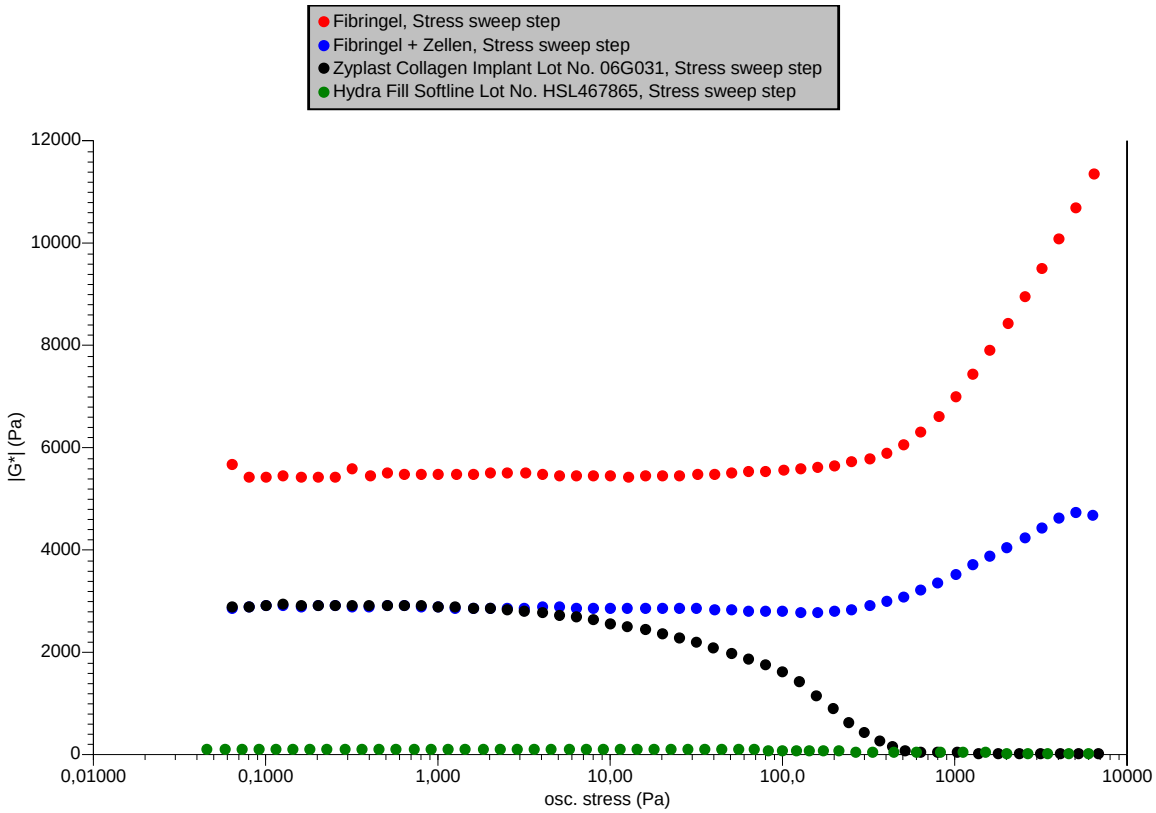


Abb. 26: Stressabhängiges komplexes Schermodul G* (Quelle: ARNOLD, U. Auswertungssoftware)

Die stressabhängige Auswertung bestätigt die Ergebnisse aus den frequenzabhängigen Versuchen. Hyaluronsäure (●) zeigt im gesamten untersuchten Bereich ein höher elastisches Verhalten als die anderen Werkstoffe und reißt später als Kollagen (●). Kollagen (●) ist im Vergleich dazu steifer und entspricht im Bereich von 0,1-7 Pa Fibringel mit Zellen (●). Fibringel ohne Zellen (●) weist die höchste Festigkeit auf. Dies liegt vermutlich daran, dass Fibrinogen mit Thrombin zu gleichen Anteilen gemischt wurde. Bei dem Fibringel mit Zellen (●) werden die Chondrozyten dem Fibrinogen zugegeben und damit anteilig weniger Fibrinogen zugesetzt, das zu einem festen Polymer ausgelieren kann.

Auffällig ist, dass in den Bereichen, in denen Kollagen (●) und Hyaluronsäure (●) ihre Struktur verlieren, die Graphen von Fibringel (mit/ohne Zellen) ansteigen. Das heißt, bei erhöhter Belastung wächst die Steifigkeit von Fibringel (mit/ohne Zellen). Ob dieses Phänomen für die Funktion als Stimmlippenaugmentationsmaterial relevant ist, muss noch geklärt werden.

WEISEL (2004, S. 273) bezeichnet dieses Verhalten als „strain hardening“ und erklärt: Die viskoelastischen Eigenschaften von Fibringel sind einzigartig unter den Polymeren. Fibringel ist physiologisch ideal angepasst. Das Fibringerinnsel ist sowohl bei niedrigen venösen Druck stabil, hält aber zugleich auch hohen arteriellen Drucken stand (vgl. WEISEL 204, S. 267, S. 272). Auf molekularer Ebene gibt es zwei Erklärungsversuche: Fibringel ist ein lang gestrecktes Protein, 45 nm lang, aufgebaut aus globulären Domänen, die an jedem Ende mit α-Helices zu einer globulären Region in der Mitte verbunden sind. Während der Blutgerinnung verwandelt Thrombin Fibrinogen in Fibrin um, indem es Fibrinogenpeptide von der zentralen Domäne abspaltet. Es entsteht eine Struktur, die Protofibrille genannt wird, welche im Durchschnitt 22,5 nm lang ist. Die Fasern sind gedrehte Strukturen (vgl. Abb. 27)

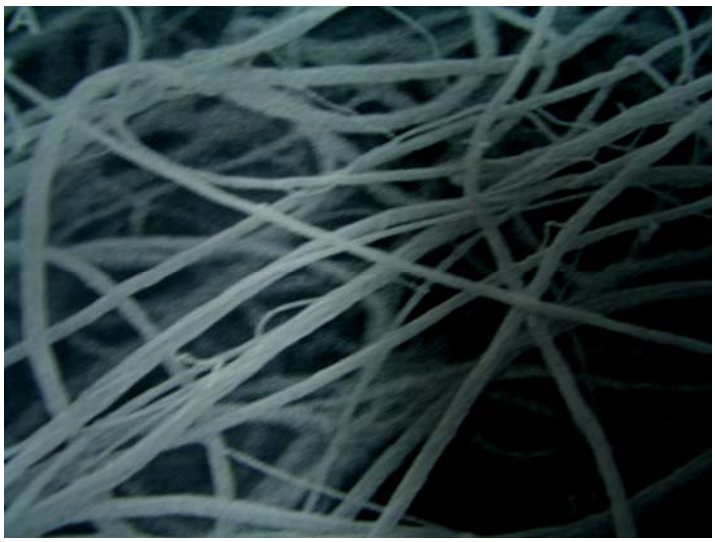


Abb. 27: Fibrin auf molekularer Ebene (Quelle: WEISEL 2004, S. 270)

Zwischen den Protofibrillen ist viel Raum und noch mehr Platz befindet sich zwischen den Fasern (vgl. WEISEL 2004, S. 267). Es wurde vorgeschlagen, dass die Versteifung des Materials von der gestiegenen Anzahl von Kontakten zwischen den festen Fasern bei großen Deformationen herrührt (vgl. JANMEY et al. 1983, S. 135ff.).

