



Molekulare Laryngologie

Ein neues Kapitel im Verständnis laryngealer Erkrankungen

Die Stimmlippen (SL) des Menschen sind einzigartigen mechanischen Belastungen ausgesetzt. Bei Phonation treten Beschleunigungen von 200–300 G und Frequenzen von 100–1000 Hz auf [1]. Um diesen Belastungen standzuhalten und zudem eine ungestörte SL-Schwingung mit daraus resultierendem klaren Stimmklang zu gewährleisten, verfügt das ortsständige Gewebe über Eigenschaften, wie man sie nirgendwo im Körper findet.

» Die laryngeale Mukosa spielt eine herausragende Bedeutung für die Stimmproduktion

Insbesondere die laryngeale Mukosa spielt eine herausragende Bedeutung für die Stimmproduktion, was sich eindrucksvoll im Fall einer ein- oder beidseitigen SL-Narbe (bei der die Schwingung stark eingeschränkt ist) akustisch manifestiert. Im folgenden Beitrag wird die bekannte und vielfach beschriebene SL-Anatomie um neue Aspekte ergänzt. Darauf aufbauend gehen die Autor(inn)en auf benigne Veränderungen der SL-Mukosa, insbesondere der funktionell wichtigen Lamina propria, näher ein, wohl wissend, dass viele Erkrankungen vom SL-Epithel (v. a. Karzinome, Papillome) und der SL-Muskulatur ausgehen (beispielsweise altersassoziierte Atrophie) bzw. neurogener Natur (Parese) sind.

Benigne Veränderungen der Lamina propria kommen sehr häufig in der phoniatriisch-laryngologischen Praxis vor und können entweder konservativ-logopädisch oder (mikro)chirurgisch

behandelt werden. Die Diagnose und phonochirurgische Therapie einer SL-Zyste oder eines SL-Polypen stellen in den meisten Fällen kein Problem dar. Es gibt aber auch eine Reihe von benignen SL-Veränderungen, bei denen eine chirurgische Therapie zwar zu einer Verbesserung der Symptome, aber keiner Restitutio ad integrum führt. Beispiele hierfür sind die zuvor genannten SL-Narben, aber auch ein Sulcus glottidis oder in manchen Fällen das Reinke-Ödem.

Herausforderungen in der Stimmlippenforschung

An dieser Feststellung offenbart sich ein fundamentales Problem in der Laryngologie: Das pathologische/pathophysiologische Verständnis endet häufig in der mikroskopischen, bisweilen sogar in der makroskopischen Ebene, wie im Fall des Reinke-Ödems, bei dem eine Blickdiagnose in den allermeisten Fällen zwar ausreichend ist, die genauen Krankheitsmechanismen aber im Dunkeln liegen. Die zellulären Prozesse, die in den SL nach einer Verletzung (Intubation, Operationen), durch Nikotinabusus oder Stimmmissbrauch ablaufen, sind beim Menschen beispielsweise weitgehend unbekannt.

Ein Grund für die unzureichende Wissenslage besteht in der besonderen anatomischen Lage und Struktur der SL(-Mukosa) selbst: Die funktionell wichtige Pars membranacea (der „schwingende Teil“) ist nur etwa 1,6 bzw. 1,2 cm lang (beim Mann bzw. bei der Frau) und kann aus ethischen Gründen nicht für wissenschaftliche

Fragestellungen biopsiert werden, da jede Biopsie das Risiko einer permanenten Schleimhautvernarbung in sich trägt. Ebenso sind Nachkontrollen nach Interventionen auf lupenlaryngoskopische Untersuchungen oder auf indirekte Parameter, wie Stimmanalysen oder subjektive Scores (z. B. Voice Handicap Index, VHI; Stimmstörungsindex, SSI; usw.), begrenzt.

Die dargestellten Schwierigkeiten führten dazu, dass wichtige Fragen der SL-Biologie und zugehörigen Pathophysiologie unerforscht sind. Somit bleibt eine Reihe von fundamentalen physiologischen und pathophysiologischen Fragen offen, wie etwa die Interaktionen Epithel – Lamina propria, die Auswirkungen von Allergien auf die SL, die Rolle von Stimmruhe/-aktivierung nach SL-Operationen, der Einfluss von Hormonen u. v. a. m. In letzter Konsequenz bedeutet dies aber auch, dass einige benigne Erkrankungen der SL nicht kausal therapierbar sind.

Es gibt nur wenige Arbeitsgruppen, die sich mit molekularen Fragestellungen in menschlichen SL befassen, darunter Verdolini et al., die Sekretabstriche von SL nach Stimmbelastung durchführten und auswerteten [2]. Sie wiesen im Sekret erhöhte Spiegel inflammatorischer Zytokine nach. Gleichzeitig betonen die Autoren auch die Schwierigkeit in der Methode der Probengewinnung, was sich auch in der niedrigen Probandenzahl niederschlug ($n = 3$). Die SL der Probanden mussten oberflächenanästhesiert werden, was zudem zu einer Verdünnung des gewonnenen Sekrets führte und die Auswertung erschwerte. Gleichzeitig kann aus dem gewonnenen Sekret