Auf der anderen Seite sind auch andere Mechanismen möglich. Wenn die Elastizität des Gerinnsels durch die Biegung der Fasern entsteht, mag bei größeren Kräften die Dehnung der Fasern mit ins Spiel kommen (vgl. WEISEL 2004, S. 274).

Unter rheologischen Gesichtspunkten scheint Fibringel für den klinischen Einsatz zur Stimmlippenaugmentation geeignet. Besonders in Verbindung mit suspendierten Chondrozyten wird eine Viskoelastizität erreicht, die der von Kollagen ähnelt.

5 DISKUSSION

5.1 Alternative Versuchstiere

Um die Augmentationsverfahren zu testen, eignen sich Tiermodelle, die dem Menschen anatomisch ähneln und für in vitro Tests zur Verfügung stehen. Je mehr Übereinstimmungen zwischen Modell und Mensch zu finden sind, umso besser können die Ergebnisse übertragen werden (vgl. ALIPOUR et al. 2008, S. 4572). In der Literatur wurden folgende Tiere beschrieben:

- Hund (ALIPOUR et al. 2008, S. 4572, HUNTER et al. 2004, S. 60)
- Schaf (ALIPOUR et al. 2008, S. 4572, HUNTER et al. 2004, S. 60)
- Rind (ALIPOUR et al., 2008, S. 4572)
- Schwein (ALIPOUR et al. S. 4572, JIANG et al. 2001, S. 1120ff., ROUSSEAU et al. 2004, S. 768)

Die folgenden Ausführungen beruhen auf Erfahrungen von ALIPOUR et al. (2001a, S. 550ff.), der als bestes Modell für phonatorische Experimente einen frischen menschlichen Kehlkopf aus der Pathologie bezeichnet. Aufgrund der geringen Verfügbarkeit wurden traditionell Hunde als Modelle verwendet, da deren offenkundige Ähnlichkeit des Kehlkopfes dafür spricht (vgl. HUNTER et al. 2004, S. 60). JIANG et al. (1994, S. 143) unterstreichen den Vorteil, dass Hundekehlköpfe meist aus anderen Experimenten zur Verfügung stehen und keine zusätzlichen toten Wirbeltiere erforderlich sind. Es gibt dennoch Unterschiede zwischen Hunden und Menschen. Das Fehlen eines Stimmligamentes ist dabei der gravierendste (vgl. JIANG et al. 1994, S. 143). ALIPOUR et al. (2001a, S. 550) warnen davor, Daten einfach auf den menschlichen Kehlkopf zu übertragen. HUNTER et al. (2004, S. 61) sehen in der schwierigen Verfügbarkeit geeigneter Hundearten einen weiteren Grund dafür, alternative Versuchstiere zu finden.

Es bietet sich an, Schafskehlköpfe zu verwenden, da Schafe als Versuchstiere in medizinischen und biologischen Experimenten schon seit langem Verwendung finden. In fetalen Untersuchungen wurden bereits Erfahrungen gesammelt und man könnte die

Kehlköpfe als Nebenprodukt nutzen. Außerdem ist der Schafskehlkopf für den Menschen ungenießbar und somit als Abfallprodukt vom Schlachter zu erwerben. Damit ist er sowohl aus ethischer wie auch aus finanzieller Sicht dem Hundekehlkopf überlegen. HUNTER et al. (2004, S. 61) führten Studien durch, die zeigten, dass die anatomischen Dimensionen des Schafskehlkopfes verglichen mit dem menschlichen Kehlkopf signifikant unterschiedlich waren. Das Fehlen einer definierbaren Grenze zwischen Taschenfalten und Stimmlippen erschwert die Verwendung der Ergebnisse beim Menschen. Ähnliche Überlegungen führten zum Einsatz von Rinderkehlköpfen, deren anatomische Verhältnisse aber ebenfalls die Interpretation der phonatorischen Ergebnisse erschwerten.

ROUSSEAU (2004, S. 768) hat die verschiedenen Tiermodelle analysiert und kommt zu dem Schluss, dass das Schwein prädestiniert für phonatorische Studien ist. In Hinsicht auf die anatomische Ähnlichkeit übertrifft es den Hundekehlkopf. Exakte Maße untermauern seine These: Eine Schweinestimmlippe ist durchschnittlich 18 mm lang und 0,9 mm dick verglichen zu den menschlichen Werten von 17 mm Länge und 1,1 mm Dicke. Die inserierende Muskulatur entspricht der des Menschen hinsichtlich Ursprung und Ansatz (vgl. ALIPOUR 2008, S. 4572) mit Ausnahme der fehlenden Taschenfalte im porcinen Larynx. Für die Phonation ist jedoch die untere Hälfte der zweigeteilten Stimmlippe verantwortlich. Makroskopisch und funktionell ist die zweigeteilte Stimmlippe der menschlichen Stimmlippe und Taschenfalte analog.

Die homologe Histologie führt dazu, dass die Biomechanik mit der menschlichen vergleichbar ist. Für Kehlkopfstudien ist der Schweinekehlkopf gut geeignet, weil er leicht phoniert werden kann und zusätzlich histologische und rheologische Experimente durchgeführt werden können.

Trotz etwaiger Einschränkungen eignen sich Tiermodelle nach wie vor, um komplexe dreidimensionale Vorgänge zu simulieren, die technische Modelle noch nicht visualisieren können (vgl. ROUSSAU 2004, S. 775). Zusätzlich besticht der Schweinekehlkopf durch die leichte Verfügbarkeit. Hier gilt das Gleiche wie bei Rind und Schaf. HARRISON (1995, S. 315f.) weist darauf hin, dass diese Spezies als Herbivoren eine große Epiglottis besitzen

und Arytenoide mit hohen lateralen Wänden, die es ihnen ermöglicht, gleichzeitig zu atmen und zu schlucken. Soll das Schwein für phonatorische Experimente eingesetzt werden, müssen die gewinkelte Position der Stimmlippen und die geringere Crycothyreoidgröße berücksichtigt werden, so ALIPOUR et al. (2008, S. 4573).

5.2 Vergleich verschiedener Kehlkopfmodelle

Generell gibt es zwei Optionen Larynxmodelle zu entwickeln. Laut ALIPOUR et al. (2007b, S. 1) bevorzugen einige Wissenschafter einen halbierten Kehlkopf, während andere ein intaktes Modell präferieren. Ein besserer Überblick spricht dafür, in den Versuchen einen halben Kehlkopf zu verwenden, der sowohl longitudinale als auch axiale Analysen ermöglicht. Ein solches Setup bezeichnet man als Hemilarynx und wird von DÖLLINGER et al. (2006, S. 402f.) folgendermaßen beschrieben:
Der Kehlkopf wird frei präpariert und die Trachea fünf Zentimeter unterhalb der Larynx durchtrennt. Der kraniale Resektionsrand liegt oberhalb der Taschenfalte. Eine Stimmlippe wird entfernt und durch eine Glasplatte ersetzt. Die Luftröhre wird über ein Glasrohr gestülpt und mit Druckluft insuffliert, so dass die Stimmlippe analog der physiologischen Phonation zum Schwingen angeregt wird. Zusätzlich wird die Luft erwärmt und befeuchtet.

DÖLLINGER et al. (2005, S. 3174) fixieren am Aryknorpel unterschiedliche Gewichte mit Nylonfäden, um die Adduktionsprozesse zu simulieren. KENECHI et al. (2001, S. 556) haben den Versuchsaufbau von JIANG et al. (1993, S. 872ff.) modifiziert. Sie ersetzen die herausgeschnittene Stimmlippe mit einer Glasplatte, die mit Lehm und Kleber befestigt wird. Zum Adjustieren des Aryknorpels verwenden sie eine zweizinkige Spange. Über einen Faden, der am vorderen Ende des Schildknorpels befestigt ist, verändern sie die Stimmlippenlänge. Jedes Mal, wenn dies erfolgt, muss das Luftleck zur Glasplatte hin erneut mit Lehm verschlossen werden. Nach zahlreichen Vorversuchen ist nach Meinung der Autoren ein suffizienter Schluss nur mit großem technischem Aufwand zu erzielen. Die Abbildung 28 (Quelle: DÖLLINGER et al. 2006, S. 403) verdeutlicht dies.

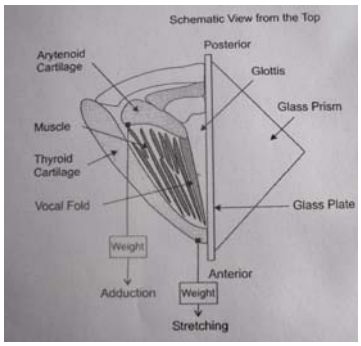


Abb. 28: Schematische Darstellung eines Hemilarynx Quelle: DÖLLINGER et al. (2006, S. 403)

Trotz des Vorteils der Übersicht ist die Funktion des Kehlkopfes am „kompletten“ Modell exakter dokumentierbar. Darüber hinaus sprechen ALIPOUR et al. (2001b, S. 1567) davon, dass das Vibrationsverhalten in diesem Hemilarynxmodell verglichen mit der normalen Phonation differiert. Die Glottis bleibt während des Schwingens rechteckig, statt von konvergent nach divergent zu wechseln. Als Grund dafür nennen sie den veränderten Flusswiderstand im Modell. Ziel ist ein Optimum an Funktion und Anschaulichkeit. Um das aerodynamische Profil der Glottis zu beschreiben, haben andere Experimente einen intakteren Versuchsaufbau, der die Grundlage für das in dieser Studie etablierte Modell darstellt. Explantierte Kehlköpfe wurden oberhalb der Taschenfalten gekürzt, um eine bessere Aufsicht zu realisieren.

Genaue Angaben zur Länge der Trachea machen KHOSLA et al. (2007, S. 218), die 8-10 cm verbleiben lassen. Mit denselben Maßen wurde auch in dieser Studie gearbeitet, da dies die stabilsten Ergebnisse erzielte. HEATON et al. (2005, S. 1223ff.) verwenden im gleichen Versuchsaufbau Hundekehlköpfe mit Luftröhrenlängen von lediglich vier Zentimetern. Zur Adduktion werden entweder Spangen (ALIPOUR et al. 1997, S. 187, VERDOLINI et al. 1998, S. 416) oder Nähte mit Gewichten fixiert (vgl. ALIPOUR et al. 2007a, S. 135). Fäden zur Adduktion werden bei HEATON et al. (2005, S. 1223ff.) und KHOSLA et al. (2007, S. 218) beschrieben. SHIOTANI et al. (1995, S. 357) ziehen zusätzlich noch Drähte durch die Crycothyreoidknorpel, um deren Aktivität zu simulieren. In allen Versuchsaufbauten wird erwärmte und befeuchtete Luft verwendet (VERDOLINI et al. 1998, S. 415; McNAMAR et al. 2008, S. 552; ALIPOUR et al. 2007c, S. 2296). Bei KHOSLA et al. (2007, S. 219) wird die Druckluft darüber hinaus mit einem Olivenöl-Aerosol versetzt.

SCHERER et al. (1997, S. 278) gehen soweit, die Kehlkopfmodelle um die falschen Stimmlippen zu reduzieren. Ziel ist eine bessere Darstellung der echten Stimmlippen. Diese Erkenntnisse wurden in dieser Studie zugrunde gelegt. Nach zahlreichen Vorversuchen kristallisierte sich heraus, dass nur bei erhaltenen oberen Stimmlippen eine kontrollierte Augmentation möglich ist, da ausschließlich intaktes Gewebe ein physiologisches Schwingungsverhalten aufweist. Die oberen Stimmlippen wurden mittig durch Nähte fixiert, um einen definierten Schluss der unteren Stimmlippen überprüfen zu können. Keine weitere Verletzung des Gewebes durch Spangen oder Drähte war nötig, weil die Stimmlippen durch gezielte externe Kompression in der Stativklemme angenähert wurden. Auf die Konsequenzen für die Reproduzierbarkeit der Versuchsergebnisse wird im nächsten Abschnitt genauer eingegangen.

5.3 Reproduzierbarkeit des Modells und des Versuchsaufbaus

Zeigen bisherige Ergebnisse die Tendenz, dass Fibringel den herkömmlichen Materialen überlegen bzw. zumindest gleichwertig ist, so stellt sich die Frage nach der Reproduzierbarkeit des Modells und damit der Ergebnisse. Da die unteren Stimmlippen intakt gelassen wurden, fand die einzige Manipulation an den oberen Stimmlippen statt. Man kann deshalb davon ausgehen, dass der Kehlkopf in seiner Funktion nicht weiter eingeschränkt ist und diese Präparation von ein und demselben „Behandler“ mit großer Übereinstimmung vorgenommen werden kann. Der Vorteil dürfte darin liegen, dass immer derselbe Kehlkopf mit sich im nicht augmentierten Zustand verglichen wurde und so keine inter-individuellen Unterschiede auftreten können.