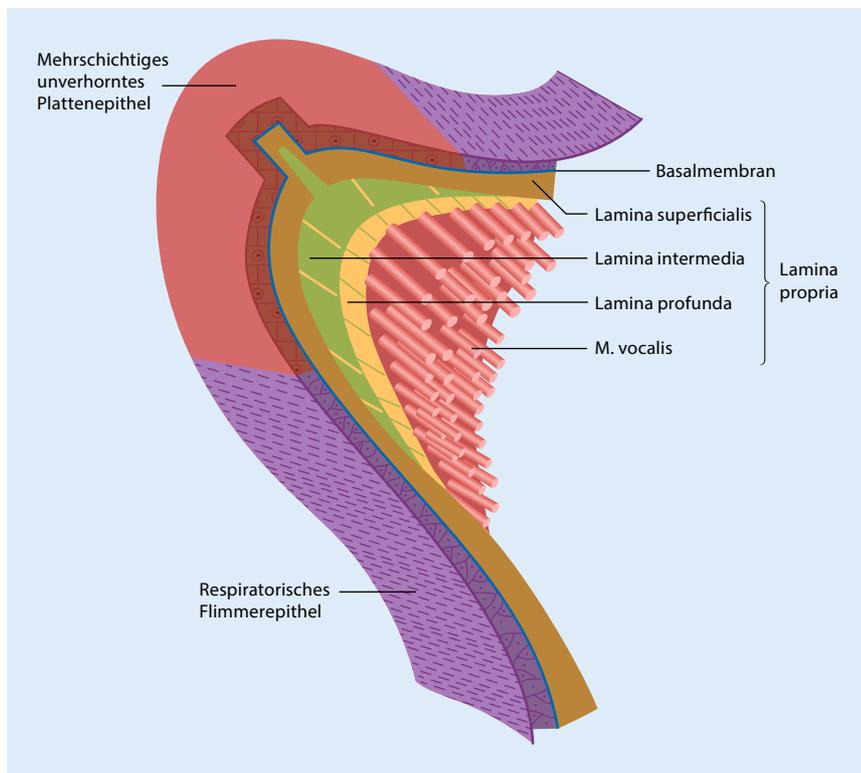


Abb. 1 ▲ Schematischer Aufbau der Stimmlippe. (Mod. nach [42, 43])

nicht die Frage geklärt werden, ob die freigesetzten Zytokine vom Epithel oder der Lamina propria ausgingen.

Alternative Modelle

Alternativen, sich diesen Fragestellungen anzunähern, sind Zellkulturmodelle und Tiermodelle. Bereits in den frühen 2000er-Jahren gab es eine Vielzahl an Publikationen in dem Bereich, aus welchen auch wichtige Erkenntnisse über Zellfunktionen gewonnen wurden [3–7].

» Alternativen, sich diesen Fragestellungen anzunähern, sind Zellkulturmodelle und Tiermodelle

Einschränkend muss hier erwähnt werden, dass sich die Forschung hauptsächlich auf SL-Fibroblasten, als wichtigstem Zelltyp der Lamina propria fokussierten. Der Grund, warum das humane SL-Epithel schlechter erforscht ist, liegt in der Tatsache begründet, dass es ungleich schwieriger ist, dieses zu gewinnen, zu

isolieren und zu kultivieren. Bis dato gibt es auch nur wenige Arbeiten, die sich mit dem Grenzgebiet zwischen Lamina propria und Epithel beschäftigen [8, 9].

Eine Vielzahl von Studien befasste sich im Tiermodell (meistens Ratten) mit Inflammationsprozessen nach chirurgisch induzierten Verletzungen [6, 10–14]. Obwohl diese Prozesse teilweise gut erforscht sind, gibt es darauf aufbauend jedoch keine Therapien für Anwendungen beim Menschen. Prinzipiell geht das Bestreben in den letzten Jahren hin zur Vermeidung von Tierversuchen.

Mikroanatomie und Mikrophysiologie

Abseits der bekannten Literatur zur SL-Anatomie gehen die Autor(inn)en auf weniger bekannte Aspekte in der Mikroanatomie ein, die funktionell eine wichtige Rolle spielen. Danach werden einige bekannte Krankheitsbilder (Reinke-Ödem, SL-Narbe) erörtert und diese unter dem Blickwinkel molekularer Mechanismen neu betrachtet (Abb. 1).

Unter dem Begriff der SL-Mukosa, also der Schleimhaut, werden das Epithel,

die Basalmembran und alle 3 Schichten der Lamina propria zusammengefasst [15, 16]. Diese liegt dem M. vocalis als oberflächlichem Anteil des M. thyroarytaenoideus auf. Minoru Hirano publizierte 1974 erstmals die mittlerweile berühmte Body-Cover-Theorie der SL-Schwingung [17]. Dabei beschrieb er den einzigartigen morphologischen Aufbau der SL und entwickelte ein biomechanisches Modell, indem er sie funktionell in „body“ (M. vocalis und Lig. vocale) und „cover“ (Lamina superficialis, Basalmembran und Epithel) einteilte und darin die SL-Funktion als „double-structured vibrator“ beschrieb.

Epithel

Im Gegensatz zum einschichtigen respiratorischen Epithel des restlichen Atemwegs sind die SL von einem mehrschichtigen unverhornten Plattenepithel überzogen, das über interzelluläre Kontakte eng miteinander verbunden ist, damit es der mechanischen Belastung während der Phonation standhält (Abb. 2). Die Integrität der Zellverbindungen ist zudem auch für die Absorption und Sekretion von Ionen und somit für die Zusammensetzung der epithelbedeckenden Schleimschicht unverzichtbar. Dieser Schleim ist eine wichtige Barriere gegen biologische und chemische Noxen und spielt eine wichtige Rolle in der Befeuchtung der SL.

» Die Furchen und Falten der luminalen Oberfläche des Epithels erleichtern die Randkantenverschiebung

Bei der mikroskopischen Betrachtung der luminalen Oberfläche des Epithels fällt auf, dass diese nicht, wie die makroskopische Untersuchung vermuten würde, völlig glatt ist, sondern viele kleine Furchen und Falten aufweist. Diese erleichtern einerseits die Randkantenverschiebung während der Stimmbildung und ermöglichen andererseits eine bessere Haftung des Schleimteppichs [18–20].

Hier steht eine Anzeige.



Basalmembran

Relativ wenig Beachtung findet die Basalmembran, der aber als stabilisierender Struktur zwischen SL-Epithel und darunter liegender Lamina propria eine wichtige Rolle zukommt. „Anchoring fibers“ (bestehend aus Kollagen Typ IV) sorgen für eine Verankerung zwischen Epithel und Lamina propria. Die Anzahl dieser „anchoring fibers“ ist abhängig von der Lokalisation, so ist sie in der Pars membranacea höher als an anderen Stellen [15]. Gray, der als Erstbeschreiber dieser Fasern gilt, postulierte zudem einen genetischen Einfluss auf die Faserdichte, was unterschiedliche Anfälligkeiten (beispielsweise für organische SL-Veränderungen) auf Vibrationsstress erklären könnte.