Grundvoraussetzung für eine ideale Phonation ist nach Meinung von CHAN et al. (2003, S. 384ff.), dass die Kehlköpfe schnell eingefroren und langsam wieder aufgetaut wurden. Dieses Vorgehen erhält die viskoelastischen Eigenschaften des Gewebes. Scheinbar bleibt der Wassergehalt nahezu konstant, was nach Auffassung von JIANG et al. (1999, S. 51) essentiell für die Festigkeit, Viskosität und Masse des Gewebes ist.

Ein weiterer entscheidender Punkt, der mit der sorgfältigen Verarbeitung einhergeht, betrifft die Hydration der Versuchskehlköpfe während der Versuchsaufbauten. Obwohl erwärmte und angefeuchtete Druckluft verwendet wurde, verhinderte zusätzlich ein feuchtes Tuch das Austrocknen der Stimmlippen. JIANG et al. (1999, S. 51) vertreten die Position, dass der Feuchtigkeitsgehalt des Stimmlippengewebes die Gewebeviskosität beeinflusst, welche proportional zu dem minimalen Druck ist, der eine Stimmlippenschwingung initiiert. Je niedriger die Viskosität (je höher der Feuchtigkeitsgehalt der Stimmlippe), umso weniger Kraft wird zur Phonation benötigt, betonen JIANG et al. (1999, S. 51).

Da die Stärke der Druckluft bei dem Versuchsaufbau konstant war, wurde lediglich der Abstand der Stimmlippen variiert. Ziel war vor und nach der Augmentation von 0,1 ml Material, auf jeder Seite einen suffizienten Glottisschluss zu erreichen. Diese beiden Voraussetzungen stellen Herausforderungen an die Durchführung dar. Zum Einen handelt es sich um ein sehr geringes Volumen, welches an exakt dieselbe Stelle bei der jeweiligen Stimmlippe injiziert werden muss.

Zum Anderen erfordert es viel praktische Erfahrung, die Kehlköpfe so zu komprimieren, dass eine Phonation möglich ist. Aus den genannten Gründen sollten die glottographischen Ergebnisse qualitativ interpretiert werden. Da die Kehlköpfe identisch behandelt wurden, ist es möglich, Rückschlüsse auf das Verhalten der Kehlköpfe bei einer Stimmlippenaugmentation zu ziehen. Betrachtet man die glottographischen Ergebnisse zeigt sich, dass alle Augmentationsmaterialien vergleichbar schwingen und keine signifikanten Unterschiede feststellbar sind. Weil der Anpressdruck exakt den jeweiligen Gegebenheiten angepasst wurde, kann folgende qualitative Aussage getroffen werden: Sowohl hinsichtlich der Durchführbarkeit als auch hinsichtlich der physikalischen Klangausbeute eignet sich Fibringel mit und ohne Zellen zur Injektion.

Für eine objektive Beschreibung der Stimmlippenaugmentation ist das Modell adäquat. Dies zeigen die rheologischen und histologischen Untersuchungen. Anatomisch betrachtet ähnelt der Kehlkopf in seiner Morphologie dem menschlichen so sehr, dass der direkte Vergleich möglich ist. Da die rheologischen Tests mit den Augmentationsmaterialien per se stattfanden,

erübrigt sich die Frage nach etwaigen Diskrepanzen. Unter rheologischen Gesichtspunkten scheint Fibringel für den klinischen Einsatz zur Stimmlippenaugmentation geeignet. Besonders in Verbindung mit suspendierten Chondrozyten wird eine Viskoelastizität erreicht, die der von Kollagen ähnelt.

5.4 Fibringelmodifikation

In der Medizin wurden mit Fibrinkleber schon seit über 20 Jahren Erfahrungen gesammelt (vgl. EYRICH 2006, S. 65). Diese Erkenntnisse hat man genutzt, um ein Fibringel zu entwickeln, das als dreidimensionales Konstrukt im Körper verbleibt. Damit werden die guten biokompatiblen Eigenschaften durch den Vorteil der Raumfüllung ergänzt. Ein weiterer möglicher Schritt wäre, die Bestandteile aus dem Empfänger zu isolieren, um allergische Reaktionen zu vermeiden. So würde ein zusätzlicher Allergietest wegfallen, was einen Vorteil gegenüber Kollagen darstellt.

Der Inhalt des folgenden Abschnitts basiert im Wesentlichen auf EYRICH (2006, S. 15f.). Da Fibrinkleber in vivo maximal vier Wochen stabil war, wurde er so modifiziert, dass die Fibrinolyse nicht zu früh stattfand. Dazu wird in der Wissenschaft mit Aprotinin gearbeitet. Nachdem Fibringel in vitro viel versprechende Langzeitergebnisse geliefert hat, liegt die Annahme nahe, dass es auch in vivo länger als die herkömmlichen Materialien im Körper verweilen kann. Um dies besser beurteilen zu können, folgen weitere in vivo Studien zur Langzeitstabilität und Verträglichkeit. Es bietet sich die Überlegung an, das Fibringel so zu modifizieren, dass die Fibrinolyse z.B. durch Plasminzugabe gesteuert werden kann. Das Ziel liegt darin, ein modifiziertes Gel zu entwickeln, welches beim Einspritzen eine höhere Viskosität hat, damit es sich im Gewebe nicht zu leicht verteilt.

Hinsichtlich der viskoelastischen Eigenschaften ist Fibringel mit Zellen am besten geeignet, weil es relativ elastisch ist. Wie JIANG et al. (1999, S. 51) eingehend darlegten, schwingt ein niedrig visköses Material leichter als ein festeres. Folgt man den Überlegungen von EYRICH (2006, S. 84), sollten wenigstens drei Millionen Zellen in 40 µl Fibringel eingesetzt werden. Eine zu hohe Zelldichte führt zu mangelnder Versorgung der Zellen (vgl. EYRICH 2006,

S. 54). Eine weitere Möglichkeit, die Eigenschaften von Fibringel zu ändern, besteht darin, die Konzentration der verschieden Komponenten zu variieren (vgl. EYRICH 2006, S. 24). Größere Fibrinogenkonzentrationen verlangsamen den Fibrinabbau (vgl. EYRICH 2006, S. 52), führen aber auch zu einer beschleunigten Polymerisation. Ihr Ansatz war allerdings, das Gel als Trägermaterial für Knorpel Tissue Engeneering und zur Gewinnung von Neoknorpel zu verwenden. Intention der vorliegenden Studie ist nicht zwingend die Produktion von Knorpel, sondern ein langzeitstabiles Volumen.