Lamina propria

Der schichtweise Aufbau der SL-Mukosa spielt funktionell eine wesentliche Rolle und besteht aus zellulären und extrazellulären Komponenten. Bekannterweise besteht die menschliche Lamina propria aus 3 Schichten (Lamina superficialis – intermedia – profunda), wobei die „Festigkeit“ von luminal nach basal graduell zunimmt. Der wichtigste zelluläre Bestandteil ist der SL-Fibroblast (SLF; **Abb. 3**). Dieser spielt eine zentrale Rolle in der Produktion von Extrazellulärmatrix(ECM)-Bestandteilen wie Hyaluronsäure, verschiedenen Typen von Kollagenen, elastischen Fasern, Fibronectin u.v.a.m. Die Schwingungseigenschaften gesunder SL hängen entscheidend von der Homöostase der ECM-Bestandteile und dem Gleichgewicht zwischen Synthese und Degradation ab. Einer erheblichen Zugbelastung während der Phonation sind insbesondere das vordere und hintere Ende der SL, die Maculae flavae, ausgesetzt. Ebenfalls befindet sich ein spezieller Subtyp der SLF, die sog. sternförmigen Zellen („stellatae cells“) [21, 22]. Unter diesen befindet sich ein hoher Anteil an Stammzellen, die nach einer SL-Verletzung aktiviert werden und migrieren sowie an der Entzündungsreaktion beteiligt sind [23]. Bei Säuglingen ist die Dreischichtigkeit der Lamina propria

HNO 2021 · 69:695–704 <https://doi.org/10.1007/s00106-021-01016-1>
© Der/die Autor(en) 2021

M. Gugatschka · T. Grossmann · D. Hortobagyi

Molekulare Laryngologie. Ein neues Kapitel im Verständnis laryngealer Erkrankungen

Zusammenfassung

Hintergrund. Trotz erheblicher Fortschritte in der laryngologischen Forschung gibt es eine Reihe von (benignen) Stimmlippenerkrankungen, die kausal nicht therapierbar sind. Das liegt an der eingeschränkten Zugänglichkeit sowie der sensiblen Mikroarchitektur der Stimmlippen, die nicht auf zellulärer Ebene erforscht werden können. Das pathophysiologische Verständnis endet dadurch häufig in der makroskopischen Ebene, die Folgen von Interventionen werden großteils endoskopisch oder mit indirekten Methoden evaluiert.

Fragstellung. Im nachfolgenden Beitrag stellen die Autor(inn)en biotechnologische State-of-the-Art-Methoden vor, die in der laryngologischen Forschung Anwendung finden, verbunden mit praktischen Beispielen.

Ergebnisse. Tierversuche und Zellkultur-experimente haben in den letzten Jahren zu einer signifikanten Wissenserweiterung beigetragen, dies insbesondere in den Bereichen Stimmlippeninflammation und -narbenbildung. Dem Stimmlippenfibroblasten, als wichtigstem zellulärem Bestandteil

der Lamina propria, kommt dabei eine zentrale Rolle zu.

Schlussfolgerungen. Mittlerweile besteht bei einigen Krankheitsbildern ein tieferes Verständnis von Makroanatomie und Makropathophysiologie als je zuvor. In-vitro-Versuche zeigten beispielsweise, dass Stimmlippenfibroblasten in einem inflammatorischen Setting weniger profibrotische und proinflammatorische Zytokine sezernieren, wenn sie Vibrationen ausgesetzt sind. Umgesetzt auf die Klinik könnte das bedeuten, dass eine frühe Stimmaktivierung nach operativen Eingriffen an den Stimmlippen zu besserer Heilung und besseren stimmlichen Ergebnissen führt. Unsere Vision lautet, dass die molekulare Laryngologie ein gesichertes Fundament an Wissen bereitstellen soll, auf das in weiterer Folge klinische Studien aufgebaut werden können.

Schlüsselwörter

Fibroblasten · Bioreaktoren · Stimmlippen · M. vocalis · Larynxschleimhaut

Molecular laryngology. A new chapter in the understanding of laryngeal diseases

Abstract

Background. Despite considerable advances in laryngological research, there is still a plethora of (benign) vocal fold pathologies that cannot be treated causally. This is due to the limited accessibility and sensitive microarchitecture of the vocal folds, which cannot be investigated at a cellular level. Consequently, current pathophysiological knowledge is frequently based on macroscopic findings. The impact of interventions is mainly evaluated endoscopically or via indirect diagnostic methods.

Objective. The aim of this article is to discuss state-of-the-art biotechnological methods used in laryngological research, illustrated by practical examples.

Results. In recent years, animal and in vitro experiments have significantly contributed to a continuous expansion of knowledge in this field, particularly regarding vocal fold inflammation and scar formation. Vocal

fold fibroblasts, the most important cellular component of the lamina propria, can be accredited a central role in these processes. **Conclusion.** Our knowledge regarding macroanatomy and macropathophysiology of several pathologies has increased considerably in recent years. In vitro trials have shown, e.g., that vocal fold fibroblasts in an inflammatory setting secrete less profibrotic and proinflammatory cytokines when exposed to vibration. Early vocal exercises after surgical interventions on the vocal folds may therefore promote better wound healing and consequently improved phonation. Research in molecular laryngology should create a solid basis of knowledge for subsequent clinical studies.

Keywords

Fibroblasts · Bioreactors · Vocal cords · Vocal muscle · Laryngeal mucosa

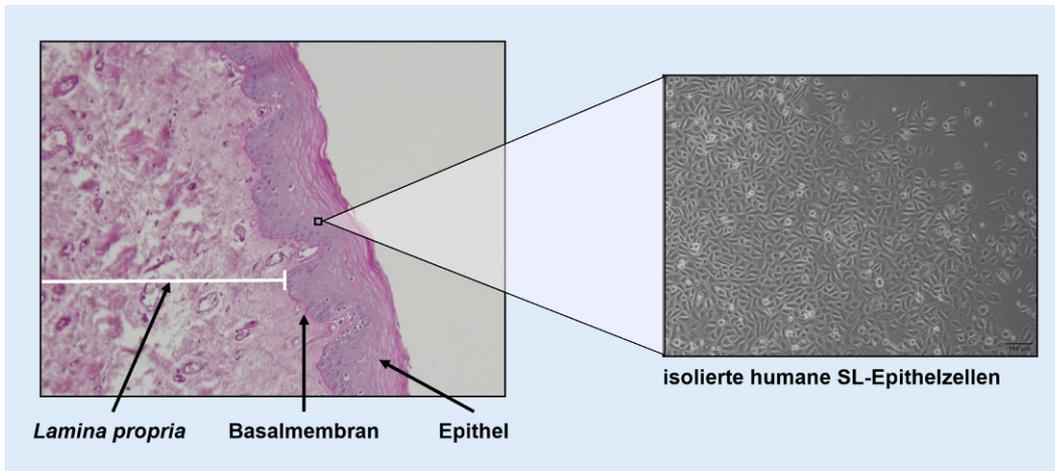


Abb. 2 ◀ Histologischer Aufbau einer humanen Stimmlippe (Perjodsäure-Alcianblau-Färbung, Vergr. 10:1) mit lichtmikroskopischer Aufnahme von isolierten Epithelzellen. SL Stimmlippen