Weitere Überlegungen bestehen darin, Fibringel als Matrix für andere Zellen zu nutzen. Bedingung dabei ist, dass diese nicht kanzerogen, sondern stabilisierend sind. Aufgrund der Lokalisation bieten sich neben **Chondrozyten** theoretisch Muskelzellen und **Fibroblasten** an. Letztere sind für dreidimensionale Konstrukte eher ungeeignet, weil sie primär zweidimensionale Zellkontakte ausbilden und zusätzlich die Gefahr der ungehinderten Proliferation besteht. **Myozyten** sind dagegen sehr anspruchsvoll zu kultivieren. Zudem ist eine in vivo Vaskularisation nötig.

Chondrozyten lassen sich leicht gewinnen, proliferieren gut und sind in vivo relativ anspruchslos, d. h. sie brauchen keine Blutgefäße. Für den klinischen Einsatz sind größere Volumina nötig. Die Avaskularität von Knorpel ist hier der entscheidende Vorteil.

Unter dem Gesichtspunkt anstatt einer schlichten Reparatur eine **Regeneration** zu erzielen, könnte man mit dem Prinzip der zellulären Therapie zur Stimmlippenaugmenation am besten nahe kommen. FORD (2008, S. 1712) sieht das Ziel moderner Biomaterialien darin, diese nicht nur als reine Füllkörper einzusetzen. Augmentationsmaterialien sollen intelligente Stoffe sein, die optimal auf die Stimmlippenumgebung antworten können. Da im Kehlkopf physiologisch Knorpelzellen vorhanden sind, bieten sich diese als geeignete Makrofüller an. In Kombination mit dem langzeitstabilen Fibringel, rückt das Ziel einer physiologischen Reparatur nahe, die im Idealfall zu einer funktionellen Regeneration wird. Aktuelle Studien untersuchen bereits den in vivo Einfluss integrierter Zellen und stellen damit die Weichen für den klinischen Einsatz von Fibringel mit und ohne zusätzliche Zellen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

6.1 Hintergrund

Die Kommunikation ist für den Menschen sowohl in privater (kultureller und sozialer) als auch ökonomischer Hinsicht eine wichtige Fähigkeit. Ort der Stimmbildung ist der Kehlkopf, wobei die Stimmlippen für die Phonation essentiell sind. Diese werden physiologisch durch die Exspiration in Schwingungen versetzt. Sind sie narbig verändert oder gelähmt, besteht eine Indikation zur Stimmlippenaugmentation.

Bisherige Standardmethoden zur Stimmlippenaugmentation sind die Applikation von **Kollagen, Fett, Silikon, Goretex** oder **Hyaluronsäure**, welche Risiken wie **Allergisierung, Diffusion, Migration** sowie rasche **Resorption** bergen. **Fibringel** umgeht diese Nachteile und zeigt gleichzeitig die Vorteile der Stimmlippenaugmentation. So spricht z.B. die relativ leichte Durchführbarkeit in kurzer Anästhesie ohne sichtbare Narben für diese Therapiemaßnahme zur Stimmrehabilitation, verglichen mit invasiven Maßnahmen z. B. der Thyreoplastik.

Zusätzlich kann Fibringel als Matrix genutzt werden, um Zellen einzuschleusen. Gute in vitro Erfahrungen lenken den Fokus auf **Chondrozyten,** welche zusätzliche Stabilität gewährleisten. Mit Hilfe eines in vitro Modells können die physikalischen Eigenschaften von Fibringel im Vergleich zu herkömmlichen Augmentationsmaterialien überprüft werden. Die Etablierung eines in vitro Modells aus Schweinekehlköpfen hat sich aufgrund zahlreicher Anatomieanaloga als nützlich erwiesen.

6.2 Material und Methoden

Das Modell hat den Vorteil der relativ einfachen Verfügbarkeit und bietet zusätzlich Größenverhältnisse, die dem humanen Kehlkopf entsprechen und damit Rückschlüsse auf die klinische Anwendung ermöglichen.

Bei der Präparation steht die **Übersichtlichkeit** bei erhaltener **Funktion** im Vordergrund. Erwärmte, befeuchtete Druckluft wird verwendet, um die Stimmlippen zum Schwingen

anzuregen. Eine Hochgeschwindigkeitskamera im idealen Abstand macht eine Analyse des Schwingungsverhaltens möglich. In der Versuchsreihe werden zwei gebräuchliche Augmentationsverfahren mit Fibringel verglichen. Dafür werden jeweils 0,1 ml Kollagen, Hyaluronsäure sowie Fibringel (mit und ohne Chondrozyten) pro Stimmlippe injiziert.

Eine laterale Applikation vermeidet die Füllung des REINKE´schen Raumes und damit Versteifung der Stimmlippe (vgl. HACKI et al. 1999, S. 509). Die exakte Positionierung wird histologisch abgesichert, indem nach der Augmentation Proben von den Stimmlippen gewonnen wurden.

Zur Bestimmung der mechanischen Eigenschaften wurden rheologische Tests durchgeführt, die sowohl das elastische als auch das visköse Verhalten bei unterschiedlicher Belastung untersuchten.

6.3 Ergebnisse

Für die Auswertung werden sowohl der physiologische Schwingungsablauf als auch generellere Bewertungskriterien berücksichtigt. Betrachtet man Glottisschluss, Amplitude, Symmetrie und Periodizität erhält man folgendes Ergebnis: Fibringel stellt hinsichtlich der untersuchten Parameter eine viel versprechende Alternative zu Hyaluronsäure und Kollagen dar.

Die histologischen Untersuchungen zeigen, dass sich Fibringel zwar diffuser als Kollagen und Hyaluronsäure im Gewebe verteilt, die augmentierten Zellen aber ortständig sind und das Fibringel nicht verlassen. Damit ist mit Fibringel (mit und ohne zusätzliche Zellen) eine Augmentation möglich.

Positive Eigenschaften weisen die rheologischen Versuche nach. Fibringel mit Zellen hat bei niedriger Belastung die gleiche Festigkeit wie Kollagen. Während Kollagen und Hyaluronsäure bei zunehmendem Stress zerstört werden, erfährt das Fibringel einen Härtezuwachs und ist damit zur Augmentation in die oszillierenden Stimmlippen gut geeignet.

Ideale Voraussetzungen bietet Fibringel mit Zellen, da es niedriger viskös als reines Fibringel ist und somit die Phonation erleichtert (vgl. JIANG et al. 1999, S. 51).

6.4 Schlussfolgerungen

Das Modell ist für diese Untersuchungen adäquat, da es hinsichtlich Reproduzierbarkeit und anatomischer Verhältnisse mögliche alternative Tiermodelle sowie Methoden übertrifft.

Mit der Aussicht auf **Langzeitstabilität** könnte Fibringel den herkömmlichen Materialien überlegen sein und dem Patienten häufige Eingriffe ersparen. Damit ist Fibringel sowohl aus ökonomischer als auch aus physiologischer Sicht das Mittel der Wahl.

Sein fehlendes allergenes Potential ist ein weiterer positiver Aspekt. Zusätzliche Experimente sind erforderlich, um die **Biokompatibilität** sowie die in vivo Langzeitstabilität zu validieren. Weitere Versuche sind nötig, um festzulegen, ob diese viel versprechenden Ergebnisse auf den menschlichen Larynx übertragen werden können (vgl. HEATON et al. 2005, S. 1229).

Zudem ist Fibringel als **Matrix** nutzbar und bietet damit die Option, andere Zellen einzuschleusen. Unter der Prämisse, dass diese Substanzen nicht kanzerogen oder proliferierend sind, könnte dies zu einer zusätzlichen Stabilisierung beitragen. Zukünftige Arbeiten können den Einfluss dieser integrierten Zellen in vivo untersuchen.

Ziel moderner Medizin ist eine **Regeneration** anstatt reiner passiver Implantation. Allein dadurch ist gewährleistet, dass die Funktion wiederhergestellt wird. Dies steht im Fokus der Wissenschaft und ist für den Patienten von größtem Interesse. Die bloße Reparatur wird damit einer biomechanischen Prüfung unterzogen. In Zukunft ist eine stärkere interdisziplinäre Zusammenarbeit erforderlich (vgl. FORD 2008, S. 1712).

7 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Querschnitt durch das Kehlkopfinnere..... 10
Abb. 2: Trompete mit Mundstück 11
Abb. 3: Einteilung der Stimmfrequenzen..... 12
Abb. 4: Procedere bei der Stimmlippenaugmentation 16
Abb. 5: Fibringel-Mischkanüle..... 20
Abb. 6: Fibrin in der menschlichen Blutgerinnung..... 21
Abb. 7: Stimmlippenfixierung mit Supolene® -Fäden..... 23
Abb. 8: Testreihe mit Kehlköpfen, sortiert nach Trachealänge von 3-8 cm aufsteigend 24
Abb. 9: Luftbefeuchter mit Stativklemme..... 25
Abb. 10: Schema zum Versuchsaufbau..... 26
Abb. 11: Bedienung der Hochgeschwindigkeitskamera..... 27
Abb. 12: Augmentation an einem halbierten Kehlkopf..... 28
Abb. 13: Vorbereitung für die histologischen Schnitte..... 30
Abb. 14: Herr Dr. F. Brandl bereitet das Rheometer vor..... 32
Abb. 15: Glottographische Aufnahmen vor und nach der Augmentation von Schwein 4 36
Abb. 16a: Amplitude Stimmlippe oben (vor und nach der Augmentation)..... 37
Abb. 16b: Amplitude Stimmlippe unten (vor und nach der Augmentation)..... 37
Abb. 17: Gemessener Unterschied beider Stimmlippen (vor und nach Augmentation).. 38
Abb. 18: Schwingungsdauer in ms (vor und nach der Augmentation)..... 39
Abb. 19: Frontalschnitt durch einen Kehlkopf, Färbung: Azan; Vergr. 8fach..... 40
Abb. 20: Injiziertes Kollagen, Färbung: Hämatoxylin-Eosin, Vergr. 1fach und 2fach.... 41
Abb. 21: Augmentierte Hyaluronsäure, Färbung: Hämatoxylin-Eosin..... 41
Abb. 22: Photographie Kryo-Schnitt..... 42
Abb. 23: Fibringel Färbung: DAPI, Vergr. 4fach..... 42
Abb. 24: Fibringel (mit/ohne Zellen) während des Ausgelierens..... 44
Abb. 25: Frequenzabhängiges komplexes Schermodul G*..... 45
Abb. 26: Stressabhängiges komplexes Schermodul G*..... 46
Abb. 27: Fibrin auf molekularer Ebene 47
Abb. 28: Schematische Darstellung eines Hemilarynx……..…… 52

8 LITERATURVERZEICHNIS

ALIPOUR, F., SCHERER, R. C., FINNEGAN, E. *Pressure-flow Relationships During Phonation as a Function of Adduction*. Journal of Voice. 1997; 11 (2): 187-194.

ALIPOUR, F., MONTEQUIN, D., TAYAMA, N. *Aerodynamic profiles of a hemilarynx with a vocal tract*. Ann Otol Rhinol Laryngol. 2001a; 110: 550-555.

ALIPOUR, F., SCHERER, R. C. *Effects of oscillation of a mechanical hemilarynx model on mean transglottal pressures and flow.* J. Acoust. Soc. Am. 2001b; 110 (3): 1562-1569.

ALIPOUR, F., JAISWAL, S., FINNEGAN, E. *Aerodynamic and Acoustic Effects of False Vocal Folds and Epiglottis in Excised Larynx Models*. Annals of Otology, Rhinology & Laryngology. 2007a; 116 (2): 135-144.

ALIPOUR, F., JAISWAL, S. *Glottal Airflow Resistance in Excised Pig, Sheep, and Cow Larynges.* Journal of Voice. 2007b: 1-14.

ALIPOUR, F., SCHERER, R. C. *On pressure-frequency relations in the excised larynx*. J. Acoust. Soc. Am. 2007c; 122 (4): 2296-2305.

ALIPOUR, F., JAISWAL, S. *Phonatory characteristics of excised pig, sheep, and cow larynges*. J. Acoust. Soc. Am. 2008; 123 (6): 4572-4581.

ALZHEIMER, C., DEETJEN, P., DEETJEN-SPECKMANN-HESCHELER *Physiologie* 2005 [erschienen] 2007; München, Urban & Fischer.

ARNOLD, G. E. *Vocal rehabilitation of paralytic dysphonia. X. Functional results of intrachordal injection.*, Arch Otolaryngol 1963; 78: 179-186.

BAER, T. *Investigation of phonation using excised larynges*. Diss. 1975, Boston.

BERGHAUS, A., RETTINGER, G., BÖHME, G. *Hals- Nasen- Ohren- Heilkunde.* 1996.

BOENNINGHAUS, H.-G. , LENARZ, T. *HNO*. 2005, Springerverlag.

BÖHME, G. *Sprach-, Sprech-, Stimm-, und Schluckstörungen Band 1: Klinik*, 2003.

BÜCHELER, M., HAISCH, A. *Tissue Engineering in Otorhinolaryngology*. DNA AND CELL BIOLOGY 2003; 22 (9): 549-564.

CHAN, R. W., GRAY, S. D., TITZE, I. R. *The importance of hyaluronic acid in vocal fold biomechanics*. Otolaryngol Head Neck Surg, 2001; 124: 607-614.

CHAN, R. W., TITZE, I. R. *Effect of post-mortem changes and freezing on viscoelastic properties of vocal fold tissues*. Ann Biomed Eng, 2003; 31: 48-491.