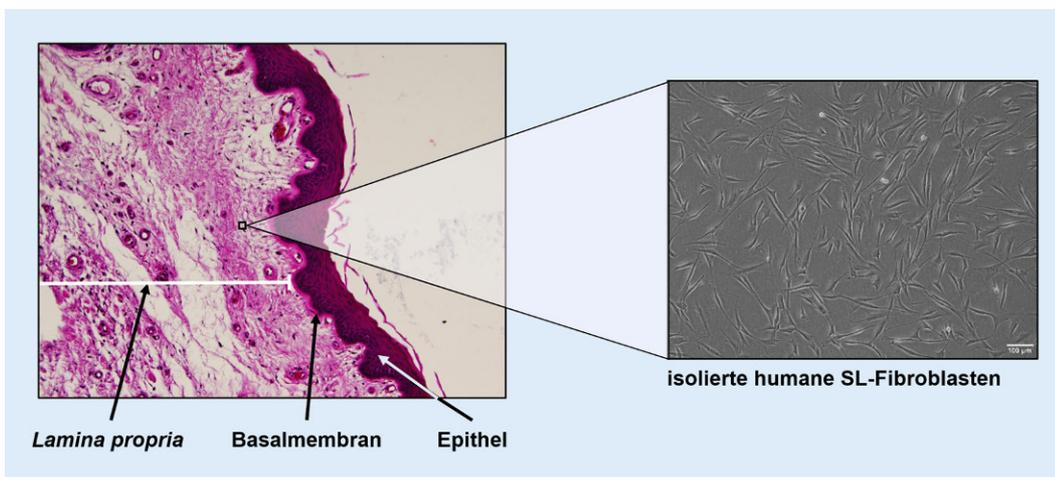


Abb. 3 ◀ Histologischer Aufbau einer humanen Stimmlippe (Hämatoxylin-Eosin-Färbung, Vergr. 10:1) mit lichtmikroskopischer Aufnahme von isolierten Fibroblasten. SL Stimmlippen

noch nicht ausgebildet. Bisher ist noch nicht endgültig geklärt, wie die unterschiedliche Zusammensetzung der ECM entsteht, eine regelmäßige Phonation scheint jedoch eine wesentliche Rolle zu spielen. Es wird vermutet, dass die Kräfte während der Stimmbildung je nach Lokalisation unterschiedlich stark auf die SLF einwirken. Diese Reize bewirken, dass beispielsweise Kollagen in unterschiedlichen Konzentrationen produziert wird [24].

M. vocalis

Die tiefste Schicht der SL bildet der M. vocalis. Er wird als oberes, freies Ende des M. thyroarytaenoideus angesehen. Bei genauerer histologischer Betrachtung fällt eine besonders hohe Dichte an Muskelspindeln auf. Diese verfügen über spezielle Rezeptoren, die die aktuelle Dehnung des Muskels erfassen.

Das ist ein deutlicher Hinweis dafür, dass er nicht nur als statisches Fundament zu betrachten ist, sondern für die Feinregulation der SL-Spannung und somit der Tonhöhe mitverantwortlich ist [25, 26].

Mikrophysiologie/ Pathophysiologie

Der Wissensstand über die zellulären Vorgänge nach einer SL-Verletzung (vornehmlich die SLF betreffend) im Tiermodell ist gut. Einschränkend muss erwähnt werden, dass oft eine genauere Differenzierung der Inflammation nicht möglich ist, d. h., es ist nicht zuordenbar, ob die Herauf-/Herunterregulationen von bestimmten Zytokinen auf SL-Epithelzellen, SL-Fibroblasten oder ortsständige Makrophagen zurückzuführen sind.

Mikroanatomie und Mikrophysiologie sind die Schlüssel im Verständnis zur molekularen Laryngologie. Welham et al. zeigten im Tierversuch, dass es eine bzw. 4 h nach einer SL-Verletzung zu einem Anstieg bestimmter proinflammatorischer und profibrotischer Faktoren kommt [10]. Dazu zählen unter anderem Cyclooxygenase-2 (COX-2), Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α), Interleukin-1beta (IL-1 β). Einige dieser Faktoren decken sich mit jenen aus der zuvor zitierten Humanstudie, bei der nach Stimmbelastung Abstriche von den SL gewonnen wurden [2]. Es erscheint auch plausibel, dass sich Faktoren nach SL-Verletzung (beispielsweise Operationen, Intubation) und Stimmbelastung zwar quantitativ, aber nicht qualitativ unterscheiden.

Besonders interessant erscheint die Fragestellung, warum manche SL-Verletzungen folgenlos ausheilen, während

andere mit einer Narbenbildung einhergehen. Zwar ist die Wahrscheinlichkeit naturgemäß von der Größe der Läsion/Resektion abhängig, es spielen aber auch andere Faktoren eine Rolle. Es ist bekannt, dass sich nach einer Verletzung SL-Fibroblasten in sog. Myofibroblasten oder Narbenfibroblasten differenzieren, die ein anderes Profil an Genen und Proteinen exprimieren. Dass von diesen Zellen u. a. mehr Kollagen und weniger Hyaluronsäure produziert wird, ist das morphologische Korrelat der SL-Narbe [27]. Ergebnisse der In-vitro-Versuche der Autor(inn)en zeigten, dass eine unmittelbare mechanische Aktivierung nach inflammatorischem Stimulus zu einer niedrigeren Expression inflammatorischer und fibrotischer Gene führten [28]. Auch Geschlechtsunterschiede in der ECM-Komposition stehen im Verdacht, Auswirkungen auf die Häufigkeit von SL-Veränderungen zu haben: Die Lamina propria von Männern weist mehr Hyaluronsäure als die von Frauen auf, wodurch ein stärkerer Schutz vor Phonotraumen ausgehen könnte [29]. Dies erklärt nach Meinung der Autoren die niedrigere Prävalenz von Phonotraumata bei Männern im Vergleich zu Frauen.

Spezifische Krankheitsbilder

Reinke-Ödem

Das Reinke-Ödem ist in den allermeisten Fällen eine Blickdiagnose in der phoniatrich-laryngologischen Praxis. Typischerweise sind Frauen um das 50. Lebensjahr betroffen, die zudem eine Raucheranamnese aufweisen und häufig (berufliche) Vielsprecher sind. Das lupenlaryngoskopische Bild ist gekennzeichnet durch voluminöse SL mit ektatischen und varikösen Blutgefäßen, die durch die Mukosa durchschimmern. Die Anamnese führte zur Annahme, dass sowohl Nikotinabusus als auch hormonelle Ursachen an der Pathogenese beteiligt sein könnten. Bei genauer Betrachtung zeigt sich jedoch, dass viele Annahmen nicht evidenz-, sondern nur fallbasiert sind, weswegen viele Fragen offenbleiben: Was ist beispielsweise die genaue Rolle der (Geschlechts-)Hormone in der Entstehung des Reinke-Ödems, und welche Fol-

gen hat eine Hormonersatztherapie auf die Stimme? Gibt es eine Überrepräsentation von Frauen, nur weil diese eher die Sprechstunde aufsuchen und eine tiefere Stimme Männer nicht so sehr stört (und sogar als angenehm, weil sehr männlich, empfunden wird)?

Die meisten Studien berichten von einer Überrepräsentation von weiblichen Patientinnen, es gibt aber auch Ausnahmen wie Kravos et al., die ein großes Kollektiv von 56 Männern mit Reinke-Ödem beschreiben [30]. Der Einfluss von Zigarettenrauch gilt als gesichert, selbst wenn die Pathomechanismen bisher unklar sind. Schwierig wird es, die einzelnen additiven Effekte der Konoxen zu quantifizieren: Wie ist die Rolle des laryngopharyngealen Refluxes (LPR) einzuschätzen, der von einigen Autoren als „erwiesen“ angesehen wird, von anderen aber nicht [31]? Welchen zusätzlichen Einfluss hat die Stimmbelastung auf die Pathogenese?

» Im Bioreaktor zeigte sich die vermehrte Expression einiger Gene nur bei Vibration und Zigarettenrauch

Das Wissen über die zellulären Mechanismen im Fall des Reinke-Ödems ist gering. Manche Autoren postulieren eine proangiogenetische Achse in der Pathogenese, dazu passen Beschreibungen von Sato et al., die in entsprechenden Histologiepräparaten VEGF („vascular endothelial growth factor“) in ortsständigen Makrophagen immunhistochemisch nachweisen konnten [4]. Elektronenmikroskopische Untersuchungen derselben Gruppe beschreiben fenestrierte und lückenhafte Gefäße (vibrationsbedingt?), die wohl Hauptursache für das Ödem sein dürften [4]. Duflo et al. führten Micro-Array-Analysen u. a. an Reinke-Ödem-Proben durch, jedoch fehlte es in der Studie an Kontrollproben, d. h. es wurden Reinke-Ödem-Proben mit Proben aus SL-Polypen verglichen [32]. In den Ergebnissen beschrieben sie, dass in Reinke-Ödem-Proben antioxidative Gene hochreguliert waren (was in Hinblick auf den oxidativen Stress, verursacht durch Nikotinabusus, nicht

verwundert), aber sie erwähnten auch, dass kollagenassoziierte Gene vermindert exprimiert wurden.

Die eigenen Experimente der Autor(inn)en an humanen SLF bestätigen diese Ergebnisse, zusätzlich stellten die Autor(inn)en eine signifikante Hochregulation der Hyaluronsäureproduktion (womöglich als protektiver Mechanismus) fest [33]. Die Verringerung des Kollagengerüsts in der Lamina propria, gepaart mit mehr Hyaluronsäure, kann demzufolge als zusätzlicher Faktor in der Ödementstehung gesehen werden. Eine rezente Studie der Arbeitsgruppe der Autor(inn)en ergab unter Verwendung eines von der Arbeitsgruppe entwickelten phonomimetischen Bioreaktors, dass einige Gene im Zusammenhang mit dem Reinke-Ödem nur durch eine Kombination von Vibration und Zigarettenrauch vermehrt exprimiert wurden (v. a. gefäßaktive VEGF). Eine Stimulation mit nur einem der beiden führte zu keiner signifikanten Veränderung. Gleichzeitig wurden durch Zigarettenrauch getriggerte hohe COX-2-Spiegel durch zusätzliche Vibration herunterreguliert [34].

Stimmlippennarben

Ein- oder beidseitige SL-Narben gehen mit erheblichen Funktionseinbußen einher, die sich klinisch als Heiserkeit und rasche Stimmmüdigkeit manifestieren. SL-Narben gehen, wie erwähnt, auf mikroskopischer Ebene mit einer Differenzierung der SLF in sog. Myofibroblasten/Narbenfibroblasten einher. Diese unterscheiden sich nicht nur phänotypisch von normalen SLF, sondern produzieren auch ein anderes Muster an ECM-Bestandteilen.

Als Konsequenz findet sich in vernarbten SL überschüssiges Kollagen, das nicht mehr parallel zum freien SL-Rand liegt, sowie reduzierte Anteile an Elastin und Hyaluronsäure. Dies führt zu einer Verschlechterung der viskoelastischen Eigenschaften und in weiterer Folge zu einem unregelmäßigen Schwingungsablauf während der Phonation. Offenbar spielt das Alter, in dem eine Verletzung auftritt, eine wichtige Rolle, wie die eigenen Versuche der Autor(inn)en zeigten. Myofibroblasten jüngerer Ver-

Hier steht eine Anzeige.





Abb. 4 ◀ Phonomimetischer Bioreaktor

suchstiere produzierten auch 3 Monate nach initialem Trauma höhere (narbenprotektive) Hyaluronsäurespiegel als mittelalte Tiere [35]. Gleichzeitig sprechen die Myofibroblasten jüngerer Tiere stärker auf das antifibrotische Zytokin „hepatocyte growth factor“ (HGF) an als die Zellen älterer Tiere [36].