DAHLQVIST, A., GÄRSKOG, O., LAURENT, C., HERTEGARD, S., AMBROSIO, L., BORZACCHIELLO, A. *Viscoelasticity of Rabbit Vocal Folds After Injection Augmentation*. The Laryngoscope, 2004; 114: 138-142.

DÖLLINGER, M., BERRY, D. A., BERKE, G. S. *Medial surface dynamics of an in vivo canine vocal fold during phonation*. J. Acoust. Soc. Am, 2005; 117 (5): 3174-3183.

DÖLLINGER, M., BERRY, D. A. *Visualization and Quantification of the Medial Surface Dynamics of an Excised Human Vocal Fold During Phonation*. Journal of Voice, 2006; 20 (3): 401-413.

DUFLO, S., THIBEAULT, S. L., LI, W., ZHENG SHU, X., PRESTWICH, G. D. *Vocal Fold Tissue Repair in Vivo Using a Synthetic Extracellular Matrix*. Tissue Engineering, 2006; 12 (8): 2171-2180.

EYRICH, D. *Fibrin for Tissue Engineering of Cartilage*. Diss. Regensburg, 2006.

FORD, C. N. *Paradigms und Progress in Vocal Fold Restoration*. Laryngoscope, 2008; 118: 1709-1713.

FORTIER, L. A., BROMAN, P. J., NIXON, A. J., MOHAMMED, H. *Disparate chondrozyte metabolism in three-dimensional fibrin cultures derived from autogenous or commercially manufactured fibrinogen*, Am J Vet Res. 1998; 59 (4): 514-520.

FREIDRICH, G. *Externe Stimmlippenmedialisation: Operative Erfahrungen und Modifikationen*. Laryngo- Rhino- Otol.1998; 77: 7-17.

HACKI, T., BÖCKLER, R., PÉREZ ÁLVAREZ, J. C. *Indikation zur Stimmlippenaugmentation mit Kollagen*. Laryngo- Rhino- Otol. 1999; 78: 508-511.

HARRISON, D. F. N. *The Anatomy and Physiology of the Mammalian Larynx*. Journal of Anatomy, 1997; 191 (2): 315-317 Cambridge University Press Copyright © Anatomical Society of Great Britain and Ireland 1997.

HEATON, J. T., KOBLER, J., HILLMANN, R. E., ZEITELS, S. M. *A New Instrument for Intraoperative Assessment of Individual Vocal Folds*. The American Laryngological et Otological Society, Inc. 2005; 115 (7): 1223-1229.

HIRANO, M. *Morphological structure of the vocal cord as a vibrator and its variation.* Folia Phoniatr (Basel), 1974; 26: 89-94.

HOMMINGA, G. N., BUMA, P., KOOT, H. W., VAN DER KRAN, P. M., VAN DER BERG, W. B. *Chondrozyte behaviour in fibrin glue in vitro*. Acta Orthop Scand. 1993; 64 (4): 441-445.

HSIUNG, M.-W., WOO, P., MINASIAN, A, MOJICA, S.*: Fat Augmentation for glottic insuffiency*. Laryngoscope, 2000; 110 (6): 1026-1033.

JANMEY, P. A., AMIS, E. J., FERRY, J. D. *Rheology of fibrin clots: VI. Stress relaxation, creep, and differential dynamic modulus of fine clots in large shearing deformations*. J. Rheol, 1983; 27: 135-153.

JIANG, J. J., TITZE, I. R. *A methodical study of hemilaryngeal phonation*. Laryngoscope, 1993; 103: 872-882.

JIANG, J. J., TITZE, I. R. *Measurement of Vocal Fold Intraglottal Pressure and Impact Stress.* Journal of Voice. 1994; 8 (2): 132-144.

JIANG, J., NG, J., HANSON, D. *The Effects of Rehydration on Phonation in Excised Canine Larynges*. Journal of voice, 1999; 13:51-59.

JIANG, J. J., RAVIV, I. R., HANSON, D. G. *Comparison of the phonation-related structures among pig, dog, white-tailed deer, and human larynges*. Ann Otol Rhinol Laryngol, 2001; 110: 1120-1125.

KENECHI, K., KAZUTOMO, K. *Effects of length and depth of vibration of the vocal folds on the relationship between transglottal pressure and fundamental frequency of phonation in canine larynges*. Ann Otol Rhinol Laryngol, 2001; 110 (6): 556-561.

KHOSLA, S., MURUGAPPAN, S., GUTMARK, E., SCHERER, R. *Vertical Flow Field During Phonation in an Excised Canine Larynx Model*. Annals of Otology, Rhinology & Laryngology, 2007; 116 (3): 217-228.

KHOSLA, S., MURUGAPPAN, S., LAKHAMRAJU, R., GUTMARK, E., *Using Particle Imaging Velocimetry to Measure Anterior-Posterior Velocity Gradients in the Excised Canine Larynx Model*. Annals of Otology, Rhinology & Laryngology, 2008; 117 (2): 134-144.

KIM, M. J., HUNTER, E. J., TITZE, I. R. *Comparison of human, canine, and ovine laryngeal dimensions*. Ann Otol Rhinol Laryngol, 2004; 113(1): 60-68.

KLINKE, R., SILBERNAGL, S. *Lehrbuch der Physiologie.* Stuttgart, 1996.

KOB, M. *Physical Modelling of the Singing Voice,* Diss. Aachen, 2002.

KÜHNEL, W. *Taschenatlas der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie*. 1995.

LÖFFLER, G., PETRIDES, P. *Biochemie und Pathobiochemie.* 6. Auflage. Springer, 1998.

LÜRßEN, K.(2005): *OCT- kontrollierte Mikrochirurgie der Stimmlippe basierend auf fs Technologie*, Online im Internet: http://www.mh-hannover.de/642.html, Stand 2005, Abfrage: 12.11.08, 10:45Uhr.

McCULLOCH, T. M. et al. *Long-term follow-up of fat injection. Laryngoplasty for unilateral vocal fold paralysi.,* Laryngoscope, 2002; 112: 1235-1238.

McNAMAR, J., MONTEQUIN, D. W., WELHAM, H, DAILEY, S. *Aerodynamic, Acoustic, and Vibratory Comparison of Arytenoid Adduction and Adduction Arytenopexy*. Laryngoscope, 2008; 118 (3): 552-558.

REJIONEN, P. *Results of fascial augmentation in unilateral vocal fold paralysis*. Ann Otol Rhinol Laryngol, 2002; 111: 523-529.

ROSANOWSKI, F., TIGGES, M., PRÖSCHEL, U., EYSHOLDT, U. F. *Frühzeitige Indikation zur operativen Stimmlippenmedianverlagerung bei einseitigen Recurrensparesen im fortgeschrittenen Lebensalter*. Laryngo- Rhino-Otol, 1996; 75, 290-292.