» In vernarbten SL findet sich überschüssiges Kollagen, das nicht mehr parallel zum freien SL-Rand liegt

In den letzten Jahren gab es immer wieder Versuche, bei denen verschiedene Arten von Stammzellen auch im humanen Setting in SL injiziert wurden. Die Ergebnisse waren, ebenso wie die Krankheitsbilder, sehr variabel und wurden nicht immer mit objektiven Parametern gemessen [37, 38]. Zudem stellt sich die prinzipielle Frage, ob Stammzellen es tatsächlich vermögen, die ursprüngliche Gewebsstruktur inkl. Schichtung der Lamina propria wiederherzustellen. Stammzellen produzieren eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren und Zytokinen, und es bedarf einer sorgfältigen Risikoabschätzung, diese in SL zu injizieren. Wenn es nur darum geht, die SL-Narbe „weicher“ und somit schwingungsfähiger zu machen, wären einzelne Faktoren in Betracht zu ziehen (wie beispielsweise HGF) und nicht ein „Cocktail“ verschiedener Wirkstoffe in unbekanntem Dosierungen, wie sie von Stammzellen sezerniert werden. Die Gruppe um D. Chhetri publizierte bereits 2011 eine Studie, in der durch die Injektion von autologen Fibroblasten in vernarbte SL eine Verbesserung der Schwin-

gungseigenschaften eintrat [39]. Dieser Ansatz wurde jedoch in der Community nicht aufgegriffen, und es wurden, wie erwähnt, vermehrt Stammzellen für die Versuche herangezogen.

Insgesamt wären also auch im Bereich der SL-Narben kausale Therapieoptionen wünschenswert, beispielsweise ein vollständiger autologer Gewebersatz, wie es die Gruppe um Nathan Welham ansatzweise publizierte [9]. Einen sehr innovativen, aber noch nicht umsetzbaren Ansatz publizierten Kishimoto et al., die sich das Prinzip des „genome editing“ zunutze machten. Dieses basiert auf dem punktgenauen und gezielten Herausschneiden und Ersetzen von Gensequenzen mithilfe von „Genschere“. Im Rahmen ihrer Versuche induzierten sie SL-Narben bei Ratten und injizierten anschließend lokal einen siRNA (Small-Interfering-RNA)-Liposom-Komplex. Dieser Komplex soll die Expression von SERPINH-1, eines Proteins, das für die Faltung von Kollagen verantwortlich ist, unterdrücken. Sie konnten zeigen, dass so die mit der Vernarbung assoziierte Kollagenakkumulation der SL signifikant geringer ausfiel und sich somit positiv auf die Wundheilung auswirkte [40].

Ausblick

In den letzten Jahren hat sich das Wissen um zelluläre Prozesse in den SL erheblich erweitert. Es muss das langfristige Ziel sein, diese Erkenntnisse auch in den klinischen Alltag zu integrieren und auf der Basis des Wissens kausale Therapieformen zu etablieren. Dies sollte die Verwendung einzelner Faktoren, aber auch die Züchtung von Mu-

kosatransplantaten beinhalten. Die Vision im ersten Fall könnte lauten, Substanzen zu entwickeln (beispielsweise im Fall des Reinke-Ödems), die dann „office-based“ in die SL injiziert werden könnten. Die Züchtung eines autologen Mukosatransplantats wäre ein Durchbruch in der Behandlung von SL-Narben. Auch die Entwicklung spezifischer biokompatibler Gele, die als Träger für Zellen und Wirkstoffe dienen, ist ein möglicher und klinisch gut vorstellbarer Weg. Die Aufgabe solcher Gele wäre es sicherzustellen, dass die Wirksubstanzen möglichst lange am Ort der Applikation bleiben.

Die Arbeitsgruppe der Autor(innen) hat in den letzten Jahren Protokolle entwickelt, mit welchen sie Epithelzellen und Fibroblasten aus laryngealer Mukosa isolieren, charakterisieren und kultivieren kann [28, 33, 41]. Ein weiterer wesentlicher Fortschritt war die Entwicklung geeigneter Zellkulturapparate, die die SL-Vibrationen auch unter Kulturbedingungen applizieren können. Dies ist essenziell, da man weiß, dass SLF unter statischen Bedingungen, d. h. ohne Vibration, dedifferenzieren. Sie verlieren mit der Zeit ihre ortsspezifischen Qualitäten und entwickeln sich in Richtung „normaler“ Fibroblasten [1].

» Weltweit gibt es etwa 6 verschiedene Prototypen für derartige „Bioreaktoren“

Weltweit gibt es etwa 6 verschiedene Prototypen für derartige „Bioreaktoren“, wobei keiner davon kommerziell erhältlich ist. Die Gruppe der Autor(innen) hat in den letzten Jahren einen derartigen „phonomimetischen“ Bioreaktor entwickelt und führt damit bereits Experimente zu verschiedenen Fragestellungen durch [28, 34, 41]. Der Vorteil des Prototypen der Autor(innen) besteht darin, dass er aus kommerziell erhältlichen Einzelteilen besteht und deswegen relativ leicht von anderen Gruppen nachgebaut werden kann. (◻ Abb. 4) Zudem können die Autor(innen) die kultivierten SLF mit jeder beliebigen Frequenz anregen, was das Gerät einzigartig macht. Derzeit laufen Bemühungen, diesen Bioreaktor auch für dynamische Kokulturen (Epi-

thelzellen und Fibroblasten) im 3-D-Setting zu etablieren. Ein solches organotypisches Modell wäre in vielen Eigenschaften mit nativer Larynxmukosa vergleichbar und könnte für eine Vielzahl physiologischer und pathophysiologischer Fragestellungen herangezogen werden. Zudem könnten derart Medikamente einfach und schnell in vitro getestet werden.

Zu den wichtigsten Arbeiten der letzten Jahre im Gebiet der SL-Biologie zählt zweifelsohne die zitierte Studie der Gruppe um Nathan Welham [9]. Die Gruppe kokultivierte humane Epithelzellen und SLF und stellte fest, dass sich nach 14 Tagen eine Basalmembran herausgebildet hatte. Die derart gezüchteten Mukosakonstrukte testeten sie histologisch, proteomisch, immunologisch und hinsichtlich mechanischer Belastbarkeit. Die Ergebnisse zeigten, dass die gezüchtete Mukosa in vielerlei Hinsicht große Ähnlichkeit mit nativer humaner Mukosa hatte, zudem ein niedriges immunologisches Profil aufwies und über bessere Schwingungseigenschaften verfügte als orale Mukosa. Die Arbeit stellt einen bedeutenden Schritt im Bereich des laryngealen Tissue-Engineerings dar und gibt berechtigten Grund zur Hoffnung, dass eines Tages autologe Mukosakonstrukte als Gewebersatz zur Verfügung stehen könnten.