ROUSSEAU, B., SOHN, J., TA*T*EYA, J., MONTEQUIN, D. W., BLESS, D. M. *Functional outcomes of reduced hyaluronan in acute vocal fold scar*. Ann Otol Laryngol 113: 2004, 767-776.

RUBEN, R. J. *Refining the survival of the fittest: communication disorders in the 21st century*. Laryngoscope, 2000; 110: 241-245.

SCHERER, C. R., ALIPOUR, F., FINNEGAN, E. GENG GUO, C. *The Membranous Contact Quotient: A New Phonatory Measure of Glottal Competence*. Journal of Voice, 1997; 11 (3): 277-284.

SCHÖNHÄRL, E. *Die Stroboskopie in der praktischen Laryngologie*. Stuttgart, 1960.

SHIOTANI, A., FUKUDA, H., KAWAIDA, M., KANZAKI, J. *Vocal fold vibration in simulated head voice phonation in excised canine larynges*. Eur Arch Otorhinolaryngol, 1996; 253: 356-363.

SOMMER, P. *Die Kollageninjektion zur Augmentation des insuffizienten Stimmprothesenlagers*. Diss. Düsseldorf, 2006.

TAO, C., JIANG, J. J., *The phonation critical condition in rectangular glottis with wide prephonatory gaps*. J. Acoust. Soc. Am., 2007; 123 (3): 1637-1641.

TITZE, I. R., *The physics of small- amplitude oscillation of the vocal folds*. J. Acoust. Soc. Am., 1988; 83 (4): 1536- 1552.

TITZE, I. R., *On the relation between subglottal pressure and fundamental frequency in phonation*. J. Acoust. Soc. Am., 1989; 85 (2): 901-906.

TITZE, I. R. *Phonation threshold pressure: A missing link in glottal aerodynamics*. J. Acoust. Soc. Am., 1992; 91: 2926-2935.

TITZE, I. R., STORY B. H. *Acoustic interactions of the voice source with the lower tract*. J. Acoust. Soc. Am., 1997; 101 (4): 2234-2243.

TSUNODA, K. et al. *Autologous transplantation of fascia into vocal fold: long-term results of a new phonosurgical technique for glottal competence*. Laryngoscope, 2001; 111: 453-457.

VERDOLINI, K, CHAN, R., TITZE, I., HESS, M., BIERHALS, W. *Correspondence of Electroglottographic Closed Quotient to Vocal Fold Impact Stress in Excised Canine Larynges*. Journal of Voice,1998; 12 (4): 415-423.

WEISEL, J. W. *The mechanical properties of fibrin for basic scientists and clinicians*. Biophysical Chemistry, 2004; 112: 267-276.

WITTEKINDT, C. (2008): *Larynx I*, Online im Internet: http://www.hno.uniklinikum-jena.de/data/hno_/Lehrveranstaltungen/08_larynx_i.pdf, Stand: 08.05.08, Abfrage: 12.11.08; 10:30 Uhr, 1-49.

WOO, P. *Quantification of Videostrobolaryngoscopic Findings – Measurements of the Normal Glottal Cycle*. Laryngoscope, 1996:1-27.

WOYWOD, C., OLTHOFF, A., KRUSE, E. *Stroboskopie versus Hochgeschwindigkeits – Glottographie: ein Vergleich.* Online im Internet: http:// www.egms.de/de/meetings/dgpp2007/07dgpp16.shtml, Stand: 2007, Abfrage 03.08.09, 11Uhr.

ZHANG, Z., NEUBAUER, J., BEERY D. A. *The influence of subglottal acoustics on laboratory models of phonation*. J. Acoust. Soc. Am. 2006; 120 (3): 1558-1569.

DANKSAGUNGEN

Mein Dank gilt Herrn **Prof. Dr. Dr. h. c. Hacki** für die freundliche Überlassung dieses interessanten Themas, sowie Herrn **Dr. Pérez Álvarez** und Herrn **Dr. Skodacek** für die konstruktive Kritik und ihre Anteilnahme während der gesamten Arbeit.

Frau **Dr. Sabine Ratzinger** für ihre unkomplizierte und wunderbare Unterstützung, sowie Herrn **Dr. Kujat** für die kreativen Anregungen während des praktischen Teils. **Petra Eberl** und **Michael Maurer**, die mir bei meinen Laborarbeiten zur Seite gestanden haben, sowie **Herrn Dr. Brandl**, der für die rheologischen Tests verantwortlich war. Der **Metzgerei Retzer** in Nittendorf für die Kehlköpfe.

Herzlicher Dank gebührt meinen Freunden besonders **Frau Brauen, Frau Hopf, Frau Dr. Rieder und Frau Witter,** ebenso **Herrn Alt, Herrn Loscher, Herrn Santner, Herrn Tack** und **Herrn Wild,** die mich geduldig begleitet haben und nicht zuletzt **meiner Familie** für ihre offenen Ohren und das Interesse an meiner Arbeit. **Vielen Dank**!

LEBENSLAUF

Angaben zur Person

Name:	Ulrike Arnold
Wohnort:	Salzburger Straße 18 83435 Bad Reichenhall Tel.: 08651/7640137
Familienstand:	ledig
Geburtstag:	05.05.1983
Geburtsort:	Freiberg
Nationalität:	deutsch

Schulbildung

09/1989-07/1993	Grundschule Alzenau
09/1993-06/2002	Spessart- Gymnasium- Alzenau Teilnahme am Bundeswettbewerb für Fremdsprachen Teilnahme am Landeswettbewerb für Mathematik Teilnahme am Certamen Bavaricum Sprachreisen nach Thaon, Antibes und Brighton
2002	Freiwillige Arbeit für „Archelon“ (griech. Organisation zum Schutze der bedrohten Meeresschildkröten) auf Kreta

Studium

10/2002-06/2008	Studium der Zahnmedizin an der Universität Regensburg
10/2003	Naturwissenschaftliche Vorprüfung
04/2005	Zahnärztliche Vorprüfung
06/2008	Zahnärztliche Prüfung

Studienbegleitende Tätigkeiten

03/2003	Aufnahme in die Studienstiftung des Deutschen Volkes
10/2003-06/2004	Spanischkurs an der Universität Regensburg
08/2006	Famulatur an der Uniklinik Regensburg
02/2006-04/2006	Famulatur in Thailand
04/2007-04/2008	Akupunkturkurs
07/2008	Promotionssemester
01/2009	Assistentenstelle in Bad Reichenhall

Interessen

Sport (Bergsteigen, Joggen, Skitouren)
Reisen, Fremdsprachen
Kunst

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Die vorliegende Arbeit wurde von mir selbständig angefertigt. Andere als die angegebenen Hilfsmittel wurden nicht benutzt.

Regensburg, den 15.03.2010

Ulrike Arnold