Auch pluripotente Stammzellen haben bereits Eingang in die SL-Forschung gefunden. Epithelzellen sind, wie erwähnt, ein schwer zu isolierender Zelltyp, weswegen die Gruppe um Susan Thibeault Stammzellen in Epithelzellen transformierte: Sie kultivierten iPS („induced pluripotent stem cells“) zusammen mit Fibroblasten und stellten fest, dass diese nach 4 Wochen auf genetischer Ebene ihre pluripotenten Merkmale verloren hatten und gleichzeitig für Epithelzellen spezifische Proteine (Keratin 13 und 14) produzierten. Auch diese Studie ist ein wichtiger Schritt in Richtung des autologen Gewebersatzes [8].

Fazit für die Praxis

- Die Schleimhaut der menschlichen Stimm lippen (SL) kann nicht

für wissenschaftliche Fragestellungen biopsiert werden, da jede Biopsie das Risiko einer permanenten Schleimhautvernarbung in sich trägt.

- Das erschwert das pathophysiologische Verständnis der SL-Erkrankungen.
- Funktionell wichtig ist Pars membranacea, sie ist beim Mann etwa 1,6 und bei der Frau etwa 1,2 cm lang.
- Die Furchen und Falten der luminalen Oberfläche des Epithels erleichtern die Randkantenverschiebung
- Funktionseinbußen bei SL-Narben zeigen sich als Heiserkeit und rasche Stimmermüdung.
- In Narben differenzieren die SL-Fibroblasten in sog. Myofibroblasten/Narbenfibroblasten.
- Offenbar spielt das Alter, in dem eine Verletzung der SL auftritt, eine wichtige Rolle für die Regeneration.
- In Proben aus Reinke-Ödemen waren antioxidative Gene hochreguliert und kollagenassoziierte Gene vermindert exprimiert.
- Die Verringerung des Kollagengerüsts in der Lamina propria kann ein zusätzlicher Faktor in der Ödementstehung sein.
- Versuche mit unserem phonomimetischen Bioreaktor zeigen, dass Vibration im Anschluss an einen inflammatorischen Stimulus zu verringerter Expression von inflammatorischen und fibrotischen Zytokinen führt. Dies könnte ein Hinweis sein, dass frühe Stimmaktivierung im Anschluss an Stimmlippen-OPs den Heilungsverlauf positiv beeinflusst.

Korrespondenzadresse

Univ. Prof. PD Dr. med. univ. et scient. med. M. Gugatschka

Klinische Abteilung für Phoniatrie, Hals-Nasen-Ohren-Universitätsklinik, Medizinische Universität Graz
Auenbruggerplatz 26, 8036 Graz, Österreich
markus.gugatschka@medunigraz.at

Funding. Open access funding provided by Medical University of Graz.

Einhaltung ethischer Richtlinien

Interessenkonflikt. M. Gugatschka, T. Grossmann und D. Hortobagyi geben an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Alle Studien sind von der lokalen Ethikkommission der Medizinischen Universität Graz genehmigt und entsprechen der Deklaration von Helsinki.

Open Access. Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden.

Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen.

Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Literatur

1. Titze IR, Hitchcock RW, Broadhead K et al (2004) Design and validation of a bioreactor for engineering vocal fold tissues under combined tensile and vibrational stresses. *J Biomech* 37(10):1521–1529
2. Verdolini Abbott K, Li NY, Branski RC et al (2012) Vocal exercise may attenuate acute vocal fold inflammation. *J Voice* 26(6):814.e1–814.13
3. Hirano S, Bless DM, Heisey D, Ford CN (2003) Effect of growth factors on hyaluronan production by canine vocal fold fibroblasts. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 112(7):617–624
4. Sato K, Hirano M, Nakashima T (1999) Electron microscopic and immunohistochemical investigation of reinke's edema. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 108(11 Pt 1):1068–1072
5. Hirano S, Bless DM, Rousseau B, Welham N, Scheidt T, Ford CN (2003) Fibronectin and adhesion molecules on canine scarred vocal folds. *Laryngoscope* 113(6):966–972
6. Ohno T, Hirano S, Rousseau B (2009) Gene expression of transforming growth factor-beta1 and hepatocyte growth factor during wound healing of injured rat vocal fold. *Laryngoscope* 119(4):806–810
7. Hirano S, Thibeault S, Bless DM, Ford CN, Kanemaru S (2002) Hepatocyte growth factor and its receptor c-met in rat and rabbit vocal folds. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 111(8):661–666
8. Lungova V, Chen X, Wang Z, Kendziorski C, Thibeault SL (2019) Human induced pluripotent stem cell-derived vocal fold mucosa mimics development and responses to smoke exposure. *Nat Commun* 10(1):4161

9. Ling C, Li Q, Brown ME et al (2015) Bioengineered vocal fold mucosa for voice restoration. *Sci Transl Med* 7(314):314ra187
10. Welham NV, Lim X, Tateya I, Bless DM (2008) Inflammatory factor profiles one hour following vocal fold injury. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 117(2):145–152
11. Tateya T, Tateya I, Sohn JH, Bless DM (2005) Histologic characterization of rat vocal fold scarring. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 114(3):183–191
12. Tateya I, Tateya T, Lim X, Sohn JH, Bless DM (2006) Cell production in injured vocal folds: A rat study. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 115(2):135–143
13. Tateya T, Tateya I, Sohn JH, Bless DM (2006) Histological study of acute vocal fold injury in a rat model. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 115(4):285–292
14. Welham NV, Montequin DW, Tateya I, Tateya T, Choi SH, Bless DM (2009) A rat excised larynx model of vocal fold scar. *J Speech Lang Hear Res* 52(4):1008–1020
15. Gray SD, Pignatari SS, Harding P (1994) Morphologic ultrastructure of anchoring fibers in normal vocal fold basement membrane zone. *J Voice* 8(1):48–52
16. Gray SD (2000) Cellular physiology of the vocal folds. *Otolaryngol Clin North Am* 33(4):679–698
17. Hirano M (1974) Morphological structure of the vocal cord as a vibrator and its variations. *Folia Phoniatr* 26(2):89–94
18. Gray SD, Titze IR, Alipour F, Hammond TH (2000) Biomechanical and histologic observations of vocal fold fibrous proteins. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 109(1):77–85
19. Gray SD, Titze IR, Chan R, Hammond TH (1999) Vocal fold proteoglycans and their influence on biomechanics. *Laryngoscope* 109(6):845–854
20. Catten M, Gray SD, Hammond TH, Zhou R, Hammond E (1998) Analysis of cellular location and concentration in vocal fold lamina propria. *Otolaryngol Head Neck Surg* 118(5):663–667
21. Sato K, Hirano M, Nakashima T (2000) Comparative histology of the maculae flavae of the vocal folds. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 109(2):136–140
22. Sato K, Hirano M, Nakashima T (2003) 3D structure of the macula flava in the human vocal fold. *Acta Otolaryngol* 123(2):269–273
23. Gugatschka M, Kojima T, Ohno S, Kanemaru S, Hirano S (2011) Recruitment patterns of side population cells during wound healing in rat vocal folds. *Laryngoscope* 121(8):1662–1667
24. Li NY, Heris HK, Mongeau L (2013) Current understanding and future directions for vocal fold mechanobiology. *J Cytol Mol Biol*. <https://doi.org/10.13188/2325-4653.1000001>
25. Sanders I, Rai S, Han Y, Biller HF (1998) Human vocalis contains distinct superior and inferior subcompartments: possible candidates for the two masses of vocal fold vibration. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 107(10 Pt 1):826–833
26. Martins RH, Pessin BAB, Nassib DJ, Branco A, Rodrigues SA, Matheus SM (2015) Aging voice and the laryngeal muscle atrophy. *Laryngoscope* 125(11):2518–2521
27. Kumai Y, Kobler JB, Park H, Galindo M, Herrera VL, Zeitels SM (2010) Modulation of vocal fold scar fibroblasts by adipose-derived stem/stromal cells. *Laryngoscope* 120(2):330–337
28. Hortobagyi D, Grossmann T, Tschernitz M et al (2020) In vitro mechanical vibration down-regulates pro-inflammatory and pro-fibrotic signaling in human vocal fold fibroblasts. *PLoS One* 15(11):e241901
29. Butler JE, Hammond TH, Gray SD (2001) Gender-related differences of hyaluronic acid distribu-

tion in the human vocal fold. *Laryngoscope* 111(5):907–911

30. Kravos A, Hocevar-Boltezar I, Gersak K (2013) Serum levels of sex hormones in males with reinke's edema. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 270(1):233–238
31. Marcotullio D, Magliulo G, Pezone T (2002) Reinke's edema and risk factors: clinical and histopathologic aspects. *Am J Otolaryngol* 23(2):81–84
32. Duflou SM, Thibeault SL, Li W, Smith ME, Schade G, Hess MM (2006) Differential gene expression profiling of vocal fold polyps and reinke's edema by complementary DNA microarray. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 115(9):703–714
33. Gugatschka M, Darnhofer B, Grossmann T et al (2019) Proteomic analysis of vocal fold fibroblasts exposed to cigarette smoke extract: exploring the pathophysiology of reinke's edema. *Mol Cell Proteom* 18(8):1511–1525. <https://doi.org/10.1074/mcp.RA119.001272>
34. Grossmann T, Steffan B, Kirsch A, Grill M, Gerstenberger C, Gugatschka M (2020) Exploring the pathophysiology of reinke's edema: the cellular impact of cigarette smoke and vibration. *Laryngoscope* 131(2):E547–E554. <https://doi.org/10.1002/lary.28855>
35. Gugatschka M, Ainodhofer H, Gruber HJ et al (2013) Age effects on extracellular matrix production of vocal fold scar fibroblasts in rats. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 271(5):1107–1112. <https://doi.org/10.1007/s00405-013-2722-7>
36. Graupp M, Kiesler K, Friedrich G et al (2014) Vocal fold fibroblast response to growth factor treatment is age dependent: results from an in vitro study. *J Voice* 28(4):420–423
37. Mattei A, Magalon J, Bertrand B et al (2018) Autologous adipose-derived stromal vascular fraction and scarred vocal folds: first clinical case report. *Stem Cell Res Ther* 9(1):202
38. Hertegard S, Nagubothu SR, Malmstrom E, LeBlanc K (2020) Treatment of vocal fold scarring with autologous bone marrow-derived human mesenchymal stromal cells—first phase I/II human clinical study. *Stem Cell Res Ther* 11(1):128
39. Chhetri DK, Berke GS (2011) Injection of cultured autologous fibroblasts for human vocal fold scars. *Laryngoscope* 121(4):785–792
40. Kishimoto Y, Yamashita M, Wei A et al (2019) Reversal of vocal fold mucosal fibrosis using siRNA against the collagen-specific chaperone Serpinh1. *Mol Ther Nucleic Acids* 16:616–625
41. Kirsch A, Hortobagyi D, Stachl T et al (2019) Development and validation of a novel phonomimetic bioreactor. *PLoS One* 14(3):e213788
42. Mizuta M (2017) Age-related histological changes of the vocal folds. In: Makiyama K, Hirano S (Hrsg) *Aging voice*. Springer, Singapore, 9–25 https://doi.org/10.1007/978-981-10-3698-9_2
43. Hirano M (1975) Phonosurgery: basic and clinical investigations. *Otologia* 21(Suppl 1):239–442

www.springermedizin.de

SpringerMedizin

Julius-Springer-Preis für HNO-Heilkunde 2022

Springer Medizin vergibt einen Preis für den besten CME-Beitrag

Sie haben gerade ein Thema in Arbeit, das für einen CME-Beitrag geeignet wäre? Dann möchten wir Sie aufrufen, uns dieses Thema zu schicken.

- Der neu gestiftete Preis ist mit 2000 EUR dotiert und wird alle 2 Jahre vergeben.
- Prämiert wird der beste CME-Beitrag der letzten beiden Jahre
- Preisverleihung mit Urkunde und Pressemitteilung
- Weitere Hinweise: HNO-Redaktion: Dagmar Lorenz, E-Mail: dagmar.lorenz@springer.com

Autorenhinweise unter <https://www.springermedizin.de/autoren> oder diesem QR-Code:

