

Aus dem Institut für Pathologie  
(Prof. Dr. med. P. Ströbel)  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

---

**Untersuchungen zu Veränderungen der  
extrazellulären Matrix beim Reinke-Ödem**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Doktorgrades  
für Zahnheilkunde  
der Medizinischen Fakultät der  
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von  
**Wolfgang Koenig**  
aus  
Bamberg

Göttingen 2019

|                   |                                   |
|-------------------|-----------------------------------|
| Dekan:            | Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer |
| Referent/in       | Prof. Dr. med. H. J. Radzun       |
| Ko-Referent/in:   | PD Dr. Dr. Alexander Meyer        |
| Drittreferent/in: | Prof. Dr. Rainer Mausberg         |

Datum der mündlichen Prüfung: 05.10.2020

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Untersuchungen zu Veränderungen der extrazellulären Matrix beim Reinke-Ödem" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den ..... ..

(Unterschrift)

# Inhaltsverzeichnis

|  |             |
|--|-------------|
| <b>Abbildungsverzeichnis.....</b>  | <b>IV</b>   |
| <b>Tabellenverzeichnis .....</b>   | <b>VII</b>  |
| <b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>   | <b>VIII</b> |
| <b>1 Einleitung.....</b>   | <b>1</b>    |
| 1.1 Anatomie der Stimmritze.....   | 2           |
| 1.2 Histologie der Stimmlippschleimhaut .....  | 3           |
| 1.3 Die extrazelluläre Matrix der Lamina propria.....  | 3           |
| 1.3.1 Kollagen in der Lamina propria .....   | 4           |
| 1.3.2 Die Aufgabe der Matrixmetalloproteinasen.....  | 6           |
| 1.3.3 Rolle der Hyaluronsäure in der Lamina propria.....                                       | 6           |
| 1.3.4 Rolle der elastischen Fasern in der Lamina propria .....                                 | 7           |
| 1.4 Klinik und Ätiologie des Reinke-Ödems .....  | 7           |
| 1.4.1 Anamnestischer und makroskopischer Befund.....   | 7           |
| 1.4.2 Mikroskopischer Befund.....  | 8           |
| 1.5 Operationstechnik und Therapie .....   | 9           |
| 1.6 Zielsetzung .....  | 10          |
| <b>2 Material und Methoden.....</b>  | <b>11</b>   |
| 2.1 Material .....   | 11          |
| 2.1.1 Zusammensetzung des Gewebekollektivs für die lichtmikroskopischen<br>Untersuchungen..... | 11          |
| 2.1.2 Zusammensetzung des Gewebekollektivs für die Nukleinsäureanalytik .....                  | 11          |
| 2.1.3 Verwendete Materialien .....   | 12          |
| 2.1.4 Verwendete chemische Substanzen .....  | 13          |
| 2.1.5 Verwendete Gerätschaften .....   | 14          |
| 2.1.6 Klinische Daten .....  | 15          |
| 2.1.6.1 Allgemeine Patienteninformation.....   | 15          |
| 2.1.6.2 Klinische Untersuchungen .....   | 15          |
| 2.2 Histochemie .....  | 16          |

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 2.2.1    | <i>Gewebefixierung in Paraffin</i> .....   | 16        |
| 2.2.2    | <i>Gewebefixierung in Hope</i> .....   | 16        |
| 2.2.3    | <i>Herstellung von Gewebeschnittpräparaten</i> .....   | 17        |
| 2.2.3.1  | <i>Hämatoxylin-Eosin-Färbung</i> .....   | 17        |
| 2.2.3.2  | <i>Elastika-van-Gieson-Färbung</i> .....   | 18        |
| 2.2.3.3  | <i>Eisen-Färbung</i> .....   | 19        |
| 2.2.3.4  | <i>Picro-Sirius-Rot-Färbung</i> .....  | 19        |
| 2.2.3.5  | <i>Alcianblau-Färbung und Hyaluronsäure-Verdau</i> .....   | 20        |
| 2.2.3.6  | <i>Immunhistochemie mit dem Antikörper CD34 zur Gefäßdarstellung</i> .....   | 21        |
| 2.3      | <i>Quantitative Bestimmung der Ribonukleinsäure-Expression</i> .....   | 21        |
| 2.3.1    | <i>Entparaffinierung und Ribonukleinsäure-Isolierung</i> .....   | 21        |
| 2.3.2    | <i>Reverse Transkription</i> .....   | 22        |
| 2.3.3    | <i>Real-Time Polymerasekettenreaktion</i> .....  | 22        |
| 2.4      | <i>Statistische Analysen</i> .....   | 25        |
| <b>3</b> | <b>Ergebnisse</b> .....  | <b>25</b> |
| 3.1      | <i>Gewebekollektiv, Geschlecht und Alter</i> .....   | 25        |
| 3.2      | <i>Klinischer und histologischer Befund der Stimmlippe, Rauchverhalten und Risikofaktoren bei RE-Patienten</i> ..... | 26        |
| 3.3      | <i>Untersuchungen der Hyaluronsäure in der Lamina propria</i> .....  | 28        |
| 3.4      | <i>Untersuchungen der Kollagenfasern in der Lamina propria</i> .....   | 30        |
| 3.5      | <i>Untersuchungen der elastischen Fasern in der Lamina propria</i> .....   | 36        |
| 3.6      | <i>Untersuchungen der epithelialen Deckschicht der Lamina propria</i> .....  | 39        |
| 3.7      | <i>Untersuchungen der vaskulären Struktur</i> .....  | 41        |
| 3.8      | <i>Mikrotraumen in der Lamina propria</i> .....  | 42        |
| 3.9      | <i>Ergebnisse der RT-PCR</i> .....   | 42        |
| 3.9.1    | <i>Hyaluronsynthesen HAS-1, HAS-2 und HAS-3</i> .....  | 43        |
| 3.9.2    | <i>Hyaluronidasen Hyal-1 und Hyal-2</i> .....  | 43        |
| <b>4</b> | <b>Diskussion</b> .....  | <b>44</b> |
| 4.1      | <i>Diskussion der Methodik</i> .....   | 44        |
| 4.2      | <i>Diskussion der Ergebnisse</i> .....   | 44        |
| 4.2.1    | <i>Der Hyaluronsäurehaushalt beim Reinke-Ödem</i> .....  | 44        |

---

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 4.2.2    | <i>Kollagenfaserqualität und -quantität beim Reinke-Ödem .....</i>                    | <i>47</i> |
| 4.2.3    | <i>Veränderung der elastischen Fasern beim Reinke-Ödem.....</i>                       | <i>48</i> |
| 4.2.4    | <i>Veränderungen an der Epithelschicht und Basalmembran beim<br/>Reinke-Ödem.....</i> | <i>49</i> |
| 4.2.5    | <i>Vaskuläre Strukturen im Stimmlippengewebe.....</i>                                 | <i>50</i> |
| <b>5</b> | <b>Zusammenfassung .....</b>  | <b>51</b> |
| <b>6</b> | <b>Literaturverzeichnis .....</b>   | <b>52</b> |

## Abbildungsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| <b>Abbildung 1:</b> Kehlkopfetagen (links) und Querschnitt der Glottis (rechts) .....   | 2  |
| <b>Abbildung 2:</b> Schematische Darstellung eines coronalen Schnittes durch eine Stimmlippe mit ihrer mikroanatomischen Struktur .....   | 3  |
| <b>Abbildung 3:</b> Schematische Darstellung des Kollagennetzwerks in der LP eines Neugeborenen .....                                     | 4  |
| <b>Abbildung 4:</b> Schematische Darstellung der adulten SL mit der Anordnung der Kollagenfasern in den einzelnen Schichten der LP .....  | 5  |
| <b>Abbildung 5:</b> Übersichtsaufnahme eines RE-Gewebeschnitts in HE-Färbung mit großflächiger Faserdestruktion in 10x Vergrößerung ..... | 8  |
| <b>Abbildung 6:</b> Destruktion der architektonischen Struktur der Kollagenfasern .....   | 9  |
| <b>Abbildung 7:</b> Direkte Laryngoskopie mit Vergrößerung durch das Operationsmikroskop und abgestütztes Operationslaryngoskop .....     | 10 |
| <b>Abbildung 8:</b> Schema normale SL (eigene Zeichnung) .....  | 16 |
| <b>Abbildung 9:</b> Schema Ödem Grad I (eigene Zeichnung) .....   | 16 |
| <b>Abbildung 10:</b> Schema Ödem Grad II (eigene Zeichnung) .....   | 16 |
| <b>Abbildung 11:</b> Schema Ödem Grad III (eigene Zeichnung) .....  | 16 |
| <b>Abbildung 12:</b> Verteilung des klinischen Befundes bei Patienten mit einem Reinke-Ödem .....   | 26 |
| <b>Abbildung 13:</b> Histologisches Ödemausmaß für die obere und mittlere LP bei den Reinke-Ödem Patienten .....                          | 27 |
| <b>Abbildung 14:</b> Reinke-Ödem mit 10x Vergrößerung in HE-Färbung .....   | 27 |
| <b>Abbildung 15:</b> Rauchverhalten der RE-Patienten.....   | 28 |
| <b>Abbildung 16:</b> Reinke-Ödem in 10x Vergrößerung und Alcianblau-Färbung mit und ohne Verdau.....                                      | 29 |
| <b>Abbildung 17:</b> Stimmlippenpolyp in 10x Vergrößerung und Alcianblau-Färbung mit und ohne Verdau.....                                 | 29 |
| <b>Abbildung 18:</b> Verteilung der HA in der LP im Medianwert .....  | 29 |
| <b>Abbildung 19:</b> Geschlechtsspezifische Verteilung der HA in der LP bei Patienten mit RE .....  | 30 |
| <b>Abbildung 20:</b> Altersabhängige Verteilung der HA in der mittleren LP .....  | 30 |
| <b>Abbildung 21:</b> Kollagenfaserdichte in der oberen LP bei RE- und N-RE-Patienten .....  | 31 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Abbildung 22:</b> Kollagenfaserdichte in der mittleren LP bei RE- und N-RE-Patienten .....  | 32 |
| <b>Abbildung 23:</b> Vernetzung der Kollagenfasern in der oberen LP bei RE- und N-RE-Patienten .....   | 32 |
| <b>Abbildung 24:</b> Vernetzung der Kollagenfasern in der mittleren LP bei RE- und N-RE-Patienten .....  | 33 |
| <b>Abbildung 25:</b> Verteilung der Kollagenfasern Typ I in der oberen LP bei RE- und N-RE-Patienten .....                                     | 33 |
| <b>Abbildung 26:</b> Verteilung der Kollagenfasern Typ I in der mittleren LP bei RE- und N-RE-Patienten .....                                  | 34 |
| <b>Abbildung 27:</b> Verteilung der Kollagenfasern Typ III in der oberen LP bei RE- und N-RE-Patienten .....                                   | 34 |
| <b>Abbildung 28:</b> Verteilung der Kollagenfasern Typ III in der mittleren LP bei RE- und N-RE-Patienten .....                                | 35 |
| <b>Abbildung 29:</b> Übersichtsaufnahme der Kollagenfasern eines RE und einer Leukoplakie in 10x Vergrößerung und Sirius-Red-Färbung .....     | 35 |
| <b>Abbildung 30:</b> Kollagentyp I und Kollagen Typ III beim RE links und bei der Leukoplakie in 10x Vergrößerung und Sirius-Red-Färbung ..... | 36 |
| <b>Abbildung 31:</b> Faserdichte der elastischen Fasern in der oberen LP bei RE- und N-RE-Patienten .....                                      | 37 |
| <b>Abbildung 32:</b> Faserdichte der elastischen Fasern in der mittleren LP bei RE und N-RE-Patienten .....                                    | 37 |
| <b>Abbildung 33:</b> Faserdestruktion der elastischen Fasern in der oberen LP bei RE- und N-RE-Patienten .....                                 | 38 |
| <b>Abbildung 34:</b> Faserdestruktion der elastischen Fasern in der mittleren LP bei RE- und N-RE-Patienten .....                              | 38 |
| <b>Abbildung 35:</b> Elastische Fasern bei einem RE und einer Leukoplakie, EvG-Färbung .....   | 39 |
| <b>Abbildung 36:</b> Zellhyperplasie der Epithelzellen bei RE- und N-RE-Patienten .....  | 39 |
| <b>Abbildung 37:</b> Dicke der Basalmembran bei RE- und N-RE-Patienten .....   | 40 |
| <b>Abbildung 38:</b> Darstellung der Basalmembran und Epithelzelldeckschicht beim RE und einer SL-Hyperplasie .....                            | 40 |
| <b>Abbildung 39:</b> Deckschicht aus Keratin im Vergleich RE- und N-RE-Patienten .....   | 41 |
| <b>Abbildung 40:</b> Leukoplakie mit Deckschicht aus Keratin und einer Zellhyperplasie .....   | 41 |



---

|  |    |
|--|----|
| <b>Abbildung 41:</b> Durchmesser und Verteilung der Gefäße bei RE-<br>und N-RE-Patienten im Median ..... | 42 |
| <b>Abbildung 42:</b> RE mit großen Gefäßlumen und Leukoplakie<br>mit kleineren Gefäßlumen .....          | 42 |
| <b>Abbildung 43:</b> RT-PCR der Hyaluronsynthasen .....  | 43 |
| <b>Abbildung 44:</b> RT-PCR der Hyaluronidasen .....   | 43 |

## Tabellenverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabelle 1:</b> Pathologische Diagnosen des Patientenkollektives .....   | 12 |
| <b>Tabelle 2:</b> Verwendete Materialien .....   | 12 |
| <b>Tabelle 3:</b> Verwendete chemische Substanzen .....  | 13 |
| <b>Tabelle 4:</b> Verwendete Gerätschaften .....   | 14 |
| <b>Tabelle 5:</b> Protokoll für ARP .....  | 22 |
| <b>Tabelle 6:</b> Protokoll für Hyaluronsynthese-1 .....   | 23 |
| <b>Tabelle 7:</b> Protokoll für Hyaluronsynthese-2 .....   | 23 |
| <b>Tabelle 8:</b> Protokoll für Hyaluronsynthese-3 .....   | 24 |
| <b>Tabelle 9:</b> Protokoll für Hyaluronidase-1 und -2 .....   | 24 |
| <b>Tabelle 10:</b> Verteilung der N-RE-Veränderungen im Vergleichskollektiv .....  | 25 |
| <b>Tabelle 11:</b> Auswertung der Kollagenfaserqualität und -quantität in der oberen<br>und mittleren LP von RE-Patienten und N-RE-Patienten ..... | 31 |
| <b>Tabelle 12:</b> Ergebnisse der elastischen Fasern Auswertung in der oberen<br>und mittleren LP bei RE- und N-RE-Patienten .....                 | 36 |

## Abkürzungsverzeichnis

DA = Dalton

EvG = Elastika-van-Gieson

EZM = Extrazelluläre Matrix

HA = Hyaluronsäure

HAS = Hyaluronsäuresynthase

HE = Hämatoxylin-Eosin

Hyal = Hyaluronidasen

LP = Lamina propria

MMP = Matrixmetalloproteinase

N-RE = Nicht-Reinke (Vergleichskollektiv)

nm = Nanometer

RE = Reinke-Ödem

RT-PCR = Real-Time Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion

SL = Stimmlippen

# 1 Einleitung

Das Reinke-Ödem (RE) zählt zu den häufigsten benignen Kehlkopferkrankungen (Lehmann et al. 1989, Kleinsasser 1974). Leitsymptom ist eine Stimmstörung, welche mit einer Rauigkeit und Heiserkeit der Stimme einhergeht. Die Erkrankung kommt überwiegend bei Frauen jenseits des 40. Lebensjahres vor (Raabe und Pascher 1999; Tillman et al. 1995) und zeigt eine Assoziation zum Nikotinkonsum, hoher Stimmbelastung sowie laryngopharyngalem Reflux (Dijkers und Nikkles 1995, Sato et al. 1999, Marcotullio et al. 2002, Sake et al. 2008).

Die Pathogenese des RE ist bis heute nicht eindeutig geklärt. Bereits Ende des 19. Jahrhunderts setzte sich der Rostocker Anatom Friedrich Berthold Reinke (1862–1919) genauer mit dem Erscheinungsbild des Stimmbandödems auseinander. Er erforschte die morphologischen und histologischen Strukturen der Stimmlippen (SL). Aufbauend auf den Untersuchungen des Wiener Laryngologen Markus Hajek (1861–1941) über das Larynxödem, vertiefte Reinke als Erstbeschreiber seine Arbeit durch pathologische und anatomische Forschung am menschlichen Stimmband mit seinem Werk *Untersuchungen über das menschliche Stimmband* (Reinke 1895). Das Fundament über die Anatomie des Stimmbandes beschrieb der HNO-Arzt Fränkel (Fränkel 1889). Reinke beschrieb das Stimmband als zweigeteilte Struktur: Die lateral gelegene Basis als erste Struktur sowie den Stimmbandfortsatz, der medial gelegen ist und sich histologisch von der Basis unterscheidet, als zweite Struktur (Reinke 1895).

Um die Ausdehnung des Stimmbandödems zu beschreiben, verwendete Reinke menschliche Kehlköpfe von Hingerichteten, welche frisch in Müllerscher Lösung fixiert wurden. Um ein künstliches Ödem zu erzeugen, wurde Leim oder Luft zwischen Epithel und das elastische Band injiziert. Das Ödem zeigte sich durch die Linea arcuata inferior und Linea arcuata superior scharf begrenzt und war streng auf die subepitheliale Lamina propria (LP) beschränkt. Die Grenzlinien stellten somit den Übergang von Platten- in Flimmerepithel sowie die Verwachsung des Perimysiums des M. vocalis mit der Schleimhaut dar, wobei diese Linien eine fast undurchdringliche Barriere bildeten (Reinke 1895). In den folgenden Jahren beschrieb Reinke bereits Strukturen der extrazellulären Matrix (EZM) in Form von teils geflechtartig angeordneten, teils parallel verlaufenden elastischen Fasern in den SL, wobei die Fasern senkrecht zum Druck und in gleichbleibender Richtung des Zuges ausgerichtet erschienen (Reinke 1897).

Hajek konnte etwa 30 Jahre später die Ergebnisse von Reinke durch eigene Untersuchungen bestätigen und bezeichnete den Ödem-Raum als „Reinkeschen Raum“ (Hajek 1925). Eine detaillierte Beschreibung der anatomischen Strukturen sowie der Ausdehnung des Reinkeschen Raumes gelang Anton Mayet in den 50/60er Jahren (Mayet 1955 und 1961). Mayet sprach von einer *Lamellenstruktur des Bindegewebes* im Stimmband. Des Weiteren beschrieb er eine Ödemausbreitung im Recessus Laryngis, der frei von der Lamellenstruktur ist (Mayet 1961). Mittlerweile sind weitere lichtmikroskopische und elektronenmikroskopische Untersuchungen von den SL vorhanden. So konnten z. B. durch Tillmann und Rudert die oben genannten Ergebnisse von Reinke und Mayet bestätigt werden. Es gelang ferner, die ödematösen Strukturen der SL sowie das bedeckende Epithel einschließlich der Basalmembran genauer zu analysieren und erste Zusammenhänge mit dem klinischen Bild herzustellen (Tillmann und Rudert 1982).

## 1.1 Anatomie der Stimmritze

Der menschliche Kehlkopf wird gebildet durch ein Gerüst aus Knorpelgewebe, Muskeln, Schleimhaut, Bändern und Membranen. Die Einteilung des Larynx erfolgt in drei Etagen von kranial nach kaudal: supraglottischer, glottischer und subglottischer Raum. Die Rima glottis (Stimmritze) wird durch die Plicae vocales (Stimm lippen = SL) und die Processi vocales gebildet. Die Stimmbänder sind an den Stellknorpeln befestigt, welche die funktionelle Bewegung der SL beeinflussen. Der Ventriculus laryngis ist eine Einfaltung zwischen den Plicae vocales und den SL. Die gesamten Strukturen des Larynx sind komplex mit Bändern und Muskeln verbunden und dienen den diversen Bewegungsmustern des Kehlkopfes (Boenninghaus und Lenarz 2007, Schiebler und Korf 2007, Schünke et al. 2005, Abbildung 1).



Abbildung 1: Kehlkopfetagen (links) und Querschnitt der Glottis (rechts) (Schünke et al. 2005 S. 28)

## 1.2 Histologie der Stimmlippschleimhaut

Der histologische Aufbau der SL ist wie folgt:

Auf die Bedeckung durch ein mehrschichtiges unverhorntes Epithel mit einer Basalmembran folgen die Lamina propia (LP), die quergestreifte Muskulatur und das Knorpelgewebe. Von Plattenepithel überzogen ist der membranöse Teil der SL, die vordere und hintere Kommissur werden von Flimmerepithel bedeckt. Die LP ist in drei Schichten aufgebaut: oberflächliche, mittlere und tiefe Schicht. Das Stimmband wird durch die mittlere und tiefe Schicht gebildet (Abbildung 2).

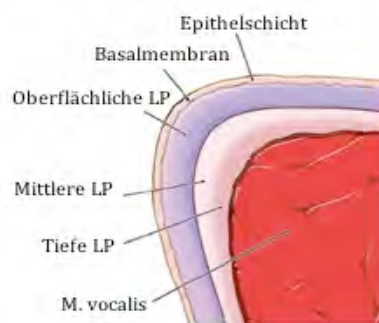


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines coronalen Schnittes durch eine Stimmlippe mit ihrer mikroanatomischen Struktur (Rosen und Simpson 2008, S. 6)

1981 entwickelte Hirano die funktionelle Einteilung der SL mittels des Body-Cover-Modells: Epithel und obere LP bilden das Cover, das Stimmband entspricht der Übergangsschicht (Transition), welche aus elastischen und kollagenen Fasern besteht, und der M. vocalis bildet den Body (Nawaka und Hosemann 2005, Rosen und Simpson 2008, Hirano 1981). Die LP durchläuft einen Entwicklungs- bzw. Reifeprozess. Im Stadium eines Fetus oder Neugeborenen weist die LP noch keine klassische Schichtung in drei Teile auf (Sato et al. 2001, Abbildung 3). Die Entwicklung der LP in das klassische Dreischichtmodell beginnt ca. mit dem 10. Lebensjahr und ist etwa mit dem 17. komplett abgeschlossen (Sato et al. 2001). Die mittlere Schicht der LP macht 51 % der gesamten Schicht aus, 13 % bilden den oberen Anteil und 36 % die tiefe Schicht der LP (Prades et al. 2010).

## 1.3 Die extrazelluläre Matrix der Lamina propria

Die EZM setzt sich aus den Bestandteilen zwischen den einzelnen Zellen zusammen, sie füllt den sogenannten Interzellularraum aus. Sie wird durch Sekretion und Synthese von Faserproteinen und Proteoglykanen durch die Zellen gebildet und ist gewebespezifisch.

Hauptaufgabe der EZM ist die Verbindung und Fixierung der Zellen im Gewebeverband, ferner kommt es zu Wechselwirkungen zwischen den Zellen und der EZM (Hamacher et al. 2004, Bosman und Stamenkoviv 2003, Hubmacher und Apte 2013). Der Abbau der Moleküle erfolgt intra- oder extrazellulär durch verschiedene Proteasen wie Serin/Threonin-, Cystein-, Aspartat- und Metalloproteinasen (Woessner 1998). Die Verteilung der EZM in der LP ist teils organisiert und teils ungeordnet (Gray et al. 2000). Die EZM der LP besteht aus zwei großen Gruppen der Matrixproteine: den fibrösen Proteinen wie z. B. Kollagen und Elastin, sowie den interstitialen Proteinen wie Fibromodulin, Decorin und Hyaluronsäure (HA). Diese Proteine sind spezifisch hinsichtlich ihrer Qualität und Quantität in der LP verteilt und bestimmen somit die biomechanischen Eigenschaften (Gray et al. 1999).

### 1.3.1 Kollagen in der Lamina propria

Kollagene gehören zu den Faserproteinbestandteilen der EZM in der LP und werden von Fibroblasten gebildet. Bindegewebe bestehen zu einem großen Anteil aus Kollagen. Aufgebaut sind die Kollagenfasern in Tripelhelixstrukturen, sich wiederholend aus dem Abspann von Glycin-X-Y ( $\alpha$ -Kette). An die Stelle von X und Y treten oft die Aminosäuren Prolin und Hydroxylisin. Es entstehen diverse Kollagentypen durch unterschiedliche Längen der tripelhelikalen Struktur, Interruptionen in der Tripelhelix und das Vorhandensein von globulären Abschnitten. Es gibt fibrilläre Kollagene, dazu zählen Typ I, II, III, V und XI sowie die nicht-fibrillären Kollagene Typ IV, VI, VII, VIII, IX, X, XII, XIII, XIV, XV, XVII und XVIII. Vorläufermoleküle werden als Prokollagene bezeichnet (Bornstein 1974, Deutzman et al. 2007).

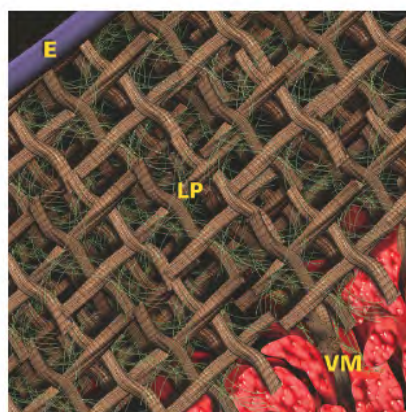


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Kollagennetzwerks in der LP eines Neugeborenen (Buhler et al. 2008, S. 373)  
E=Epithel, LP=Lamina propria, VM=Musculus vocalis

Für die Physiologie der SL spielen die Kollagenfasern eine große Rolle. Sie verleihen den SL elastische Fähigkeiten sowie Zug- bzw. Dehnungsfestigkeit (Gray 2000). Es werden zwei bandartige Kollagenschichtstrukturen beschrieben: Ein schmales Kollagenband, welches direkt unter dem Epithel verläuft, sowie ein dickeres Kollagenband in der tiefen Schicht der LP (Melo et al. 2003). Die Anordnung der einzelnen Fasern wird in Form eines Korbgeflechts beschrieben (Melo et al. 2003 und Prades et al. 2010, Abbildung 4). In der fetalen SL wird nur eine geflechtartige Schichtstruktur der Kollagenfasern beobachtet (Buhler et al. 2008, Prades et al. 2010). Bei älteren Menschen geht das Kollagennetzwerk teilweise aufgrund des Alterungsprozesses verloren (Melo et al. 2003).

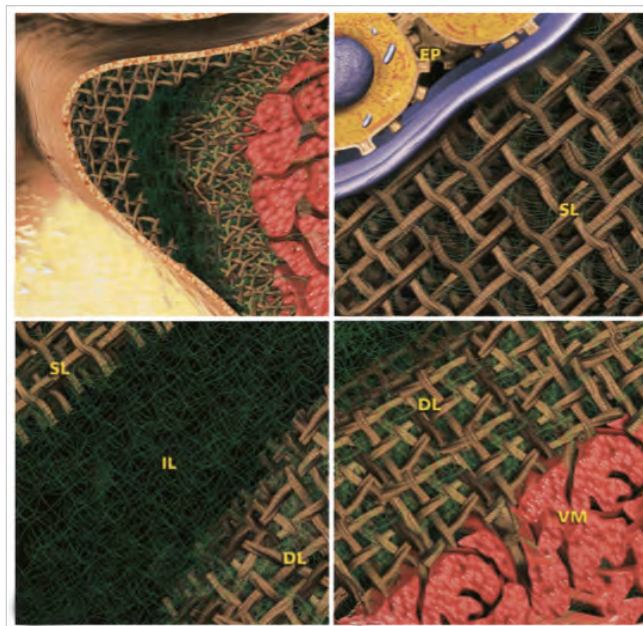


Abbildung 4: Schematische Darstellung der adulten SL mit der Anordnung der Kollagenfasern in den einzelnen Schichten der LP (Melo et al. 2003, S. 2190) EP=Epithel, SL=superfizielle Lamina, IL=intermediat (mittlere) Lamina, DL=deep (tiefe) Lamina, VM=Musculus vocalis

Kollagen der Qualitäten von Typ 1 und Typ 3 sind prädominierend in der menschlichen SL (Hahn et al. 2006b). Der Kollagen-Typ I bildet hauptsächlich die dicken, gebündelten Fasern in der Umgebung des M. vocalis, und der Kollagentyp III bildet das feine Netzwerk in der mittleren Schicht der LP (Melo et al. 2003, Tateya et al. 2006, Prades et al. 2010). Zusätzlich wird dem subepithelialen Abschnitt an Fasern auch die Kollagenqualität Typ I zugesprochen (Tateya et al. 2006). Kollagenfasern der tiefen Schicht umschlingen die Fasern des M. vocalis und dringen auch in die muskuläre Faserstruktur ein. Die mittlere Schicht der LP ist weniger dicht mit Kollagenfasern besiedelt als die tiefe Schicht (Prades et al. 2010).



### 1.3.2 Die Aufgabe der Matrixmetalloproteinasen

Die Biochemie der EZM wird unter anderem durch den Ab- und Umbau durch Matrixmetalloproteinasen (MMP's) geregelt. Dazu gehören Vorgänge wie Gewebeproliferation oder Wundheilung (Lemaître und D'Armiento 2006). MMP's werden auch mit Tumor- und Metastasenbildung, rheumatischer Arthritis und kardiovaskulären Erkrankungen in Verbindung gebracht. Sie sind membranständig oder frei und zerlegen die Bestandteile der EZM in ihre einzelnen Moleküle. Die MMP's liegen in inaktiven Vorstufen vor und aktivieren sich selbst durch positive Rückkopplung oder andere proteinspaltende Enzyme (Snoek-van Beurden und Von den Hoff 2005, Visse und Nagase 2003). Eingeteilt werden die MMP's nach ihrer Fähigkeit Moleküle zu spalten sowie nach ihrem Aufbau. Die einzelnen MMP's jeder Hauptgruppe haben überschneidende Eigenschaften in ihrer Fähigkeit Moleküle zu spalten (Lemaître und D'Armiento 2006).

### 1.3.3 Rolle der Hyaluronsäure in der Lamina propria

Ein weiterer Bestandteil der EZM der LP ist die HA. Diese spielt eine wichtige Rolle im biochemischen und mechanischen Gewebemanagement (Ward et al. 2002). Die HA beeinflusst vor allem die Viskosität und Elastizität der LP, was wiederum Einfluss auf die Stimmgebung und Stimmfrequenz hat. Weiterhin ist sie bedeutend für den Prozess der Wundheilung, den Wasserhaushalt im Gewebe, die osmotische Regulation und dient als Füllstoff im Gewebe der LP (Butler et al. 2001, Gray et al. 1999). Die HA gehört zu der Familie der Glykosaminoglycane und ist ein Disaccharid bestehend aus D-Glucuronsäure und D-N-Acetylglucosamin (Necas et al. 2008). Die Hyaluronsäuresynthasen (HAS), HAS-1, -2, -3 in den Fibroblasten produzieren polymere Strukturen aus den beiden Bausteinen, welche wiederum an Proteine gebunden werden und somit Proteoglykane bilden (Meyer und Palmer 1934, Lee und Spicer 2000). HAS-1 und -2 produzieren hochmolekulargewichtige HA von  $4 \times 10^6$  Dalton (DA) und HAS-3 wiederum niedrigmolekulargewichtige HA von  $1 \times 10^4$  DA (Ward et al. 2002). Niedrigmolekulare HA ist ein Auslöser für Signalkaskaden und stimuliert die Zellproliferation und Inflammation (Ohkawara et al. 2000, McKee et al. 1997). Die hochmolekulare HA dagegen hat eher eine anti-inflammatorische Funktion (Neumann et al. 1999). Die Degradation der HA erfolgt über die Hyaluronidasen (Hyal), die zu den Endohexosaminidasen gehören und im gesamten Körper verteilt sind (Kreil 1995). Die zwei wichtigsten Hyal im menschlichen Körper sind die Hyal-1 und Hyal-2. Die Hyal-1 hat die Fähigkeit die Moleküle in kurze Tetrasaccharide zu spalten. Hyal-2 dagegen die hochmolekulare HA in ein ca. 50 Untereinheiten-Saccharidmolekül-Produkt abzubauen.

Hyal-2 besitzt ein breiteres pH-Optimum Spektrum (Stern und Jedrzejak 2006). Die HA ist durchweg in der LP zu finden, die höchste Konzentration ist in der mittleren Schicht (Butler et al. 2001). Geschlechtsspezifisch haben Männer in den oberen Anteilen der LP mehr HA als Frauen, während Frauen in den mittleren und tiefen Anteilen der LP mehr HA ausweisen (Butler et al. 2001). Eine Schwankung der HA-Konzentration in der LP führt zu Veränderungen in den oben beschriebenen Gewebeeigenschaften (Gray et al. 1999). Die Menge an HA nimmt mit dem Alterungsprozess ab, ebenso die Expression der HA-Synthasen (Ohno et al. 2009).

### **1.3.4 Rolle der elastischen Fasern in der Lamina propria**

Elastischen Fasern setzen sich aus dem Polymer Elastin und Mikrofibrillen zusammen. Die Mikrofibrillen werden durch Fibrillin und Fibulin gebildet, welche der Quervernetzung dienen. Tropoelastin durchläuft diverse Vorstufen und wird durch das Abspalten von Sequenzen schließlich zu Elastin. Es bestehen drei Arten von elastischen Fasern, welche sich durch das Verhältnis von Elastin und Mikrofibrillen unterscheiden: Oxytalan, ohne Elastin, Elaunin, mit Elastin im Verhältnis halb zu halb und reife elastische Fasern mit einem hohen Anteil an Elastin (Debelle und Tamburro 1999, Kielty et al. 2002, Deutzmann 2007). Der generelle Turnover der elastischen Fasern beim Erwachsenen ist gering. Der Metabolismus ist dennoch abhängig von Alterungsprozess und Funktionsstörung. Geschlechtsspezifisch zeigen sich keine Unterschiede (Hammond et al. 1998).

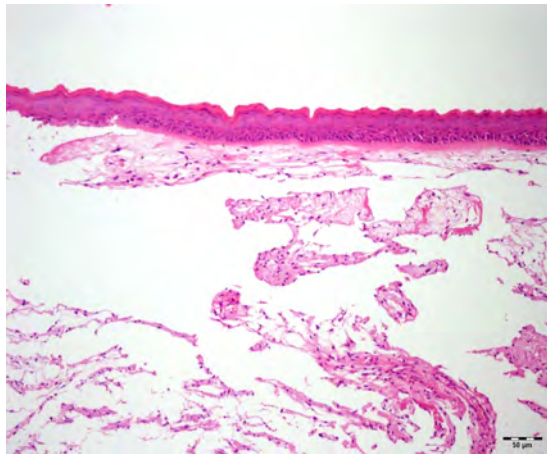
Die Konzentration an elastischen Fasern in der LP variiert je nach Schicht: Sie ist in der obersten Schicht am geringsten, wobei diese einen geringen Elastin-Anteil besitzen. In der mittleren Schicht ist der Gehalt an elastischen Fasern eher moderat, es liegen mehr reife elastische Fasern vor, welche dann in der tiefen Schicht ihre höchste Konzentration zeigen (Hammond et al. 1997; Roberts et al. 2011). Die elastischen Fasern geben der LP Elastizität und sorgen für eine elastische Funktion während der Vibration (Kahane 1987).

## **1.4 Klinik und Ätiologie des Reinke-Ödems**

### **1.4.1 Anamnestischer und makroskopischer Befund**

Als eine der häufigsten benignen Kehlkopferkrankung (Lehmann et al. 1989 und Kleinsasser 1974) fällt das RE durch eine Stimmstörung mit Rauigkeit und Heiserkeit der Stimme mit abgesenkter mittlerer Sprechstimmlage auf. Hauptsächlich ist das weibliche Geschlecht betroffen (Raabe und Pascher 1999) und die Patienten sind in der Regel älter als 40 Jahre (Tillmann et al. 1995). Der initial auslösende Faktor des RE ist nicht bekannt, jedoch werden

der Prozess des Alterns und Nikotinkonsum mit dem RE in Verbindung gebracht (Dijkers und Nikkels 1995, Sato et al. 1999, Marcotullio et al. 2002). Zu den weiteren Risikofaktoren zählen eine hohe Stimmbelastung, laryngopharyngaler Reflux und eine Schilddrüsenunterfunktion, welche die Entstehung eines RE begünstigen (Sake et al. 2008). Andere Co-Faktoren wie Allergien, Infektionskrankheiten (Raabe und Pascher 1999, Cohen et al. 2009) und hormonelle Veränderungen werden diskutiert, konnten aber nicht bewiesen werden (Voelter et al 2008).



**Abbildung 5: Übersichtsaufnahme eines RE-Gewebeschnitts in HE-Färbung mit großflächiger Faserdestruktion in 10x Vergrößerung**

Laryngoskopisch sieht man eine meistens breitbasige oder kissenartige, ödematöse Veränderung der SL-Schleimhaut. Gelegentlich kann es aufgrund von lappen- und wulstartigen Ausstülpungen in das Kehlkopflumen zum Fremdkörpergefühl, Schluckbeschwerden und Dyspnoe kommen. Teilweise kann das Epithel sich chronisch entzünden oder leukoplakisch verhornen, hervorgerufen durch die mechanische Reizung der kontralateralen SL (Tillmann und Rudert 1982). Die Schwellung entsteht durch Ansammlung gelartiger Flüssigkeit im subepithelialen Bereich (Pastuzek et al. 2003), aufgrund der aufgelockerten und brüchigen epithelialen Deckschicht (Hammer 2007).

#### **1.4.2 Mikroskopischer Befund**

Histologisch wird eine Veränderung des Kollagen-Netzwerkes beschrieben (Abbildung 5). Die normalerweise geflechtartigen Anordnungen der Kollagenfasern zeigen bei dem RE eine nicht regelhafte Anordnung in der LP (Sake et al. 2008, Abbildung 6). Ebenso wird auch ein vermehrtes Auftreten von ektatischen Gefäßen mit dünnen und brüchigen Wänden beschrieben, welche dazu neigen Anastomosen zu bilden (Jovanovic et al. 2007).

Zusätzlich zeigt sich noch eine gesteigerte Produktion bzw. ein vermehrtes Vorhandensein an EZM als Folge des Wundheilungsprozess und eine Auflockerung der Epithelschicht, welche auch am Wundheilungsprozess beteiligt ist (Volić et al. 2004). Schließlich wird eine verzerrte, teils aber auch verbreiterte Basalmembranschicht als Reaktion auf die Traumata in der LP beobachtet (Volić et al. 2004, Knöbber 1994).

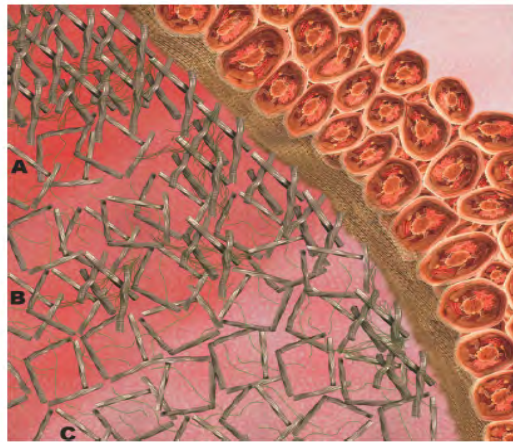


Abbildung 6: Destraktion der architektonischen Struktur der Kollagenfasern (A) gering, (B) moderate und (C) großflächig (Sake et al. 2008, S. 1503)

Eine maligne Entartung des RE ist nicht bekannt (Raabe und Pascher 1999, Marcotullio et al. 2002). Die Therapie der Wahl ist heutzutage die chirurgische Entfernung des RE mit der Methode nach Kleinsasser, um eine adäquate Verbesserung der Stimmqualität zu erzielen (Raabe und Pascher 1999).

## 1.5 Operationstechnik und Therapie

Die Abtragung des veränderten Gewebes erfolgte in direkter Laryngoskopie, welche ein standardisiertes Verfahren zur Entfernung gutartiger SL-Erkrankungen ist (Abbildung 7). Der Vorteil der laryngoskopischen Operation gegenüber konservativen Therapieansätzen ist eine funktionelle Verbesserung, sowie die Gewinnung von Gewebematerial für eine histopathologische Befundung.

Die Durchführung der Operation erfolgt mit starren Laryngoskopen in Intubationsnarkose am relaxierten Patienten mit überstreckter Kopf-lage. Phonochirurgische Eingriffe können so beidhändig in sicherem Blick- und Überwachungsfeld durchgeführt werden (Berbohm et al. 2009). Die Operationstechnik nach Kleinsasser hat sich als erfolgreich bewährt. Hierbei wird das RE gespalten, die ödematöse Flüssigkeit abgesaugt und die überschüssige Schleimhaut mittels CO<sub>2</sub>-Laser entfernt (Kleinsasser 1991). Vor allem bei unklarem klinischen Befund

zeigt sich die direkte Methode von Vorteil zu sein, da eine bessere Differenzierung bzw. Abgrenzung des pathologisch veränderten Gewebes möglich ist (Seidner 2000). Um eine deutliche Verbesserung der Stimmqualität zu erhalten, ist es bedeutsam, dass der Operateur minimalinvasiv vorgeht und die tiefe Schicht der LP schont, um so ein Trauma am M. vocalis zu vermeiden. Ein Nachteil dieser Operationstechnik ist, dass während der Operation keine funktionelle Analyse der Stimme sowie der SL-Beweglichkeit möglich ist (Schade und Hess 2001).

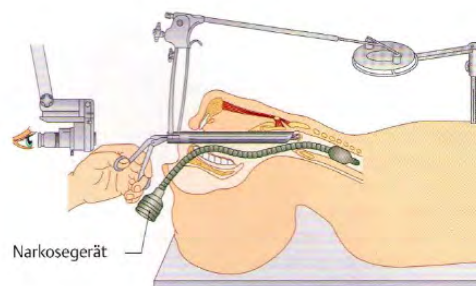


Abbildung 7: Direkte Laryngoskopie mit Vergrößerung durch das Operationsmikroskop und abgestütztes Operationslaryngoskop (Probst et al.; 2008, S. 315)

## 1.6 Zielsetzung

Auch wenn die anatomischen und histopathologischen Veränderungen des RE bereits in zahlreichen Publikationen beschrieben worden sind und einige Risikofaktoren postuliert wurden, ist die eigentliche Pathogenese des RE nicht eindeutig geklärt (Thibeault 2005). Im Gegensatz zu anderen pathologischen SL-Veränderungen scheinen beim RE besondere Faktoren eine Rolle zu spielen: Epidemiologische bzw. geschlechtsspezifische Faktoren, wie z. B. das vermehrte Auftreten bei weiblichen Personen (Raabe und Pascher 1995) ab der vierten Lebensdekade (Tillmann et al. 1995). Neben dem Alterungsprozess spielt der Nikotinkonsum eine wesentliche Rolle (Dickers und Nikkles 1995, Sato et al. 1999), oft in Verbindung mit einer beruflichen Stimmexposition oder auch gelegentliche mit ösophagalen Reflux (Sake et al. 2008). Da das bedeckende Epithel in zahlreichen Voruntersuchungen nicht relevant verändert zu sein schien und die beschriebenen Risikofaktoren auch auf die subepithelialen Schichten und die EZM wirken (z. B. Mikrotraumen bei starker Stimmbelastung, altersbedingte Degeneration, Nikotin und ein postulierter hormoneller Effekt), soll in dieser Arbeit ein besonderer Fokus auf die möglichen Veränderungen der EZM (v. a. der HA-Haushalt sowie Veränderungen der Faserstrukturen) gelegt werden. Ziel ist es, Veränderungen der EZM sowie des Epithels und der Basalmembran im RE zu bestimmen und mit anderen gutartigen SL-Erkrankungen zu vergleichen.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Zusammensetzung des Gewebekollektivs für die lichtmikroskopischen Untersuchungen**

Das zu untersuchende Gewebe wurde vom Institut für Pathologie der Universitätsmedizin Göttingen zur Verfügung gestellt. Es handelt sich dabei ausschließlich um Gewebeproben, welche aufgrund diagnostischer und/oder therapeutischer Indikation gewonnen wurden und bei welchen die histopathologische Diagnostik abgeschlossen war. Die Patienten wurden ferner vor dieser Studie über die weitere wissenschaftliche Gewebeuntersuchung aufgeklärt und haben per Unterschrift die Einwilligung erteilt. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Universitätsmedizin Göttingen genehmigt (Ethik-Votum-Nummer: 15/4/11).

Jeweils 50 Patienten-Proben, sowohl weiblich als auch männlich, mit der pathologischen Diagnose „Reinke-Ödem“ und 55 weitere Patienten-Proben als Vergleichskollektiv, auch weiblich und männlich, mit vom „Reinke-Ödem“ abweichenden pathologischen Veränderungen (Nicht-Reinke-Veränderungen N-RE) an dem SL aus dem Zeitraum 2006 – 2012 wurden in diese Studie eingeschlossen. Bei den Patienten wurde eine mikrolaryngoskopische Abtragung in Intubationsnarkose in der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde der Universitätsklinik Göttingen durchgeführt. Dabei wurde minimalinvasiv vorgegangen und es wurden nur die obere und mittlere Schicht der LP entfernt. Für die Untersuchungen in dieser Arbeit wurden ausschließlich Proben verwendet, in denen sowohl die obere als auch die mittlere Schicht der LP vorhanden war. Die untere Schicht der LP war nicht erfasst und somit nicht beurteilbar. Weitere relevante Daten über die Patienten stammten aus der Aktendokumentation bzw. aus digitalisierten Laryngoskopien der Abteilung für Phoniatrie bzw. Hals-Nasen- Ohrenheilkunde der Universitätsklinik Göttingen.

#### **2.1.2 Zusammensetzung des Gewebekollektivs für die Nukleinsäureanalytik**

Die chirurgische Abtragung des Gewebekollektivs erfolgte durch die Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde der Universitätsklinik Göttingen im Zeitraum von 2011 – 2014. Unmittelbar danach wurde das Gewebe in die Abteilung für Pathologie zur Diagnostik überstellt und mittels Hope-Verfahren aufbereitet.

Das Kollektiv setzt sich einmal aus 20 ausschließlich weiblichen Patienten mit einem klinisch und pathologisch diagnostizierten RE zusammen. Das Vergleichskollektiv besteht aus 46 N-RE-Patienten (Tabelle 1). Davon sind 21 weiblich und 25 männlich. Die pathologischen Diagnosen setzen sich wie folgt zusammen:

Tabelle 1: Pathologische Diagnosen des Patientenkollektives

| Pathologie                 | Anzahl |
|----------------------------|--------|
| SL-Polyp                   | 11     |
| Leukoplakie                | 7      |
| Fibrose                    | 7      |
| Laryngocele                | 4      |
| Papillom                   | 4      |
| Hyperplasie                | 3      |
| Carcinom in situ           | 2      |
| Plattenepithelcarzinom     | 2      |
| SL-Knötchen                | 2      |
| SL-Zyste                   | 1      |
| Pseudozyste                | 1      |
| Granulom                   | 1      |
| Ohne pathologischen Befund | 1      |
| Reinke-Ödem                | 20     |

### 2.1.3 Verwendete Materialien

Tabelle 2: Verwendete Materialien

| Material  | Hersteller  |
|---|---|
| Ausgießförmchen                                     | Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland            |
| Deckplättchen                                       | Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland            |
| Einbettkassetten                                    | Kabe-Labortechnik, Nümbrecht-Elsenroth, Deutschland |
| Marker SecureLine II                                | Sigma, St. Louis, USA                               |
| Klebefolie I-Cycler IQ Optical Quality Sealing tape | BioRad Laboratories, München, Deutschland           |
| Objektträger  | Knittel-Gläser, Braunschweig, Deutschland           |
| Objektträger SuperFrost Plus                        | Menzel-Gläser, Braunschweig Deutschland             |
| Pipettenspitzen 10 µl, 100 µl und 1000 µl           | Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland                    |
| Pipettenspitzen 2,5 µl                              | Biozym Diagnostik, Hess. Oldendorf, Deutschland     |
| Eppendorfcup  | Eppendorf, Hamburg, Deutschland                     |

## 2.1.4 Verwendete chemische Substanzen

Tabelle 3: Verwendete chemische Substanzen

| Substanz  | Hersteller                                  |
|---|---|
| Xylol   | Mallinckrodt Baker, Deventer, Holland       |
| Paraffin  | Süsse, Gudensberg, Deutschland              |
| Aqua bidest   | Roth, Karlsruhe, Deutschland                |
| Aqua dest   | Universitätsmedizin, Göttingen, Deutschland |
| Bovine Testicular Hyaluronidase                           | Sigma, St. Louis, USA                       |
| Tris-buffered saline (TBS) pH 7,4                         | Dako, California, USA                       |
| Paraffin  | Süsse, Gudensberg, Deutschland              |
| Alkohol 100%, 96%, 70%                                    | Chemie-Vertrieb, Hannover, Deutschland      |
| SyberGreen  | BioRad Laboratories, München, Deutschland   |
| Hämatoxylin ( $C_{16}H_{14}O_6 \cdot x H_2O$ )            | Merck, Darmstadt, Deutschland               |
| Kaliumaluminiumsulfat ( $KAl(SO_4)_2$ )                   | Merck, Darmstadt, Deutschland               |
| Natriumjodid (NaI)  | Merck, Darmstadt, Deutschland               |
| Chloralhydrat ( $C_2H_3Cl_3O_2$ )                         | Merck, Darmstadt, Deutschland               |
| Citronensäure ( $C_6H_8O_7$ )                             | Merck, Darmstadt, Deutschland               |
| Eosin ( $C_{20}H_6Br_4Na_2O_5$ )                          | Merck, Darmstadt, Deutschland               |
| Essigsäure ( $C_2H_4O_2$ )                                | Merck, Darmstadt, Deutschland               |
| Kaliumhexacyanidoferrat III ( $C_6FeK_3N_6$ )             | Merck, Darmstadt, Deutschland               |
| Kernechtrot ( $C_{14}H_8NNaO_7S$ )                        | Merck, Darmstadt, Deutschland               |
| Resorcin-Fuchsin ( $C_6H_6O_2$ - $C_{20}H_{19}N_3$ x HCl) | Chroma, Münster, Deutschland                |
| Alcian-Blau ( $C_{56}H_{68}Cl_4CuN_{16}S_4$ )             | Serva, Heidelberg, Deutschland              |
| Direct Red 80 ( $C_{45}H_{26}N_{10}Na_6O_{21}S_6$ )       | Sigma, St. Louis, USA                       |
| Pikrinsäure ( $C_6H_3N_3O_7$ )                            | Sigma, St. Louis, USA                       |
| Fast Green FCF ( $C_{37}H_{34}N_2Na_2O_{10}S_3$ )         | Roth, Karlsruhe, Deutschland                |
| Formalin (4 %)  | Süsse, Gudensberg, Deutschland              |
| Cytoseal XYL  | Thermo Scientific, Waltham, USA             |
| Salzsäure-Alkohol   | Merck, Darmstadt, Deutschland               |
| Salzsäure (HCl)   | Merck, Darmstadt, Deutschland               |



| <b>Substanz</b>  | <b>Hersteller</b>                               |
|--|---|
| Trishydroxymethylaminomethan (C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> ) | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland               |
| Natriumchlorid (NaCl)  | Merck, Darmstadt, Deutschland                   |
| Hope I/II  | DCS Innovative Diagnostik, Hamburg, Deutschland |
| Low Melting Paraffin   | DCS Innovative Diagnostik, Hamburg, Deutschland |
| BSA-Blocker (2 %)  | CANDOR Biosince GmbH, Wangen, Deutschland       |
| Antikörper CD-34 (Clone QBEND 10) Neo Markers                                  | Zytomed Systems, Berlin, Deutschland            |
| Detektionskit (Sekundärantikörper, Label, Fast Red)                            | Dako, Hamburg, Deutschland                      |
| RNeasy® Mini-Kit (50)  | Qiagen, Hilden, Deutschland                     |
| Omniscript RT Kit (50)   | Qiagen, Hilden, Deutschland                     |
| 2-Mercaptoethanol 98 %   | Sigma, St. Louis, USA                           |

## 2.1.5 Verwendete Gerätschaften

Tabelle 4: Verwendete Gerätschaften

| <b>Gerät</b>   | <b>Hersteller</b>                        |
|--|--|
| Schlittenmikrotom  | Reichert & Jung, Heidelberg, Deutschland |
| Wasserbad  | GFL, Burgwedel, Deutschland              |
| Brutschrank (+39, +52 °C)  | Heraeus, Düsseldorf, Deutschland         |
| Eismaschine  | Scotsmann Ice Systems, Mailand, Italien  |
| Kühlschrank  | Siemens, München, Deutschland            |
| Eisschrank (-20 °C)  | Liebherr, Biberach, Deutschland          |
| Eisschrank (-80 °C)  | GFL, Burgwedel, Deutschland              |
| Mikroskop ID 03  | Zeiss, Jena, Deutschland                 |
| Kolbenhub-Pipetten (0,1-2,5 µl, 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl) | Eppendorf, Hamburg, Deutschland          |
| Thermomixer 5436   | Eppendorf, Hamburg, Deutschland          |
| Zentrifuge 5424  | Eppendorf, Hamburg, Deutschland          |
| Vortex Genie 2   | Bänder und Hobein, Zürich, Schweiz       |
| NanoDrop 2000  | Thermo Scientific, Waltham, USA          |

| Gerät                                 | Hersteller                           |
|---------------------------------------|--------------------------------------|
| Thermocycler (TPersonal)              | Biometra, Göttingen, Deutschland     |
| iCycler iQ™                           | BIO-RAD, Hercules Kalifornien, USA   |
| Objektträger-Scanner Olympus BX-REMCB | Olympus Europa, Hamburg, Deutschland |

## 2.1.6 Klinische Daten

### 2.1.6.1 Allgemeine Patienteninformation

Der Patienten-Name sowie die Vorgangsnummer wurden durch eine willkürlich ausgesuchte dreistellige Ziffer anonymisiert. Erfasst werden folgende Daten: Geschlecht, Alter der Patienten bei chirurgischer Abtragung im Universitätsklinikum Göttingen, Nikotinkonsum, ösophagealer Reflux und eine hohe Stimmexposition.

### 2.1.6.2 Klinische Untersuchungen

Alle Patienten wurden mittels indirekter Laryngoskopie untersucht und die Befunde dokumentiert. Die Untersuchungsdaten wurden auf einem DVD-Speichermedium archiviert und ausgewertet. Die Lokalisation und Ausdehnung der RE-Veränderung an den SL wurden mittels eines Schaubildes festgehalten (Abbildung 8). Kleine Ödeme machten weniger als die Hälfte der SL-Breite aus: klinische Klassifikation Grad I (Abbildung 9). Mittelgradige Ödeme bewegten sich in Bereichen mehr als die Hälfte der SL-Breite und weniger als eine SL-Breite: klinische Klassifikation Grad II (Abbildung 10). Hochgradige Ödem gingen über die gesamte SL-Breite hinaus: klinische Klassifikation Grad III (Abbildung 11). Bei fehlender digitaler Archivierung der Laryngoskopie wurde das klinische Ausmaß mittels OP-Bericht erarbeitet.

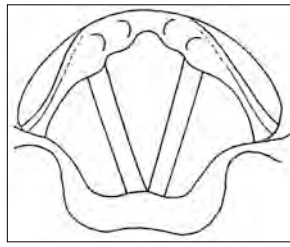


Abbildung 8: normale SL

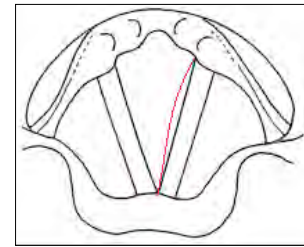


Abbildung 9: Ödem Grad I

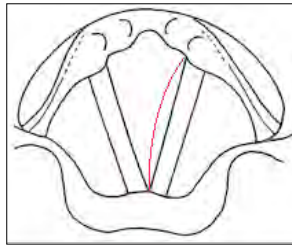


Abbildung 10: Ödem Grad II

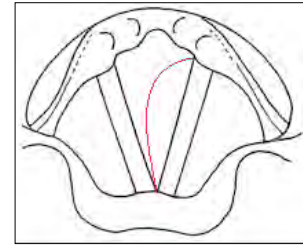


Abbildung 11: Ödem Grad III

## 2.2 Histochemie

### 2.2.1 Gewebefixierung in Paraffin

Um das Gewebe vor Autolyse und dem Verwesungsprozess zu schützen, wurde dieses in 4%-Formalin Lösung für ca. acht Stunden fixiert. Danach wurde es mit Leitungswasser gespült und im Einbettautomaten Excelsior ES über die aufsteigende Alkoholreihe (70 % → 96 % → 96 % → 100 % → 100 % → 100 %) entwässert. Schließlich wurde mit Xylol der Alkohol, dem Gewebe entzogen, und es folgte die Lagerung in 56,0 °C warmem Paraffin (max. 24 h). Letztendlich wurde das Gewebe in ein Paraffinblock eingebettet und die Einbettkassette mit einer Nummer dokumentiert (Tabelle 2, 3, 4).

### 2.2.2 Gewebefixierung in Hope

Das frische Gewebe wurde über Nacht in Hope I Lösung auf Eis im Kühlschrank bei 4,0 °C gelagert. Am folgenden Tag wurde das Gewebe für 2 h in Hope-II-Lösung auf Eis gelagert. Danach folgte ein dreimaliges Bad in Aceton für jeweils 2 h auf Eis. Im Anschluss wurde das Gewebe über Nacht in Low Melting Paraffin im Wärmeschrank bei 52,0 °C gelagert, und am nächsten Tag erfolgte die Einbettung in einen Paraffinblock (Tabelle 2, 3, 4).

## 2.2.3 Herstellung von Gewebeschnittpräparaten

2,0 µm dünne Paraffinschnitte wurden, von den gekühlten Paraffinblöcken, mit einem Schlittenmikrotom angefertigt. Der Gewebeschnitt wurde zur Entspannung in ein Wasserbad gelegt und auf einen Objektträger aufgezogen. Anschließend wurde der Objektträger bei 39,0 °C im Brutschrank getrocknet. Mit Xylol erfolgte die Entparaffinierung aller Schnittpräparate, das Xylol wird mit der absteigenden Alkoholreihe (100 % → 100 % → 100 % → 96 % → 96 % → 70 %) ausgewaschen und dem Gewebe wieder H<sub>2</sub>O zugeführt. Anschließend erfolgten die spezifischen Färbungen. Nach jeder Färbung wurden die Gewebeschnitte mit Aqua dest gespült, mit der aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und schließlich mit Deckglas und Eindeckmedium fertiggestellt (Tabelle 2, 3, 4).

### 2.2.3.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung wurde als Übersichtsfärbung ausgewählt, sowie zur Beurteilung der epithelialen Strukturen und der Basalmembran. Nachdem die Gewebeschnitte die absteigende Alkoholreihe durchlaufen hatten, folgte ein 10-minütiges Bad in der Hämalaulösung. Die blau Färbung der Zellkerne wurde mit Leitungswasser umgesetzt, und es folgte die Färbung der zytoplasmatischen Strukturen durch 30-sekündige Inkubation in Eosin-Lösung.

Der Ansatz für Hämalaulösung besteht aus: 1,0 g Hämatoxylin, 50,0 g Kaliumaluminiumsulfat, 150,0 mg Natriumjodat, 50,0 g Chloralhydrat, 1,0 g Citronensäure gelöst in 1 Liter Aqua bidest.

Der Ansatz Eosin besteht aus: 20,0 g Eosin gelöst in 1 Liter Aqua bidest sowie 4 Tropfen Essigsäure (Tabelle 2, 3, 4).

Die so entstandenen HE-Präparate der SL wurden hinsichtlich folgender Parameter durch zwei unabhängige Betrachter beurteilt:

1. Vorhandensein von Dysplasien mit dem Score 0 für nicht vorhanden und dem Score 1 für vorhanden.
2. Schweregrad des Reinke-Ödems mit dem Score der histologischen Einteilung des RE: Score 0 für kein RE, Score 1 für aufgelockerte Gewebestrukturen, Score 2 für Lakunen bis 50,0 µm im Durchmesser sowie Score 3 für Lakunen > 50,0 µm im Durchmesser.
3. Veränderung des Epithels mit dem Score der Hyperplasie der Epithelzelllagen. Score 0 für 5 – 7 Zelllagen, Score 1 für 8 – 15 Zelllagen und Score 2 für > 15 Zelllagen.

4. Vorhandensein einer Keratinschicht auf der Epithelschicht mit dem Score 0 für nicht vorhanden und dem Score 1 für vorhanden.
5. Vorhandensein von entzündlichen Veränderungen mit dem Score 0 für nicht vorhanden und dem Score 1 für vorhanden.
6. Veränderungen der Basalmembrandicke mit dem Score 0 für 1,0 – 2,0  $\mu\text{m}$ , dem Score 1 für 2,1 – 10,0  $\mu\text{m}$  und dem Score 2 für  $> 10,0 \mu\text{m}$

### 2.2.3.2 Elastika-van-Gieson-Färbung

Zur Beurteilung der elastischen Fasern wurde die Elastika-van-Gieson (EvG)-Färbung verwendet. Nachdem die Gewebeschnitte von dem Paraffin befreit wurden, folgte ein 30 min Bad in Resorcinfuchsinlösung (Lösung A). Die Schnitte werden 10 sek in HCl-Alkohol gespült und 5 min unter Leitungswasser gebläut. Danach wurden sie 5 min in Eisenhämatoxylin (Lösung B) getaucht und erneut unter Leitungswasser gebläut. Letztendlich wurden die Proben für 3 min in Picrofuchsin gelegt und durchliefen dann die aufsteigende Alkoholreihe.

Lösung A besteht aus: 10,0 g Hämatoxylin, 100 ml Ethanol (100 %) sowie 900 ml Ethanol (96 %)

Lösung B besteht aus: 950 ml Aqua bidest, 4 0 ml Eisen-III-chlorid Lösung (29 %) sowie 10 ml HCl (25 %) (Tabelle 2, 3, 4).

Folgende Parameter wurden mit dieser Methodik semiquantitativ und doppelblind untersucht:

1. Veränderungen an der Anordnung der elastischen Fasern mit dem Score 0 für: knäuelartige Anordnung, Score 1 für: strukturlose Anordnung und Score 2 für: bandförmige Anordnung.
2. Veränderungen an der Dichte der elastischen Fasern mit dem Score 0 für: geringe Faserdichte, Score 1 für: wenig Faserdichte, Score 2 für: physiologische Faserdichte und Score 3 für: vermehrte Faserdichte.
3. Zerstörungsgrad der elastischen Fasern mit dem Score 0 für: keine Destruktion, Score 1 für: geringe Destruktion, Score 2 für: mäßige Destruktion und dem Score für: vermehrte Destruktion.

### 2.2.3.3 Eisen-Färbung

Die Eisen (FE)-Färbung diente dem Nachweis von älteren Einblutungen in das Gewebe. Die Schnitte wurden 20 min an einem dunklen Ort in FE-Lösung (Ansatz 1) inkubiert, danach mit destilliertem Wasser gespült und 5 min in Kernechtrot (Ansatz 2) gebadet. Es folgte die aufsteigende Alkoholreihe.

Ansatz 1 besteht aus: 10,0 g Kaliumhexacyanoferat III gelöst in 500 ml Aqua bidest.

Ansatz 2 besteht aus: 50,0 g Aluminiumsulfat und 1,0 g Kernechtrot gelöst in 1 l Aqua bidest (Tabelle 2, 3, 4).

Folgende Kriterien wurden semiquantitativ und unabhängig von zwei Betrachtern bestimmt:

1. Vorhandensein von Eisen mit dem Score 0 für: Kein Eisen nachweisbar, Score 1 für: 1- 2 Stellen mit Eisen sowie Score 2 für: > 2 Stellen mit Eisen.

### 2.2.3.4 Picro-Sirius-Rot-Färbung

Zur besseren Beurteilung der Kollagenfasern im Gewebe der SL wurde die Sirius-Rot-Färbung angewandt. Mittels doppeltbrechendem chromatischem Licht lassen sich dann Kollagen Typ I (rot/gelb) und Typ III (grün/blau) voneinander unterscheiden.

Nachdem die Schnitte entparaffiniert waren, wurden diese für 60 min in die Sirius-Red Lösung gelegt, danach in HCL (0,01 N) ausgewaschen und 2 min in Fast-Green und Essigsäure (1 %) gebadet. Danach folgt das Auswaschen in Leitungswasser und die aufsteigende Alkoholreihe.

Ansatz Sirius-Red besteht aus: 0,1 g Direct Red 80 gelöst in 100 ml Pikrinsäure (1 %) auf pH 2 eingestellt mittels NaOH.

Ansatz Fast Green besteht aus 0,1 g Fast Green (0,1 %) gelöst in 100 ml Essigsäure (1 %) (Tabelle 2, 3, 4).

Semiquantitativ und unabhängig von zwei Betrachtern wurden folgende Strukturen beurteilt:

1. Veränderungen an der Anordnung der Kollagenfasern mit dem Score 0 für: strukturlose Anordnung, dem Score 1 für netzartige Anordnung sowie Score 2 für: wellenförmige / parallele Anordnung.

2. Veränderungen an der Vernetzung der Kollagenfasern mit dem Score 0 für: keine Faservernetzung, dem Score 1 für: geringe Faservernetzung, dem Score 2 für: mäßige Faservernetzung sowie dem Score 3 für: vermehrte Faservernetzung.
3. Veränderungen an der Dichte der Kollagenfasern mit dem Score 0 für: geringe Faserdichte, dem Score 1 für: wenig Faserdichte, dem Score 2 für: physiologische Faserdichte sowie Score 3 für: vermehrte Faserdichte.
4. Veränderungen an den Kollagenfasern Typ I mit dem Score 0 für: Vorhandensein von wenig Kollagen Typ I, mit dem Score 1 für: mäßiges Vorhandensein von Kollagen Typ I sowie dem Score 2 für: vermehrtes Vorhandensein von Kollagen Typ I.
5. Veränderungen an den Kollagenfasern Typ III mit dem Score 0 für: Vorhandensein von wenig Kollagen Typ III, mit dem Score 1 für: mäßiges Vorhandensein von Kollagen Typ III sowie dem Score 2 für: vermehrtes Vorhandensein von Kollagen Typ III.

### **2.2.3.5 Alcianblau-Färbung und Hyaluronsäure-Verdau**

Alcianblau färbt spezifisch Glykosaminoglykane, besonders HA, an. Als erstes folgte ein Bad in Alcianblau-Lösung für 20 min. Die Schnitte wurden gespült in destilliertem Wasser und 6 min in Kernechtrot inkubiert. Ausgewertet wurden 2 Serienschritte vor und nach Verdau mit Hyal. Der Verdau erfolgte an einem der beiden Gewebeschnitte vor der Färbung mit Alcianblau. Hierzu wurden die entparaffinierten Gewebeschnitte in einem Bad aus Hyal (Ansatz 2), gelöst in TBS, bei 37 °C im Brutschrank für 2 Stunden inkubiert. Danach wurden diese mit Alcianblau (Ansatz 1) gefärbt.

Ansatz 1 besteht aus: 0,5 g Alcianblau pH 2,5 (0,1 %) gelöst in 500 ml Essigsäure (3 %).  
Ansatz 2 besteht aus: 50,0 g Bovine Testicular Hyaluronidase gelöst in 100 ml TBS pH 7,4 (Tabelle 2, 3, 4).

Die Auswertung erfolgte digital. Hierzu wurden alle Gewebeschnitte mit einem Objektträger-Scanner (Olympus BX-REM CB) digitalisiert. Mit Hilfe von Olympus DotSlide 2.1 und Gimp 2.6.11 wurde das Dateiformat bearbeitet. Die Auswertung erfolgte mit Adobe Photoshop CS5, indem für die obere Schicht der LP 10 Kästchen mit der Größe von 225 Pixel<sup>2</sup>, insgesamt 2250 Pixel<sup>2</sup> (100 %), ausgeschnitten wurden. Für die mittlere Schicht wurden 10 Kästchen mit der Größe von 841 Pixel<sup>2</sup>, insgesamt 8410 Pixel<sup>2</sup> (100 %) ausgewählt. Die Durchführung erfolgte am unverdauten und verdauten Gewebeschnitt

möglichst an der gleichen Stelle. Die jeweils 10 isolierten Quadrate wurden quantitativ auf ihre Blaufärbung mit dem Programm Axiovision 3.1 von Zeiss untersucht. Mittels einer Farbpipette wurde dort das blau erscheinende Gewebe markiert und als Gesamtfläche ausgedrückt. Das erfolgte auch mit dem kongruenten Bild, welches vorher mit dem HA-Verdau behandelt wurde (Tabelle 2, 3, 4).

### **2.2.3.6 Immunhistochemie mit dem Antikörper CD34 zur Gefäßdarstellung**

Die Gewebeschnitte wurden entparafiniert, wie oben beschrieben. Nachdem die Präparate mit destilliertem Wasser gespült worden waren, folgte die fünfminütige Inkubation zur Blockung mit BSA (2 %) und für 30 min mit dem Primäantikörper CD 34 (1/400) zur Darstellung von Gefäßstrukturen. Danach wurden die Schnitte für 3 min mit TBS (Ansatz 1) gewaschen, und es folgte die Inkubation für 20 min mit dem Sekundäantikörper (Detektions-Kit). Zur Sichtbarmachung wurden die Präparate in alkalischer Phosphatase (Detektions-Kit) für 20 min inkubiert und mit Fast Red (Detektions-Kit) zweimal für 10 min sowie mit Hämalaun nach Mayer für 45 sek gefärbt. Anschließend erfolgte die dauerhafte Eindeckung. Ansatz 1 besteht aus: 12,1 g Tris, NaCl 17,53 g auf pH 7,4 eingestellt mittels HCl ( 37 %) (Tabelle 2, 3, 4).

## **2.3 Quantitative Bestimmung der Ribonukleinsäure-Expression**

### **2.3.1 Entparaffinierung und Ribonukleinsäure-Isolierung**

Die Ribonukleinsäure (RNA)-Isolierung erfolgte mittels RNeasy® Mini-Kit (50) der Firma Qiagen nach Protokoll des Herstellers. Als erstes wurden von jedem Paraffinblock 10 Schnitte mit einer Stärke von 10,0 µm mit einem Schlittenmikrotom hergestellt und in ein beschriftetes Eppendorf-Cup gegeben. Mehrmals wurde 60,0 °C warmes Isopropanol zur Entparaffinierung hinzugefügt. Anschließend wurden 600 µl vom Lysis-Puffer RLT-Puffer/β-Mercapto dazugegeben, die Proben gut gemixt und über Nacht bei -20,0 °C eingefroren. Nachdem das Gewebe aufgetaut und mit „Shreddersäulen“, aus dem jeweiligen Kit, zerkleinert wurde, erfolgten mehrmalige Abzentrifugationen bei 10.000 rpm und Waschvorgänge mit 700 µl RW1-Pufferlösung und zweimal mit 500 µl RPE-Pufferlösung. Die so gebundene RNA wurde mit 20 µl Rnase-freiem Wasser aus dem Filter gelöst bei 13.000 rpm zentrifugiert und bei -80,0 °C gelagert (Tabelle 2, 3, 4).



### 2.3.2 Reverse Transkription

Die Umschreibung der RNA erfolgte mittels Omniscript® RT Kit (50) der Firma Qiagen gemäß den Herstellerangaben. Die genomische DNA Elimination wurde bei 42,0 °C für 2 min im Thermocycler durchgeführt. Die Reaktion wurde unterbrochen, indem die Proben sofort auf Eis gestellt wurden. Danach folgte die reverse Transkription gemäß den Angaben für 15 min bei 42,0 °C und 3 min bei 95,0 °C. Anschließend wurden die Proben bei 4,0 °C gehalten und mit H<sub>2</sub>O auf eine gesamte Konzentration von 500,0 ng aufgefüllt. Die c-DNA wurde bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert (Tabelle 2, 3, 4).

### 2.3.3 Real-Time Polymerasekettenreaktion

Mittels Real-Time Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) wurden die HA-Synthasen HAS-1, -2, -3 und die Hyaluronidasen Hyal-1 und -2 untersucht. Die Auftragung erfolgte in 8er-Streifen, jeweils für 16 Patienten pro Ansatz in einfacher Bestimmung und einer Negativ-Kontrolle, in welcher die Menge an cDNA durch H<sub>2</sub>O ersetzt wurde. Zusätzlich wurde für jede PCR das „Housekeeping-Gen“ (ARP) pro Patient bestimmt. SYBR® Green 1 wurde als Fluoreszenzfarbstoff verwendet (Tabelle 2, 3, 4, 5).

Ansatz pro Cup in einem 8er Streifen: 10 µl Syber Green, 0,15 µl Primer forward, 0,15 µl Primer reverse, 4,70 µl RNase freies H<sub>2</sub>O und 5,00 µl cDNA (Tabelle 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9).

Tabelle 5: Protokoll für ARP

| Protokoll für ARP pro CUP im 8er Streifen: |        |                                      |        |
|--|--------|--------------------------------------|--------|
| 1. Zyklus 95,0 °C                          | 15 min | Auftrennung der DNA                  | 1x     |
| 2. Zyklus:                                 |        | Denaturierung                        |        |
| 95,0 °C                                    | 30 sek |                                      |        |
| 59,0 °C                                    | 30 sek |                                      | 40x    |
| 72,0 °C                                    | 30 sek |                                      |        |
| 3. Zyklus 70,0 °C                          | 10 sek | Anlagerung der Primer und Elongation | 50x    |
| 4. Zyklus 4,0 °C                           |        |                                      | Halten |
| Primer forward (ARP):                      |        | 5` - CGACCTGGAAGTCCA ACTAC -3        |        |
| Primer reverse (ARP):                      |        | 5` - ATCTGCTGCATCTGCTTG -3           |        |

Tabelle 6: Protokoll für Hyaluronsynthase-1

| Protokoll für Hyaluronsynthase-1: |        |                                      |        |
|-----------------------------------|--------|--------------------------------------|--------|
| 1. Zyklus 95,0 °C                 | 15 min | Auftrennung der DNA                  | 1x     |
| 2. Zyklus:                        |        | Denaturierung                        |        |
| 95,0 °C                           | 30 sek |                                      | 40x    |
| 58,0 °C                           | 1 min  |                                      |        |
| 72,0 °C                           | 30 sek |                                      |        |
| 3. Zyklus 60,0 °C                 | 10 sek | Anlagerung der Primer und Elongation | 80x    |
| 4. Zyklus 4,0 °C                  |        |                                      | Halten |
| Primer forward (HAS-1):           |        | 5'- GGAATAACCTCTTGCAGCAGTTTC -3'     |        |
| Primer reverse (HAS-1):           |        | 5'- GCCGGTCATCCCCAAAAG -3'           |        |

Tabelle 7: Protokoll für Hyaluronsynthase-2

| Protokoll für Hyaluronsynthase-2: |        |                                      |        |
|-----------------------------------|--------|--------------------------------------|--------|
| 1. Zyklus 95,0 °C                 | 15 min | Auftrennung der DNA                  | 1x     |
| 2. Zyklus:                        |        | Denaturierung                        |        |
| 95,0 °C                           | 30 sek |                                      | 40x    |
| 54,0 °C                           | 1 min  |                                      |        |
| 72,0 °C                           | 30 sek |                                      |        |
| 3. Zyklus 60,0 °C                 | 10 sek | Anlagerung der Primer und Elongation | 80x    |
| 4. Zyklus 4,0 °C                  |        |                                      | Halten |
| Primer forward (HAS-2):           |        | 5'- TCGCAACACGTAACGCAAT -3'          |        |
| Primer reverse (HAS-2):           |        | 5'- ACTTCTCTTTTCCACCCCATTT -3'       |        |

Tabelle 8: Protokoll für Hyaluronsynthase-3

| Protokoll für Hyaluronsynthase-3: |        |                                      |        |
|-----------------------------------|--------|--------------------------------------|--------|
| 1. Zyklus 95,0 °C                 | 15 min | Auftrennung der DNA                  | 1x     |
| 2. Zyklus:                        |        | Denaturierung                        |        |
| 95,0 °C                           | 30 sek |                                      | 40x    |
| 56,0 °C                           | 1 min  |                                      |        |
| 72,0 °C                           | 30 sek |                                      |        |
| 3. Zyklus 60,0 °C                 | 10 sek | Anlagerung der Primer und Elongation | 80x    |
| 4. Zyklus 4,0 °C                  |        |                                      | Halten |
| Primer forward (HAS-3):           |        | 5'- AACAAGTACGACTCATGGATTTCCT -3'    |        |
| Primer reverse (HAS-3):           |        | 5'- GCCCGCTCCACGTTGA -3'             |        |

Tabelle 9: Protokoll für Hyaluronidase-1 und -2

| Protokoll für Hyaluronidase-1 und -2 |        |                                    |        |
|--------------------------------------|--------|------------------------------------|--------|
| 1. Zyklus 95,0 °C                    | 15 min | Auftrennung der DNA                | 1x     |
| 2. Zyklus:                           |        | Denaturierung                      |        |
| 95,0 °C                              | 30 sek |                                    | 40x    |
| 60,0 °C                              | 1 min  |                                    |        |
| 72,0 °C                              | 30 sek |                                    |        |
| 3. Zyklus 60,0 °C                    | 10 sek | Anlagerung der Primer, Elongation  | 80x    |
| 4. Zyklus 4,0 °C                     |        |                                    | Halten |
| Primer forward (Hyal-1):             |        | 5'-GATGTCAGTGTCTTCGATGTGGTA-3'     |        |
| Primer reverse (Hyal-1):             |        | 5'-GGGAGCTATAGAAAATTGTCATGTCA-3'   |        |
| Primer forward (Hyal-2):             |        | 5'-CTAATGAGGGTTTTGTGAACCAGAATAT-3' |        |
| Primer reverse (Hyal-2):             |        | 5'-GCAGAATCGAAGCGTGGATAC-3'        |        |

So konnte der ct-Wert (=Schwellenwert-Zyklus) des Zielgens bestimmt werden, an dem die DNA Amplifikation exponentiell beginnt. Bei diesem Wert steigt erstmals die Fluoreszenz des Farbstoffes SYBR® Green signifikant über die Hintergrundfluoreszenz. Ermittelt wurde die Genexpression durch folgende Formel:  $y = 2^{-\Delta Ct}$ ,  $\Delta Ct$  berechnete sich aus dem Schwellenwert des gesuchten Gens minus dem Schwellenwert des Standard- bzw. Housekeeping-Gen (ARP).

## 2.4 Statistische Analysen

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte unter Mitwirkung von Frau Dr. Imme Haubitz mit Hilfe des Computerprogramms MEDAS (C. Grund, Margetshöchheim).

Die Dependenz von zwei klassifizierten Variablen wurde mit dem Chi-Quadrat-Test nach der Maximum-Likelihood-Methode verifiziert. Bei niedrigen Erwartungswerten wurde mittels 4-Felder-Tafel der genaue Chi-Quadrat-Test nach Fischer und Yates errechnet sowie nach Mehta und Patel bei größeren Tafeln. Um zwei Gruppen zueinander zu vergleichen, wurde der U-Test nach Mann und Whitney verwendet, da keine Gaußsche Normalverteilung der Werte angenommen werden kann. Als Signifikanzniveau wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von fünf Prozent ( $p < 0,05$ ) vorgegeben.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Gewebekollektiv, Geschlecht und Alter

Die Proben für die lichtmikroskopische Untersuchung stammten aus dem Zeitraum 2006 – 2012 aus der UMG. Für die Untersuchungen in der EZM der LP wurden max. 57 Proben, von 50 Patienten ( $n = 41$  weiblich und  $n = 9$  männlich) mit einem klinisch und histologisch nachgewiesenen RE begutachtet. Zusätzlich wurde ein Vergleichskollektiv aus max. 60 Proben von 55 Patienten ( $n = 23$  weiblich und  $n = 32$  männlich) mit anderen pathologischen Veränderungen (Nicht-Reinke-Ödem) an der SL untersucht (vgl. Tabelle 10).

Tabelle 10: Verteilung der N-RE -Veränderungen im Vergleichskollektiv

| Pathologie      | Probenanzahl | Patientenzahl |
|-----------------|--------------|---------------|
| Hyperplasie     | 25           | 20            |
| Leukoplakie     | 22           | 21            |
| SL-Polyp        | 5            | 5             |
| Retentionszyste | 3            | 4             |
| Fibrose         | 2            | 2             |
| Papillom        | 1            | 1             |
| Chron. Ulcus    | 1            | 1             |
| Ca in situ      | 1            | 1             |
| Reinke-Ödem     | 57           | 50            |

Die Geschlechterverteilung zwischen den beiden Kollektiven ist statistisch signifikant ( $p_c = 0,000017$ ) für die RE-Patienten das weibliche und für das Vergleichskollektiv das männliche Geschlecht. Im Mittelwert sind die Reinke-Patienten 55,7 Jahre und das Vergleichskollektiv 59,5 Jahre alt. Der Altersunterschied von 3,8 Jahren ist statistisch nicht signifikant ( $p_u = 0,076$ ).

### 3.2 Klinischer und histologischer Befund der Stimmlippe, Rauchverhalten und Risikofaktoren bei RE-Patienten

Bei den RE-Patienten traten im klinischen laryngoskopischen Befund hauptsächlich hochgradige Ödembefunde auf (Abbildung 12).

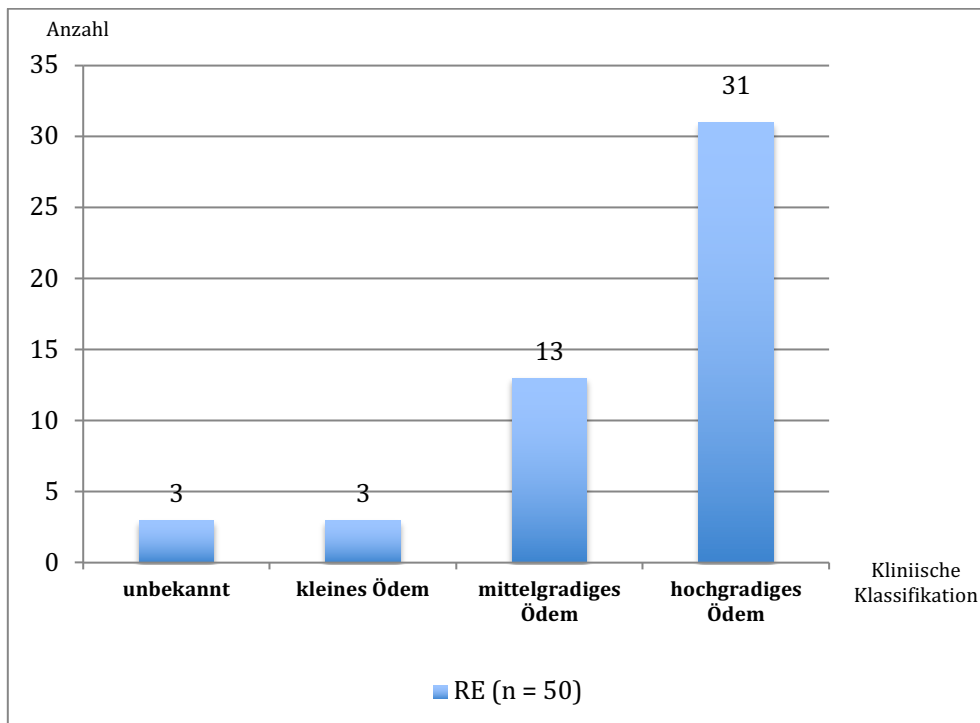


Abbildung 12: Verteilung des klinischen Befundes bei Patienten mit einem Reinke-Ödem

Das histologische Ödemausmaß war in der oberen LP gering. Dort sind hauptsächlich aufgelockerte Gewebestrukturen zu finden. In der mittleren LP dagegen war das Ödemausmaß deutlich erkennbar (Abbildung 13). Hier sah man großflächige Lakunen, die das Gewebe verdrängten (Abbildung 14). Es gibt keine statistischen Signifikanzen zwischen der klinischen Klassifikation des RE und der histologischen Klassifikation des RE sowohl für die obere LP ( $p = 0,72$ ) als auch für die mittlere LP ( $p = 0,10$ ).

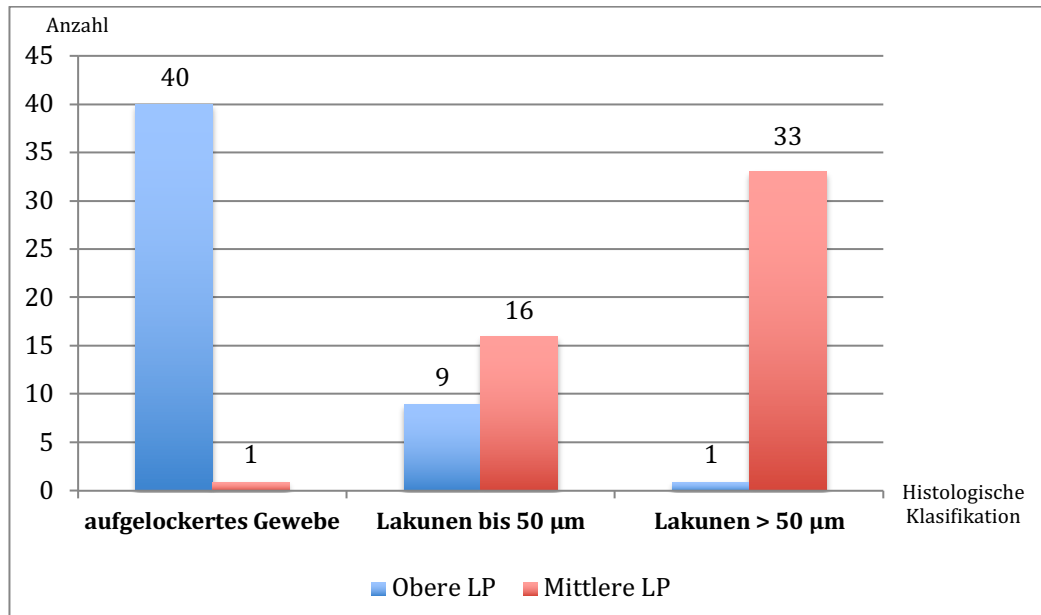


Abbildung 13: Histologisches Ödemausmaß für die obere und mittlere LP bei den Reine-Ödem Patienten

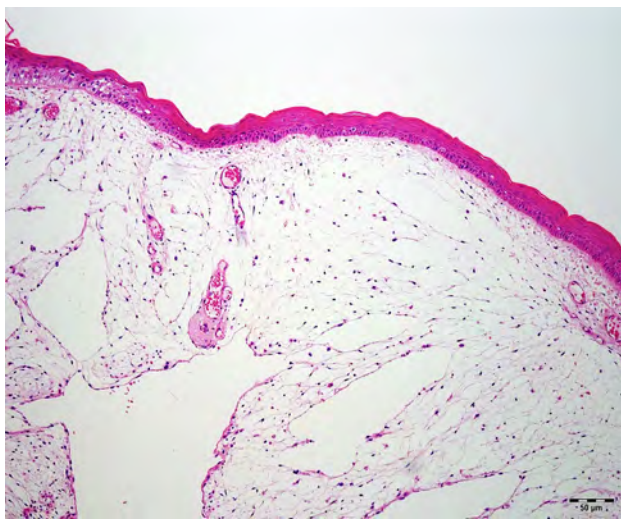


Abbildung 14: Reine-Ödem mit leichter Gewebeflockung in der oberen LP und großen Lakunen in der mittleren LP, 10x Vergrößerung in HE-Färbung

Die meisten RE-Patienten rauchen zwischen 10 und 20 Zigaretten am Tag (Abbildung 15).

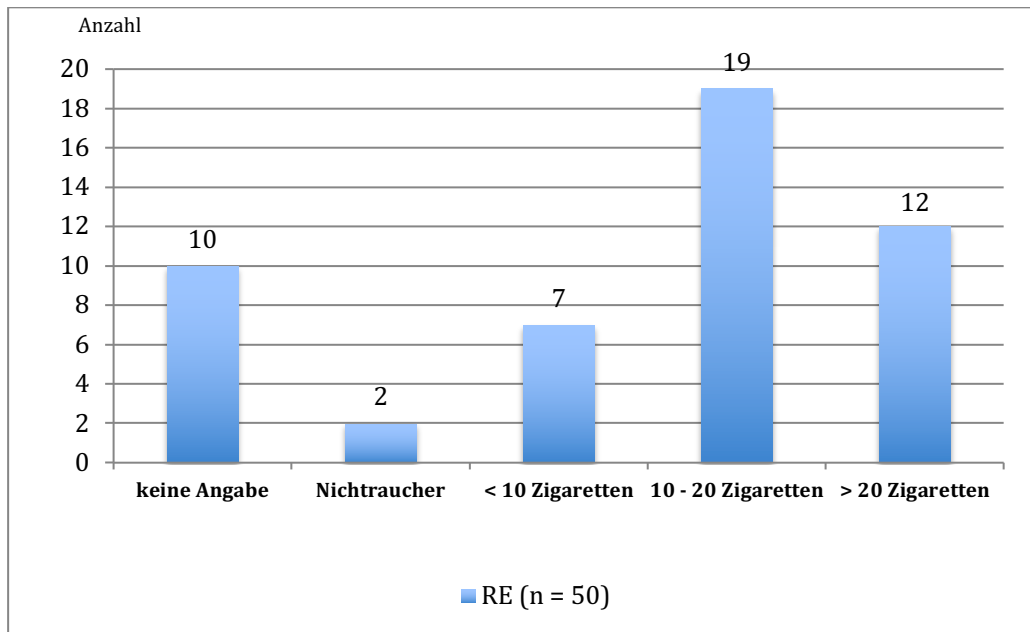


Abbildung 15: Rauchverhalten der RE-Patienten in Zigaretten pro Tag

Eine hohe Stimmbelastung zeigte sich nur bei 8 von 50 RE-Patienten. Ein ösophagaler Reflux wurde nur bei 10 von 50 Patienten nachgewiesen.

### 3.3 Untersuchungen der Hyaluronsäure in der Lamina propria

Es wurden 50 Patientenproben mit einem klinisch und histologisch nachgewiesenen RE untersucht. Das Vergleichskollektiv bestand aus 55 Patienten. Bei Patienten mit einem RE war mehr HA in der oberen und mittleren LP vorhanden als in den Kontrollproben (Abbildung 16, 17, 18). Bei Patienten mit einem RE zeigte die obere Schicht der LP eine Konzentration im Median von 36,96 % HA und die mittlere Schicht der LP 45,74 % (Abbildung 18). Im Vergleichskollektiv zeigten sich im Median in der oberen Schicht der LP mit 3,27 % und in der mittleren Schicht der LP mit 3,02 % insgesamt geringere Konzentrationen an HA (Abbildung 18). Es zeigte sich eine statistische Signifikanz zwischen den Patienten mit einem RE und dem Vergleichskollektiv für beide Schichten ( $p = 0,000005$ ). Es gibt keine Abhängigkeit zwischen dem Alter der Patienten und der Menge an HA in der LP (Abbildung 20).

Männer mit einem RE zeigten in der oberen LP im Median ( $1091 \text{ Pixel}^2$ ) mehr HA als Frauen ( $799 \text{ Pixel}^2$ ). Dagegen zeigten in der mittleren LP im Median Frauen ( $4634,5 \text{ Pixel}^2$ ) mehr HA als Männer ( $3423 \text{ Pixel}^2$ ) (Abbildung 19).

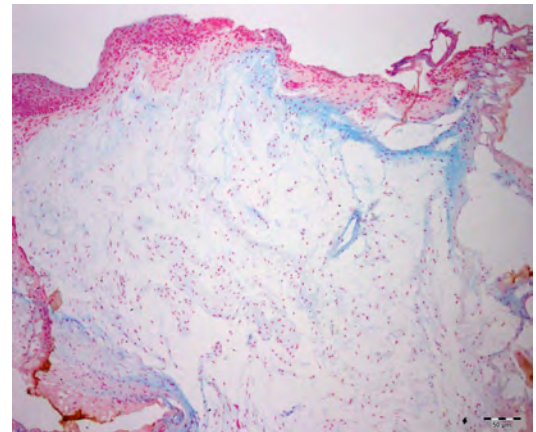
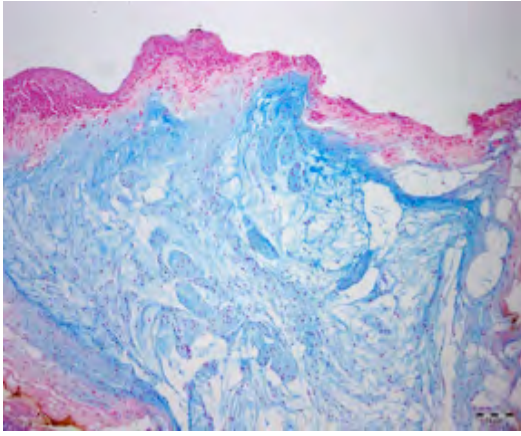


Abbildung 16: Reinke-Ödem ohne Hyaluronidase (links), Reinke-Ödem mit Hyaluronidase behandelt (rechts), in 10x Vergrößerung und Alcianblau-Färbung

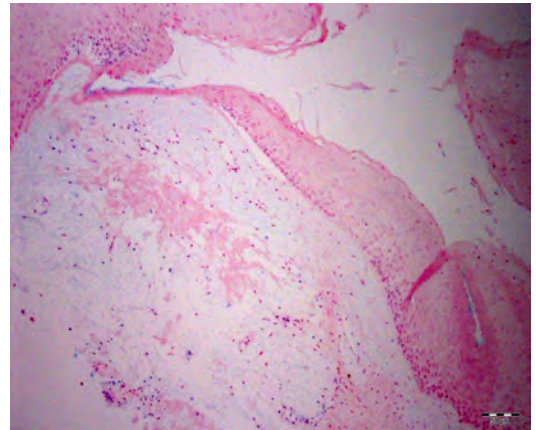
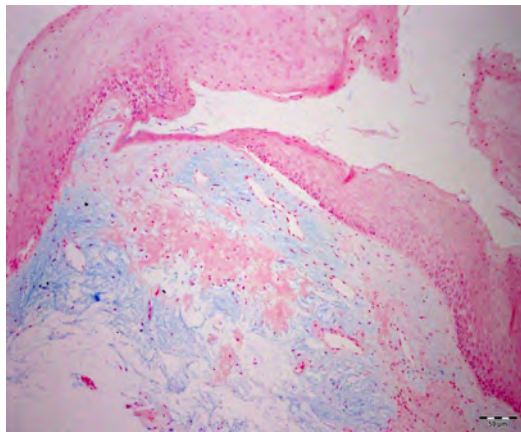


Abbildung 17: Stimmlippenpolyp ohne Hyaluronidase (links), Stimmlippenpolyp mit Hyaluronidase behandelt (rechts), in 10x Vergrößerung und Alcianblau-Färbung

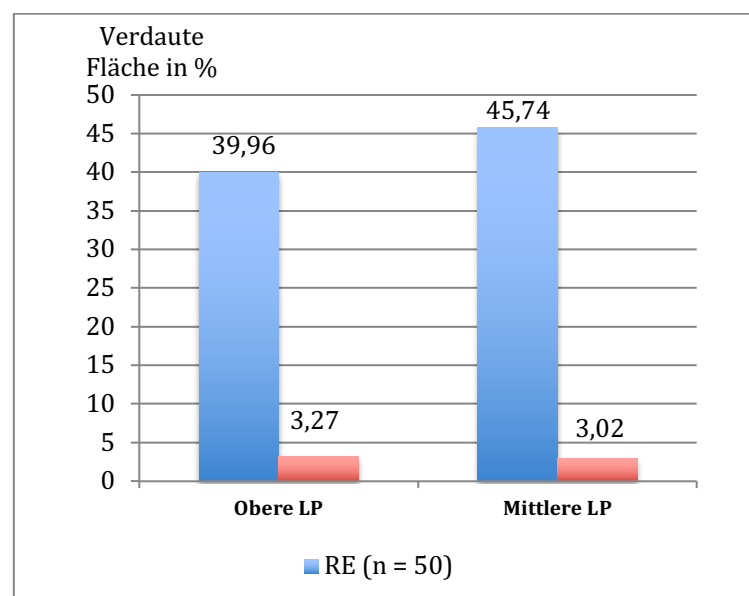


Abbildung 18: Verteilung der HA in der LP im Medianwert



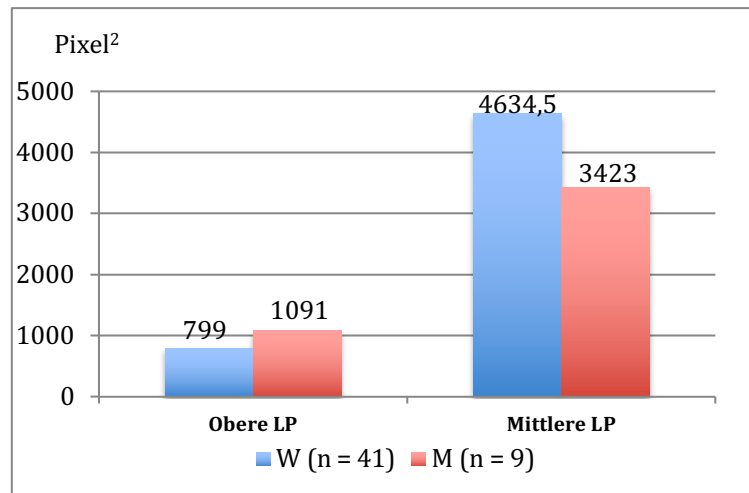


Abbildung 19: Geschlechtsspezifische Verteilung der HA in der LP bei Patienten mit RE

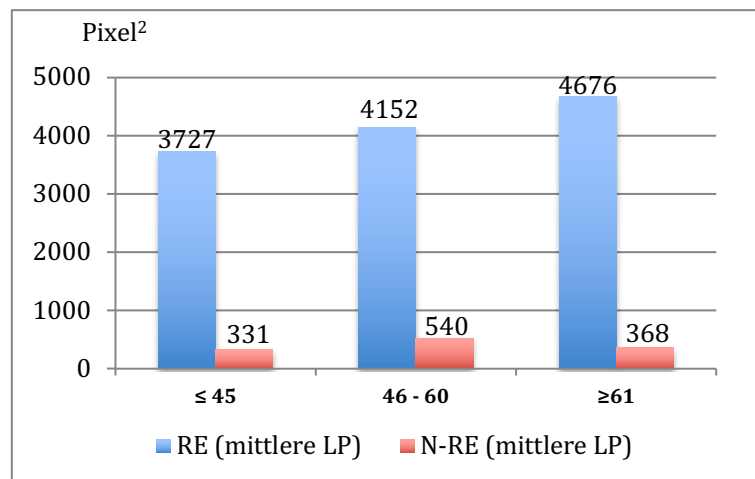


Abbildung 20: Altersabhängige Verteilung der HA in der mittleren LP

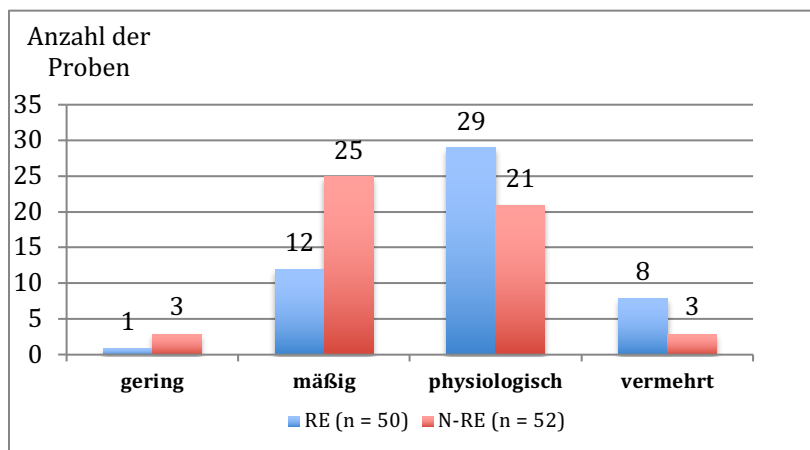
### 3.4 Untersuchungen der Kollagenfasern in der Lamina propria

Für die Begutachtung der Kollagenfaserqualität und -quantität wurden 57 Proben von 50 Patienten mit einem klinisch und histologisch nachgewiesenen RE untersucht. Als Vergleichskollektiv standen 57 Proben von 53 Patienten mit N-RE Veränderungen zur Verfügung.

**Tabelle 11: Auswertung der Kollagenfaserqualität und -quantität in der oberen und mittleren LP von RE-Patienten und N-RE-Patienten**

| <b>Obere Schicht der LP</b>    |                    |                          |                                 |
|--------------------------------|--------------------|--------------------------|---------------------------------|
|                                | <b>RE (n = 50)</b> | <b>Nicht RE (n = 53)</b> | <b>Statistische Signifikanz</b> |
| Anordnung                      | Parallel           | Parallel                 | p = 0,014                       |
| Faserdichte                    | Physiologisch      | Physiologisch-Stark      | p = 0,025                       |
| Vernetzung                     | Mäßig              | Gering                   | p = 0,00000001                  |
| Typ I                          | Viel               | Viele Fasern             | p = 0,13                        |
| Typ III                        | Mäßig              | Mäßig                    | p = 0,40                        |
| <b>Mittlere Schicht der LP</b> |                    |                          |                                 |
|                                | <b>RE (n = 50)</b> | <b>Nicht RE (n = 53)</b> | <b>Statistische Signifikanz</b> |
| Anordnung                      | Netzartig          | Netzartig                | p = 0,011                       |
| Faserdichte                    | Mäßig              | Physiologisch            | p = 0,0000001                   |
| Vernetzung                     | Gering             | Mäßig                    | p = 0,0000086 <sub>mp</sub>     |
| Typ I                          | Wenig-mäßig        | Mäßig                    | p = 0,00098                     |
| Typ III                        | Wenig-mäßig        | Viel                     | p = 0,0000048                   |

Sowohl bei den RE-Patienten als auch im Vergleichskollektiv zeigte sich ein bandartige Anordnung der Kollagenfasern in der oberen LP (p = 0,014) (vgl. Tabelle 11). Die Dichte an Kollagenfasern in der oberen LP bei RE-Patienten war physiologisch (p = 0,025) (Abbildung 21).



**Abbildung 21 : Kollagenfaserdichte in der oberen LP bei RE- und N-RE-Patienten**

In der mittleren LP zeigte sich eine geringere Dichte an Kollagenfasern bei den Patienten mit RE (p = 0,025), im Vergleich zum Vergleichskollektiv (p = 0,0000001) und zur oberen LP (p = 0,00000005) (Abbildung 22, 29).

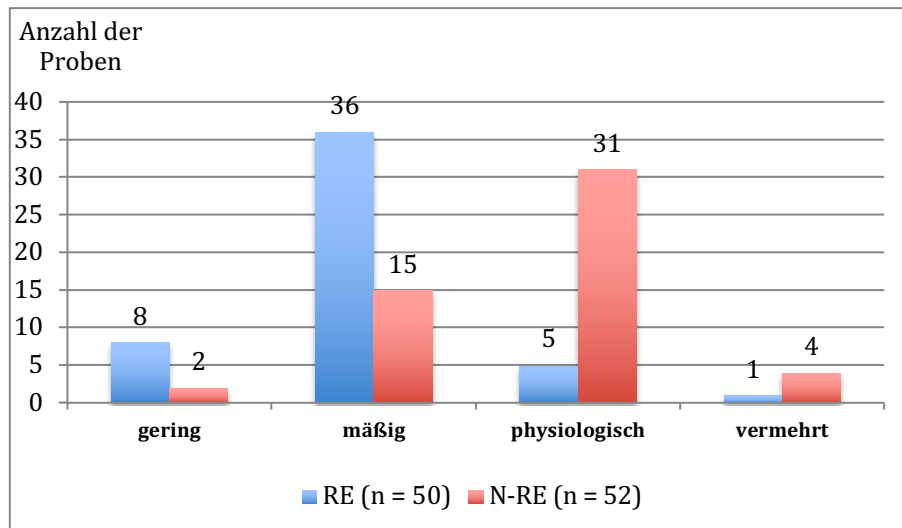


Abbildung 22: Kollagenfaserdichte in der mittleren LP bei RE- und N-RE-Patienten

Die Vernetzung der Kollagenfasern in der oberen LP zeigte sich mäßig bei den RE-Patienten und gering ausgeprägt bei dem Vergleichskollektiv ( $p = 0,00000001$ ) (Abbildung 23, 29).

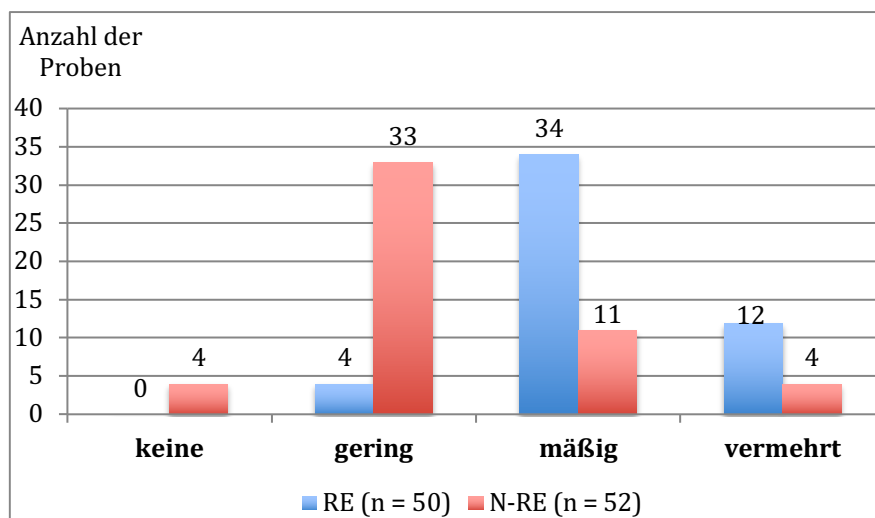


Abbildung 23: Vernetzung der Kollagenfasern in der oberen LP bei RE- und N-RE-Patienten

Die mittlere LP zeigte bei den RE-Proben im Verhältnis zur oberen LP eine geringere Vernetzung ( $p = 0,00000005$ ) und auch im Vergleich zum N-RE-Kollektiv ( $p = 0,0000086_{mp}$ ) (Abbildung 24, 29).

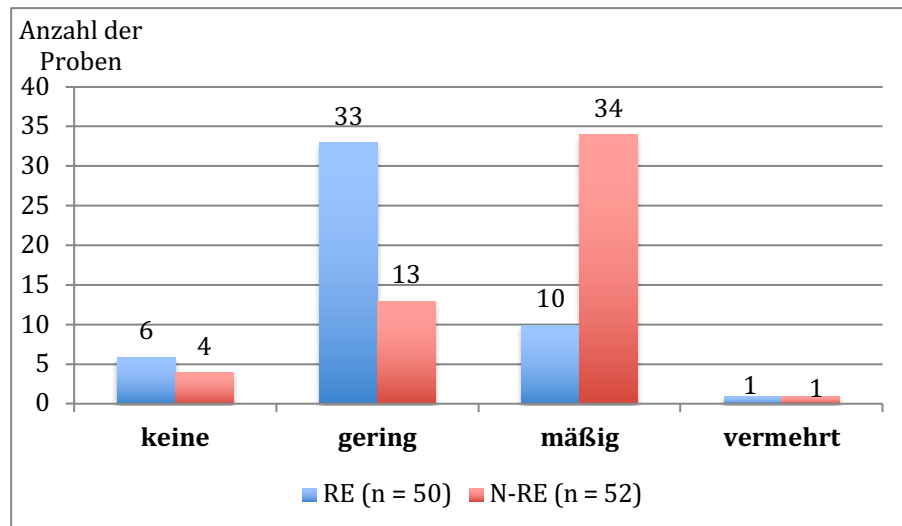


Abbildung 24: Vernetzung der Kollagenfasern in der mittleren LP bei RE und N-RE-Patienten

Die Verteilung von Kollagen Typ I war in der oberen LP bei Patienten mit einem RE ähnlich dem Vergleichskollektiv ( $p = 0,13$ ) (Abbildung 25).

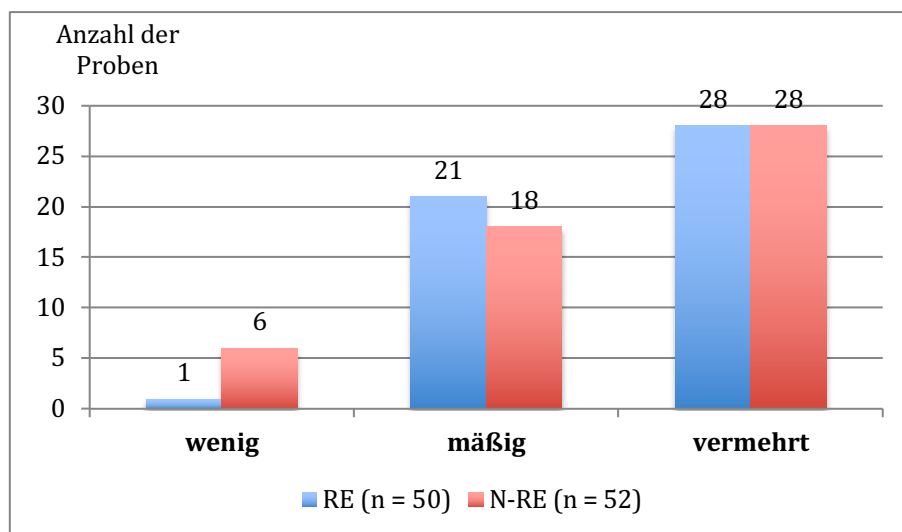


Abbildung 25: Verteilung der Kollagenfasern Typ I in der oberen LP bei RE und N-RE-Patienten

In der mittleren LP war im RE-Kollektiv weniger Kollagen von der Qualität Typ I zu finden im Vergleich zu der oberen LP ( $p = 0,081$ ) (Abbildung 26). Das Vergleichskollektiv zeigte auch mehr Kollagen Typ I in der mittleren LP ( $p = 0,00098$ ) (Abbildung 26, 30).

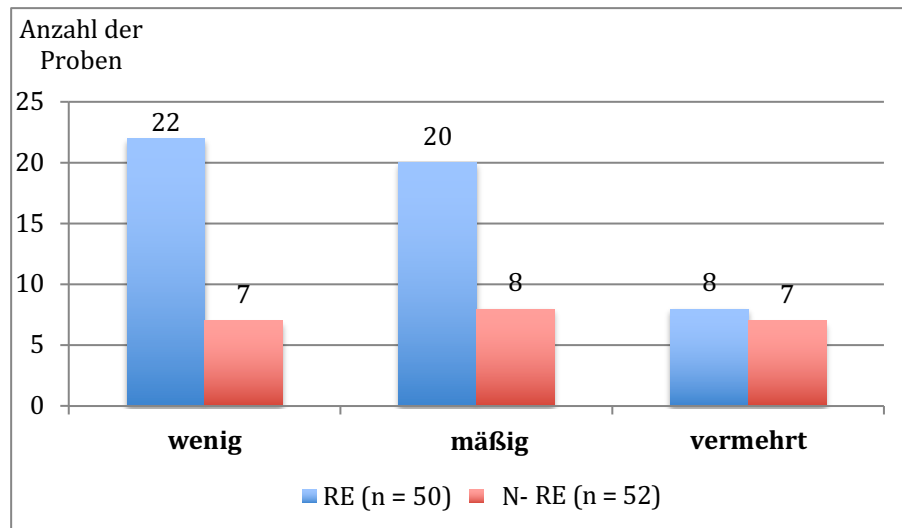


Abbildung 26: Verteilung der Kollagenfasern Typ I in der mittleren LP bei RE und N-RE-Patienten

Das Vorhandensein von Kollagen Typ III in der oberen LP war in bei dem N-RE Kollektiv vermehrt ( $p = 0,40$ ) (Abbildung 27, 30).

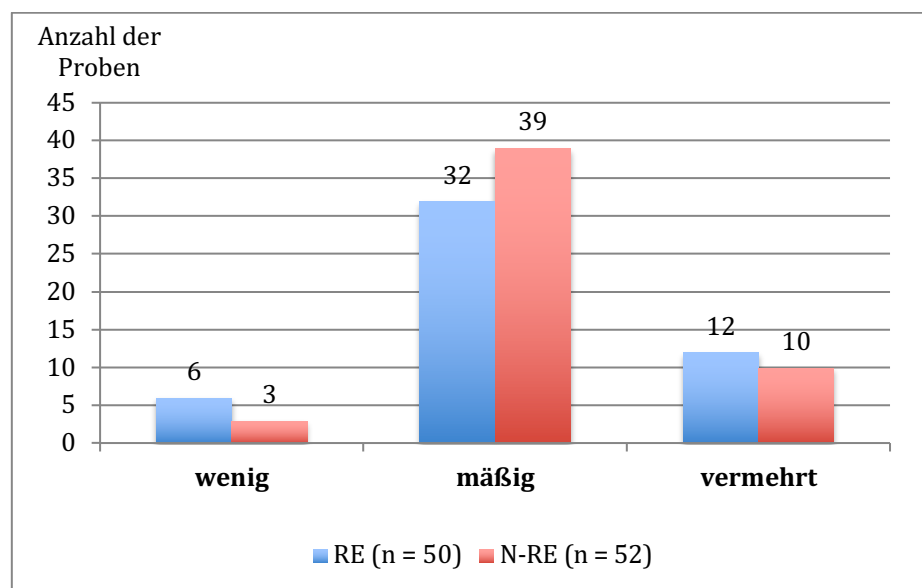


Abbildung 27: Verteilung der Kollagenfasern Typ III in der oberen LP bei RE und N-RE-Patienten

In der mittleren LP war bei den RE-Patienten weniger Kollagen Typ III vorhanden im Vergleich zu den anderen Pathologien ( $p = 0,0000048$ ) (Abbildung 28). Die Menge an Typ III im Verhältnis zur oberen LP war ähnlich ( $p = 0,000016$ ).

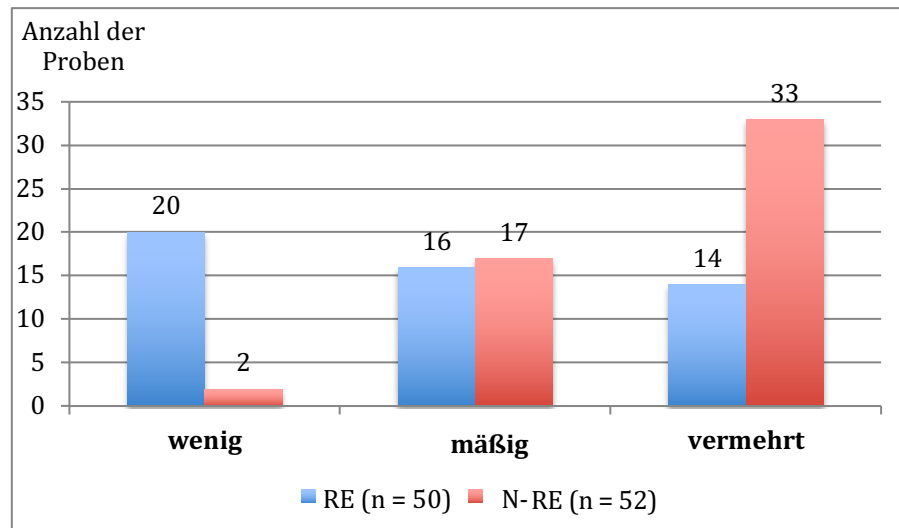


Abbildung 28: Verteilung der Kollagenfasern Typ III in der mittleren LP bei RE und N-RE-Patienten

Die Faserdichte und die Vernetzung der Kollagenfasern in der oberen LP korrelierten gut mit der klinischen Einteilung des RE ( $p = 0,00001$ ). Dagegen waren in der mittleren LP keine statistischen Zusammenhänge erkennbar für die Faserdichte ( $p = 0,62$ ) und die Vernetzung ( $p = 0,77$ ).

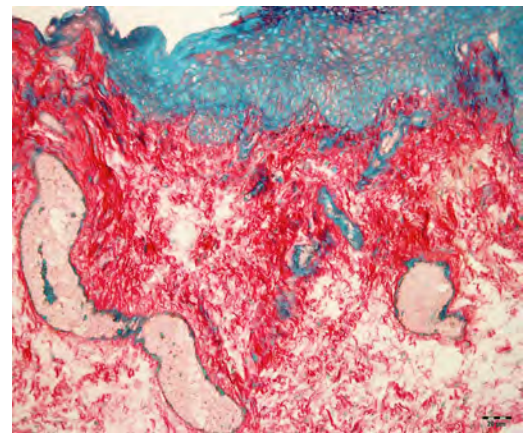
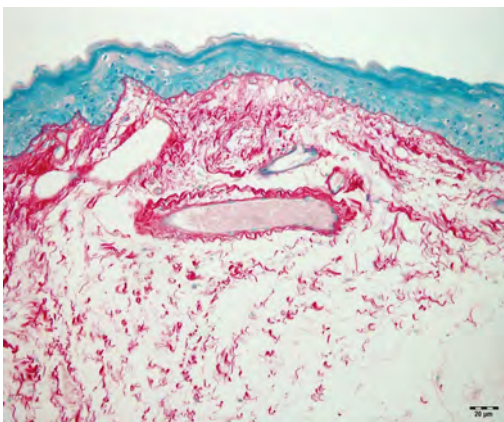


Abbildung 29 : Übersichtsaufnahme der Kollagenfasern eines RE (links) und einer Leukoplakie (rechts) in 10x Vergrößerung und Sirius-Red-Färbung

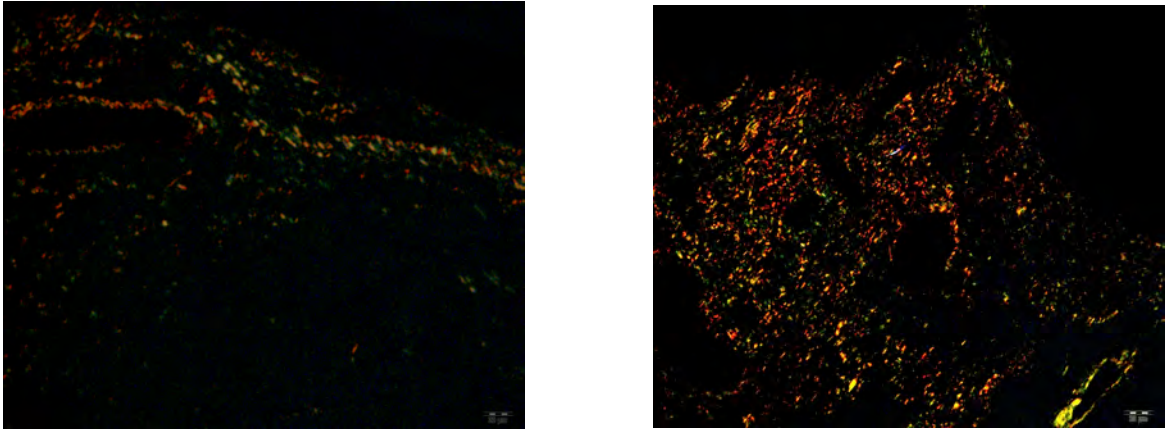


Abbildung 30: Kollagen Typ I (rot/gelb) und Kollagen Typ III (grün) beim RE (links) und bei einer Leukoplakie (rechts) in 10x Vergrößerung und Sirius-Red-Färbung

### 3.5 Untersuchungen der elastischen Fasern in der Lamina propria

Das RE Kollektiv besteht aus 57 Proben von 50 Patienten und das N-RE Kollektiv aus 58 Proben von 55 Patienten.

Tabelle 12: Ergebnisse der elastischen Fasern Auswertung in der oberen und mittleren LP bei RE und N-RE-Patienten

| <b>Obere Schicht</b>    |                    |                      |                                 |
|-------------------------|--------------------|----------------------|---------------------------------|
|                         | <b>RE (n = 50)</b> | <b>N-RE (n = 53)</b> | <b>Statistische Signifikanz</b> |
| Anordnung               | Strukturlos        | Strukturlos          | p = 0,044                       |
| Faserdichte             | Wenig              | Wenig                | p = 0,076                       |
| Destruktion             | Gering             | Mäßig                | p < 0,00000005                  |
| <b>Mittlere Schicht</b> |                    |                      |                                 |
|                         | <b>RE (n = 50)</b> | <b>N-RE (n = 53)</b> | <b>Statistische Signifikanz</b> |
| Anordnung               | Strukturlos        | Strukturlos          | p = 0,0019                      |
| Faserdichte             | Physiologisch      | Wenig                | p = 0,011                       |
| Destruktion             | Mäßig              | Mäßig                | p = 0,13                        |

Sowohl in der oberen (p = 0,044) als auch in der mittleren LP (p = 0,0019) zeigte sich in beiden Vergleichsgruppen kein Unterschied. Die elastischen Fasern waren strukturlos angeordnet (vgl. Tabelle 12).

Die Dichte an elastischen Fasern zeigte sich in der oberen LP in beiden Gruppen unverändert (p = 0,076 für RE bzw. p = 0,011 für die anderen Pathologien) (Abbildung 31, 35).

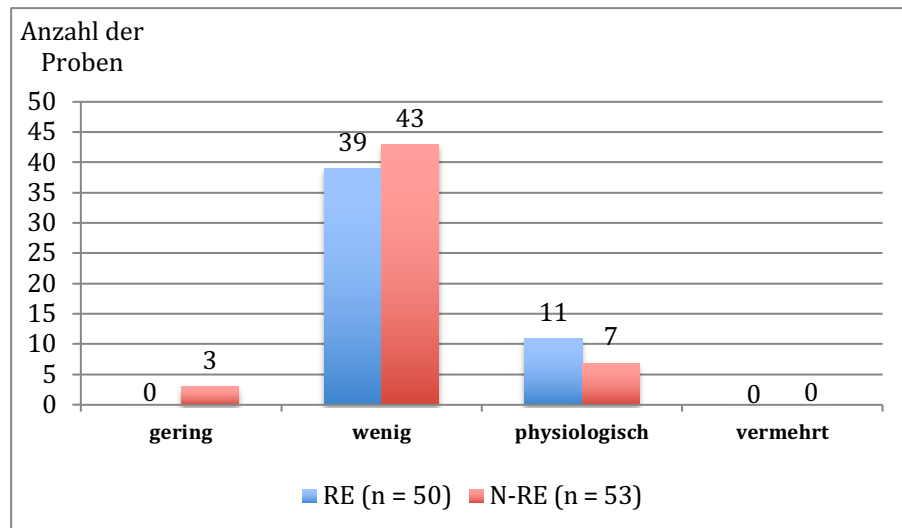


Abbildung 31: Faserdichte der elastischen Fasern in der oberen LP bei RE und N-RE-Patienten

Die Dichte an elastischen Fasern bei den RE-Patienten in der mittleren LP war physiologisch und höher als im Vergleichskollektiv ( $p = 0,011$ ) (Abbildung 32, 35).

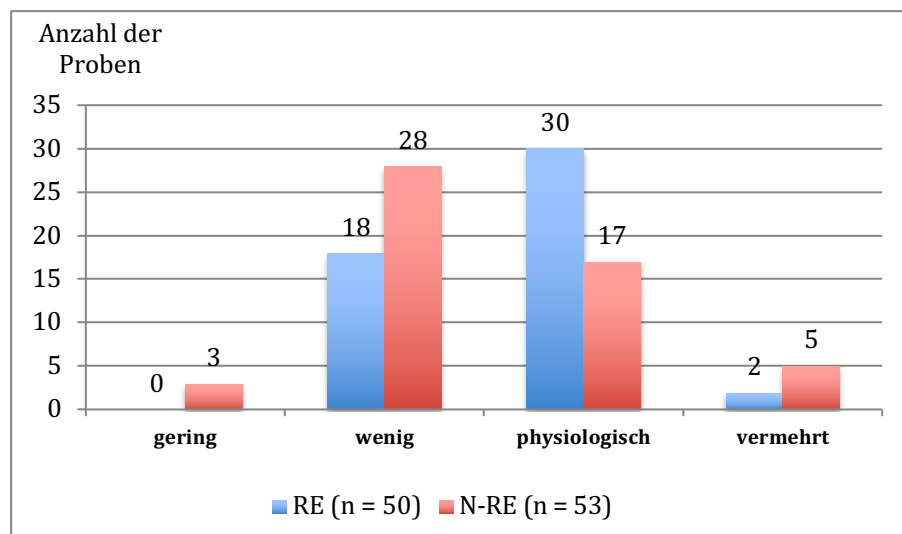


Abbildung 32: Faserdichte der elastischen Fasern in der mittleren LP bei RE und N-RE-Patienten

Die Destruktion der elastischen Fasern war in der oberen LP bei dem RE Kollektiv gering und höher bei den Vergleichsproben ( $p < 0,00000005$ ) (Abbildung 33, 35).



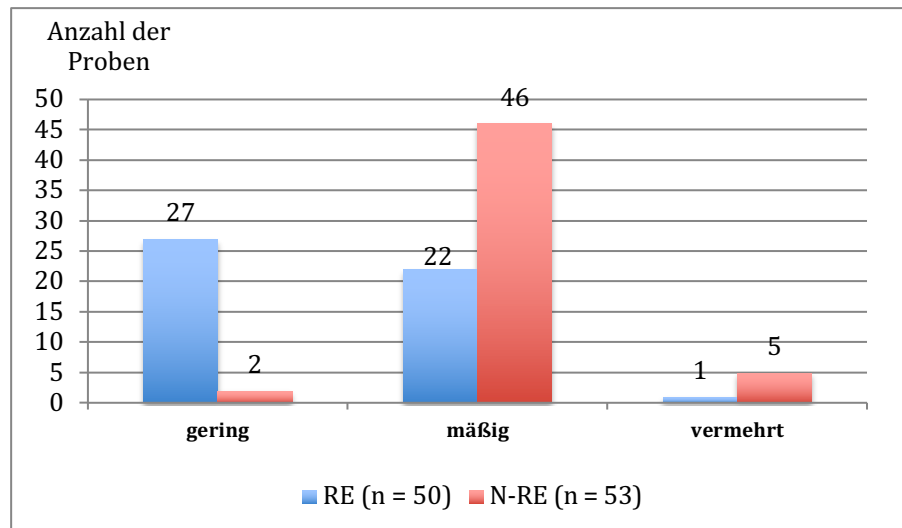


Abbildung 33: Faserdestruktion der elastischen Fasern in der oberen LP bei RE und N-RE-Patienten

In der mittleren LP zeigte sich eine mäßige Destruktion der elastischen Fasern in beiden Gruppen ( $p = 0,13$ ) (Abbildung 34, 35).

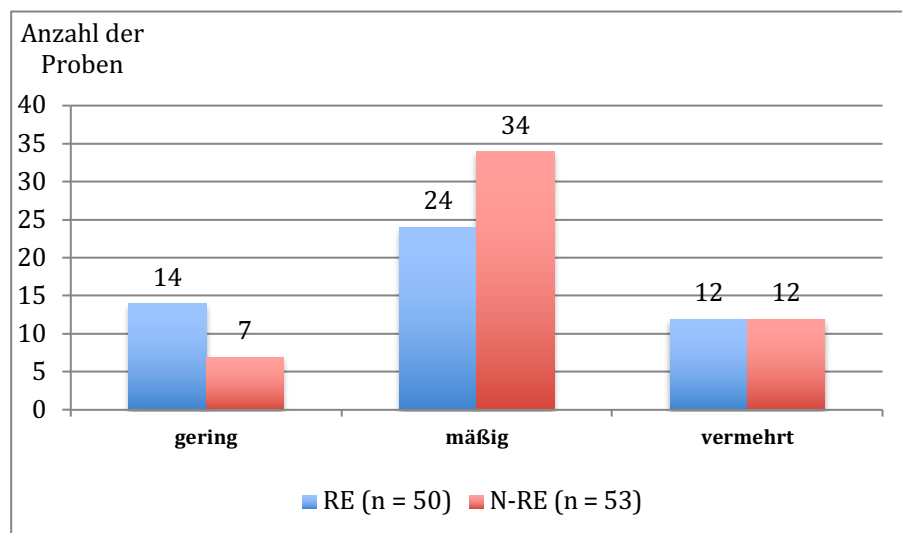


Abbildung 34: Faserdestruktion der elastischen Fasern in der mittleren LP bei RE und N-RE-Patienten

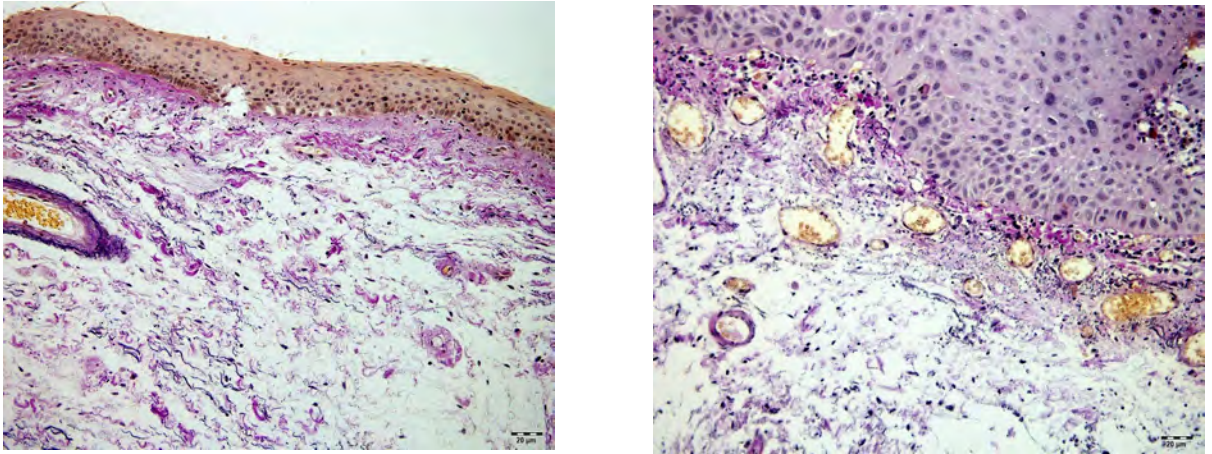


Abbildung 35: Elastische Fasern (schwarz) bei einem RE (links 10x Vergrößerung) und einer Leukoplakie (rechts 20x Vergrößerung), EvG-Färbung

### 3.6 Untersuchungen der epithelialen Deckschicht der Lamina propria

Untersucht wurden 57 Proben von 50 Patienten mit einem klinisch und histologisch nachgewiesenem RE sowie 59 Proben von 54 Patienten mit anderen pathologischen Veränderungen an der SL.

Die Anzahl an Epithelzellschichten war beim RE geringer (5 – 7 Zellschichten) als bei den anderen Pathologien, die eine deutliche Epithelzellhyperplasie von > 15 Zellschichten zeigten ( $p = 0,0000085$ ) (Abbildung 36). Beim RE zeigte sich eine verdickte Basalmembran > 10  $\mu\text{m}$  im Vergleich zum Vergleichskollektiv 1 – 2  $\mu\text{m}$  ( $p = 0,019$ ) (Abbildung 37).

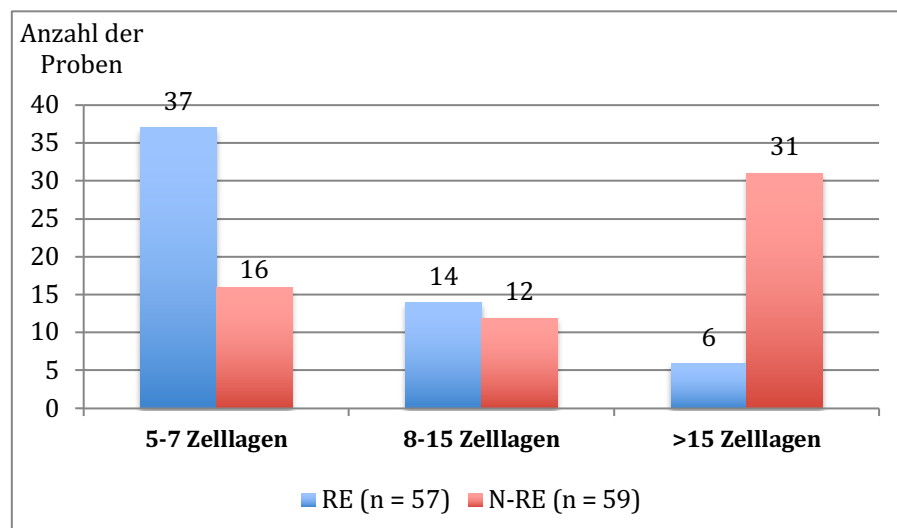


Abbildung 36: Zellhyperplasie der Epithelzellen bei RE- und N-RE-Patienten

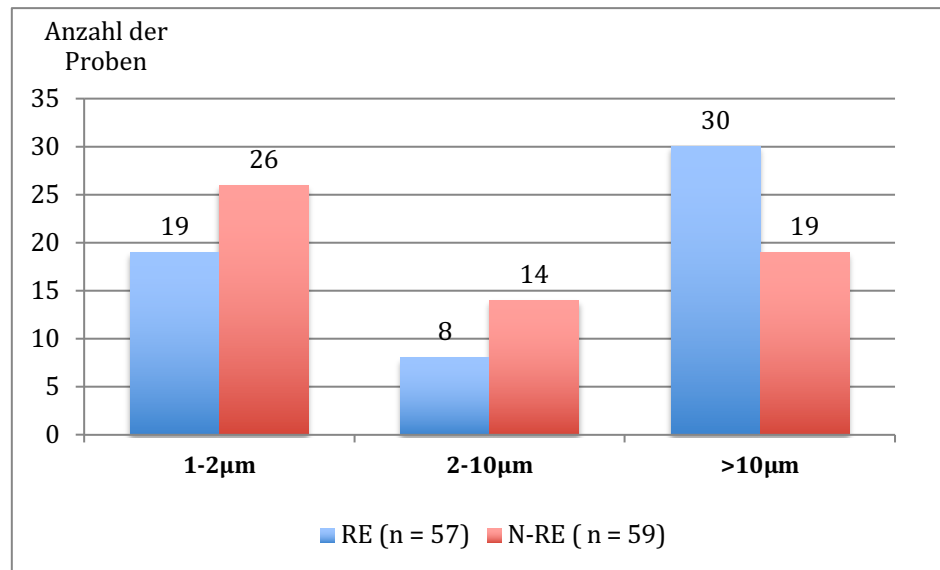


Abbildung 37: Dicke der Basalmembran bei RE- und N-RE-Patienten

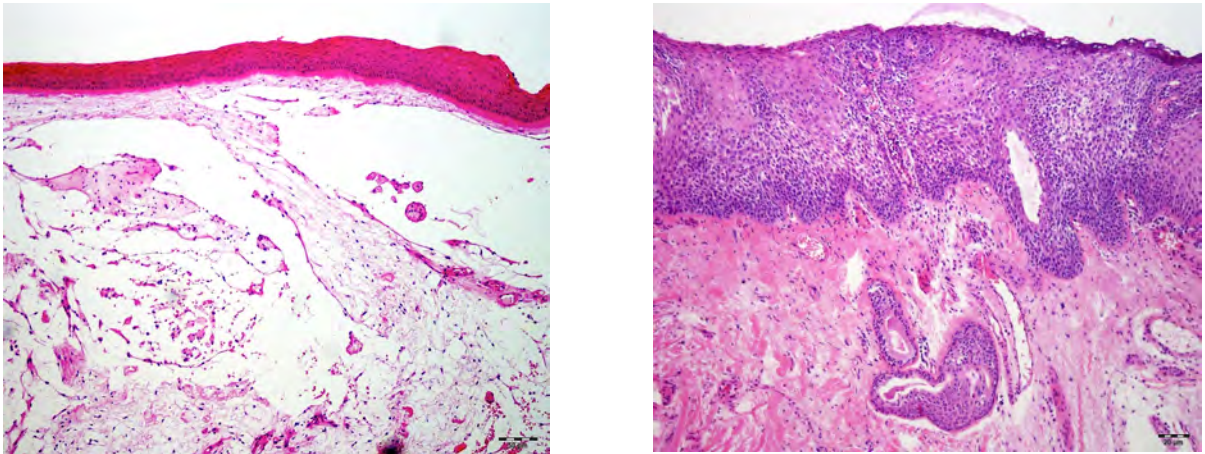


Abbildung 38: RE mit verbreiteter Basalmembran und physiologischer Epithelschichtstärke (links) und SL-Hyperplasie mit deutlicher Epithelzellschichthyperplasie und physiologischer Basalmembranstärke (rechts), 20x Vergrößerung und HE-Färbung

Eine vermehrte Zelldysplasie bzw. -atypie ( $p = 0,0082$ ), Keratinisierung der Epithelschicht ( $p = 0,0018$ ) und Entzündungsanzeichen ( $p = 0,0085$ ) traten häufiger im Vergleichskollektiv auf (Abbildung 38, 39, 40).

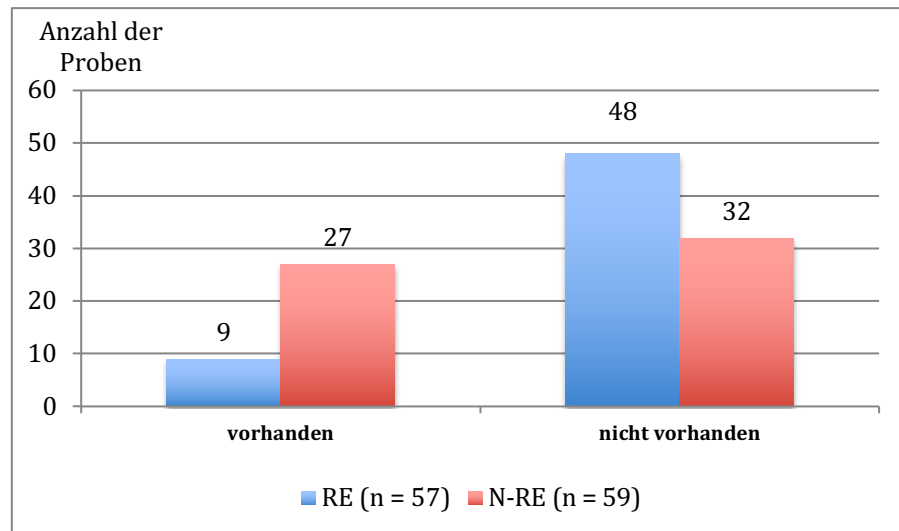


Abbildung 39: Deckschicht aus Keratin im Vergleich von RE- und N-RE-Patienten

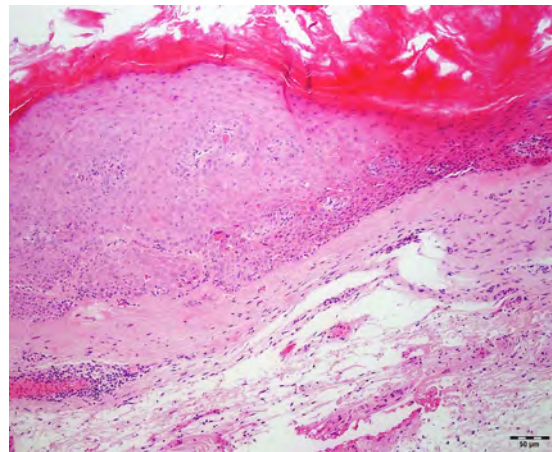


Abbildung 40: Leukoplakie mit Deckschicht aus Keratin und einer Zellhyperplasie, 10x Vergrößerung in HE-Färbung

### 3.7 Untersuchungen der vaskulären Struktur

Es wurden 50 Patienten mit einem RE und aus dem Vergleichskollektiv 55 Patienten mit anderen pathologischen Veränderungen untersucht. Hinsichtlich der Gefäßdichte zeigte sich kein großer Unterschied zwischen RE- und N-RE-Patienten. Bei den RE-Patienten waren im Median 14 Gefäße auf  $100.000 \mu\text{m}^2$  verteilt, bei den anderen Pathologien fallen ebenfalls 14 Gefäße auf  $100.000 \mu\text{m}^2$  ( $p = 0,97$ ) (Abbildung 41). Der Gefäßdurchmesser war im Median höherer bei den RE-Patienten mit  $18,05 \mu\text{m}$  im Vergleich zu dem Vergleichskollektiv mit  $14,59 \mu\text{m}$  ( $p = 0,00007$ ) (Abbildung 41, 42).

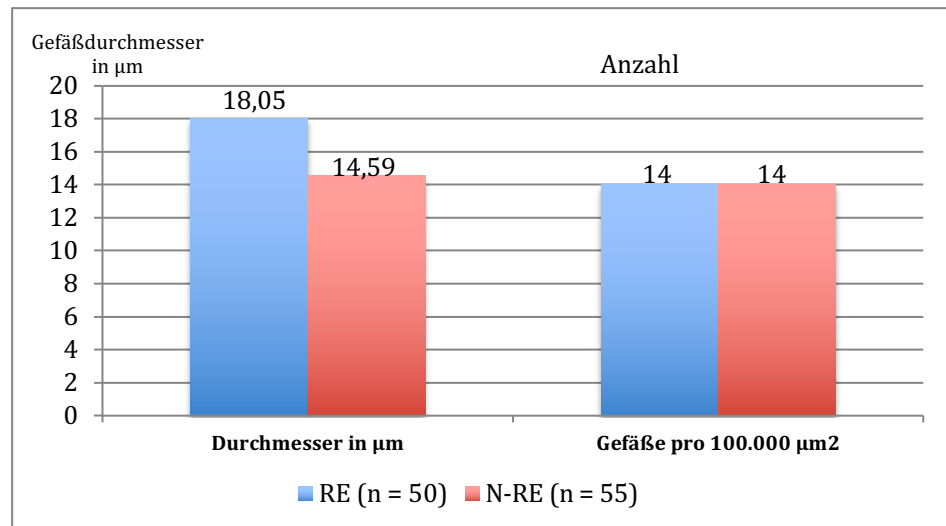


Abbildung 41: Durchmesser und Verteilung der Gefäße bei RE- und N-RE-Patienten im Median

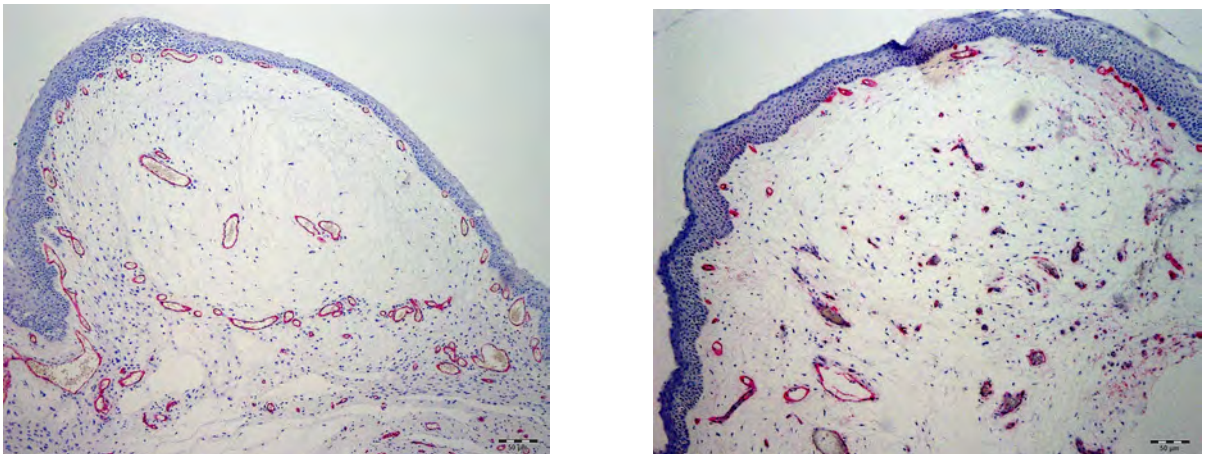


Abbildung 42: RE mit größeren Gefäßlumen (links) und Leukoplakie mit kleineren Gefäßlumen (rechts), 10x Vergrößerung, immunhistochemische Darstellung der Gefäße mit dem Antikörper CD 34

### 3.8 Mikrotraumen in der Lamina propria

Es wurde an 53 Patienten mit einem RE und an 55 Patienten mit anderen Pathologien die FE-Färbung durchgeführt. Frische Mikrotraumen und solche älterer Art mit Nachweis von Eisen waren sowohl in der oberen ( $p = 0,12$ ) als auch in der mittleren LP ( $p = 0,028_{mp}$ ) in beiden Kollektiven nicht zu beobachten.

### 3.9 Ergebnisse der RT-PCR

Es wurden 20 weibliche Patienten (Alter im Mittel 51,65 Jahre) mit einem klinisch und pathologisch nachgewiesenen RE und eine Vergleichsgruppe mit 46 Patienten davon 25 männlich und 21 weiblich (Alter im Mittel 56,46 Jahre) untersucht.



### 3.9.1 Hyaluronsynthesen HAS-1, HAS-2 und HAS-3

Die Reinke Patienten zeigten eine vermehrte Expression der HAS im Vergleich zu der Vergleichsgruppe. Jedoch zeigte sich keine statistische Signifikanz für HAS-1 ( $p(U) = 0,15$ ), HAS-2 ( $p(U) = 0,14$ ) und HAS-3 ( $p(U) = 0,25$ ) (Abbildung 43).

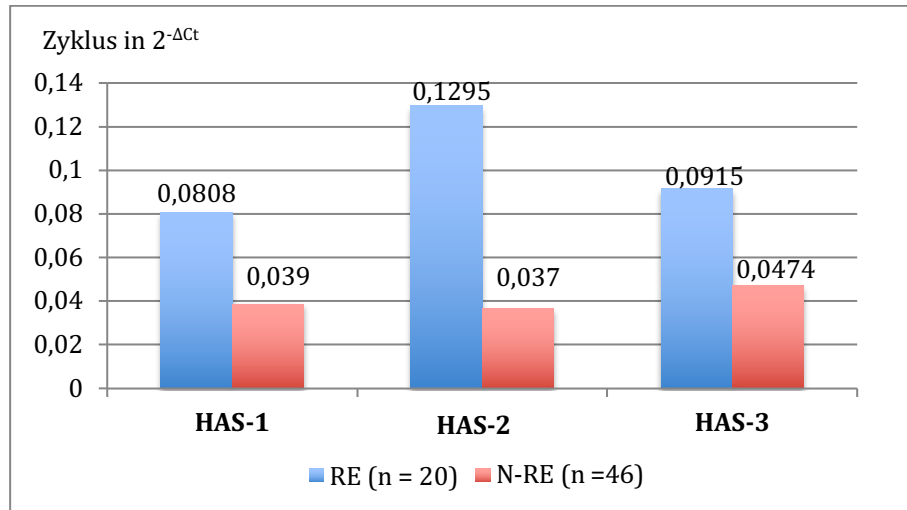


Abbildung 43: RT-PCR der Hyaluronsynthesen

### 3.9.2 Hyaluronidasen Hyal-1 und Hyal-2

Auch hier zeigte das Reinkekollektiv eine vermehrte Expression der Abbauenzyme Hyal-1 und Hyal-2 im Vergleich zu den anderen Pathologien. Aber es war keine statistische Signifikanz für Hyal-1 ( $p(U) = 0,18$ ) und Hyal-2 ( $p(U) = 0,33$ ) vorhanden (Abbildung 44).

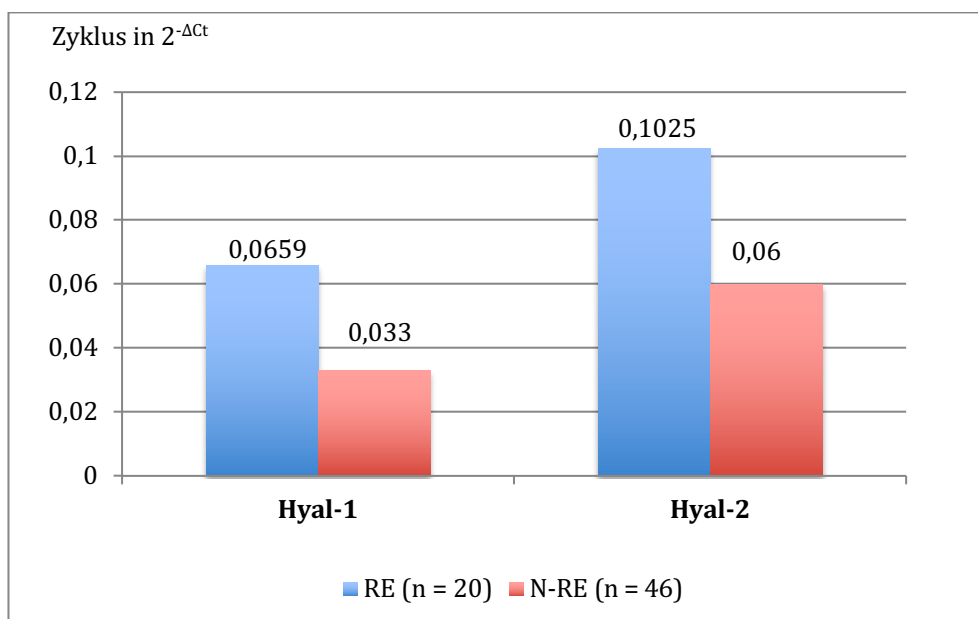


Abbildung 44: RT-PCR der Hyaluronidasen

## 4 Diskussion

### 4.1 Diskussion der Methodik

Für die Auswertung der HA wurden jeweils zwei Serienschnitte angefertigt. Dadurch war es nicht immer gewährleistet, dass identische Areale der zu untersuchenden Gewebeveränderungen getroffen wurden. Ferner stammen die Ergebnisse aus einem zweidimensionalen Ausschnitt der jeweiligen LP-Schicht und beziehen sich nicht auf die gesamte obere oder mittlere LP. Da auch die Farbauswahl mit einer Erkennungsfunktion digital durch das Programm Axiovision getroffen wurde, wurde auch Gewebe mit bewertet, welches zwar im Farbspektrum der markierten Fläche lag, aber im Gewebeschnitt nicht als HA erschien. Ein weiterer Schwachpunkt war durch die Unspezifität der Alcianblau-Färbung gegeben, die alle Glykosaminoglycane blau färbt. Die Spezifität der Hyaluronidasen war nicht immer zu 100 % gegeben (Chan et al. 2001), auch andere Makromoleküle in der EZM können partiell degradiert werden (Chan et al. 2001). Schließlich wurden unterschiedliche Mengen Gewebe entnommen: Bei manchen Gewebeproben war viel Material aus der mittleren LP vorhanden, bei anderen aber wiederum weniger, was Schwankungen vor allem in der quantitativen Analyse hervorrief. Es kann jedoch angenommen werden, dass die genannten Probleme aufgrund der Anzahl der untersuchten Proben die Ergebnisse nicht relevant beeinflussten.

### 4.2 Diskussion der Ergebnisse

Die LP ist die histoanatomische relevante Struktur für die Stimmproduktion. Deswegen gehen SL-Pathologien vor allem mit Veränderungen in der LP einher. Dazu gehören besonders das RE, SL-Polypen und auch SL-Knötchen (Ward et al. 2002).

#### 4.2.1 Der Hyaluronsäurehaushalt beim Reinke-Ödem

Die HA ist eines der wichtigsten Moleküle der EZM der LP. Nicht bei allen pathologischen Veränderungen konnte gezeigt werden, dass in der mittleren LP mehr HA vorhanden war als in der oberen LP (vgl. Abbildung 18). Besonders viel HA war beim RE zu finden im Vergleich zu den N-RE-Veränderungen (vgl. Abbildung 18).

In der gesunden SL konnte eine geschlechtsspezifische Verteilung der HA innerhalb der Schichten der LP beobachtet werden (Butler et al. 2001): In der oberen LP besaßen Männer mehr HA als Frauen. Jedoch nahm die Menge an HA bei den Frauen zur Tiefe hin zu, bei den Männern zur Tiefe Richtung M. vocalis ab; diesen Befund konnten Butler et al. in einer Studie an 10 männlichen und 8 weiblichen Proben von Verstorbenen im Alter von 20–60

Jahren mittels Immunhistochemie erheben (Butler et al 2001). Somit kann es naheliegend sein, dass Frauen eine geringere Möglichkeit haben, sich Vibrationstraumen am SL-Gewebe zu widersetzen, und dass verletztes Gewebe im Rahmen der Wundheilung HA verstärkt akkumuliert. Die geringe Widerstandskraft im weiblichen SL-Gewebe gegenüber den Mikrotraumen ist ein möglicher pathologischer Grund, dass das RE fast nur bei Frauen vorkommt. Entsprechend treten vermehrte SL-Veränderungen beim weiblichen Geschlecht bei hoher Stimmbelastung auf (Dijkers et al. 1999, Butler et al. 2001). Auch Lebl et al. konnten immunhistochemisch zeigen, dass Frauen mehr HA aufweisen als Männer (Lebl et al. 2007). In dieser Studie wurde auch der Ort der Probenentnahme aus der SL berücksichtigt: Frauen zeigten im anterioren Bereich der SL eine höhere Menge an HA, beim männlichen Geschlecht war keine Ortsabhängigkeit der HA erkennbar (Lebl et al. 2007). Betrachtet man die Verteilung der HA in den Schichten einer physiologisch unveränderten LP, so wurde beschrieben, dass in der oberen LP wenig HA zu finden war, in der mittleren am meisten und in der tiefen Schicht der LP weniger als in der mittleren (Hahn et al. 2006a, Korn et al. 2012). Hahn et al. untersuchten hierzu 6 menschliche Gewebeproben von Leichen 24 Stunden post mortem. Es wurden 2 Serienschritte angefertigt und einer davon mit Hyaluronidase behandelt. Beide Serienschritte wurden mit Alcianblau gefärbt und digital ausgewertet (Hahn et al. 2006a). Altersabhängig zeigten sich in dieser Studie erhöhte Konzentrationen von HA mit steigendem Alter bei Patienten mit einem RE, im Gegensatz zu den N-RE-Veränderungen, bei denen mit höherem Alter die Konzentration an HA abnahm. Dies konnte auch in dieser Studie bestätigt werden (vgl. Abbildung 20). In einem Tierversuch mit gesunden weiblichen Ratten, jeweils 8 jüngere und 8 ältere, wurde die Konzentration von HA mittels Fluoreszenzmethodik und ELISA bestimmt (Ramos et al. 2012). Es zeigte sich eine erhöhte Konzentration bei den jüngeren Ratten im Vergleich zu den älteren Ratten (Ramos et al. 2012). Jedoch sind die Ergebnisse von Tierversuchen nur eingeschränkt auf menschliches Gewebe übertragbar, da oft andere Bedingungen, z. B. bei der Entnahme, Gewebemenge und Fixation, herrschen. HA stellt ein Schlüsselmolekül in der EZM für den Prozess der Wundheilung dar. In der frühen Phase der Wundheilung stimuliert die HA Fibroblasten und sorgt somit für den Aufbau zellulärer Barrieren (Jacobson et al. 1984). Dabei hat die HA das Potential, die Vernarbung von Gewebe zu vermeiden (Chan und Titze 1999) und somit zu einer Regeneration von Gewebe zu führen (Thibeault et al. 2004). Man nimmt an, dass vermehrte Mengen an HA den Entzündungsprozess minimieren und dadurch in der frühen Phase der Wundheilung die Narbenbildung reduziert. Entsprechend konnten vermehrt



Glycosaminoglycane und Proteoglycane während des Wundheilungsprozesses nachgewiesen werden (Kirsner und Eaglstein 1993). In einem Tierexperiment mit 28 Hasen wurde jeweils nach 3, 5, 10 und 15 Tagen eine Biopsie aus der SL entnommen. Die Konzentration der HA wurde im gesunden und im verletzten Gewebe bestimmt. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg an HA in den Gewebeproben aus dem verletzten Kollektiv an Tag 5, an den anderen Entnahmetagen war die Konzentration an HA im gesunden Gewebe höher (Thibeault et al. 2004). Das könnte eine Erklärung sein, warum in unserem Vergleichskollektiv eine deutlich geringere Menge an HA zu finden war, da die chirurgische Exzision erst ca. 3 – 5 Wochen nach klinischer Diagnosestellung vollzogen wurde. Darüber hinaus war im Vergleichskollektiv die begleitende inflammatorische Komponente stärker ausgeprägt als in den Geweben mit einem RE. Auch das RE wurde ca. 3 – 5 Wochen nach Diagnose chirurgisch entfernt, doch dort war die Menge an HA deutlich höher, was auf einen chronischen Wundheilungsprozess mit weitergehender, HA vermittelten Unterdrückung einer Begleitentzündung schließen lässt. Beim Neugeborenen liegt keine unterschiedliche Verteilung der HA in der LP vor, die LP zeigt somit keine Schichtung, sie ist uniform (Schweinfurth und Thibeault 2008). Dies konnte an einem Experiment mit 14 humanen Larynxproben mittels histochemischer Methoden nachgewiesen werden (Schweinfurth und Thibeault 2008). Durch die gleichmäßige Verteilung der HA in der LP baut sich kein osmotischer Gradient für Wasser auf, welcher sich in Form eines Ödems in der LP widerspiegeln und durch Ausbildung biochemischer Komplexe die Viskosität des SL-Gewebes erhöhen würde (Schweinfurth und Thibeault 2008). Diese unreife Struktur der LP bei Neugeborenen dient zum Abfangen und Eindämpfen von Kräften, die während des Schreiens wirken, und verhindert somit eine Aphonie (Schweinfurth und Thibeault 2008). Durch die ungleichmäßige Verteilung der HA in der LP beim RE dagegen kann es zum Aufbau eines osmotischen Gradienten kommen und sich Wasser in die Gewebestruktur einlagern. In der Laryngoskopie zeigte sich dann ein dickes, aufgesetztes, glasiges und gallertartiges Kissen auf den SL (Tillmann und Rudert 1982, Pastuzek et al. 2003), welches das gelegentliche Auftreten einer Aphonie beim RE erklärt. Hierbei ist die HA entscheidend für die Viskosität des SL-Gewebes (Gray et al. 1999, Chan et al 2001). Die Viskosität wird besonders beeinflusst durch die Molekülstruktur der HA, z B. durch die Anzahl und Größe der Saccharid- und Lipidseitenketten. Je größer das Molekül ist, desto größer ist die Viskosität des Gewebes (Gray et al. 1999). Ebenso führt eine gesteigerte Konzentration an HA im Gewebe zu einer erhöhten Viskosität, hervorgerufen durch Interaktionen mit der EZM und deren Wasserhaushalt (Gray et al. 1999).

Thibeault et al. verglichen die Genexpression der HAS-2 und einer Hyaluronidase beim RE und einem SL-Polyp (Thibeault et al. 2002). Die Untersuchung erfolgte an vier humanen Proben mit RE und fünf Proben mit SL-Polypen. Für beide Veränderungen konnte eine vermehrte HA Produktion und ein vermehrter HA Abbau beschrieben werden. Somit zeigte sich ein erhöhter Gewebe-Turnover, also eine Umstrukturierung des Gewebes durch Ab- und Umbauvorgänge sowie Neubildung (Thibeault et al. 2002). In einem Tierversuch mit 15 SL von Ratten beschrieben Ohno et al. eine Abnahme der Genexpression der Hyaluronsynthasen HAS-1, -2 und -3 mit steigendem Alter (Ohno et al. 2009). Leider wurden die Hyal als Abbauenzyme nicht untersucht, um gegebenenfalls einen höheren HA-Turnover im Alter nachweisen zu können (Ohno et al. 2009).

Ein erhöhter Turnover der HA konnte auch in unseren Ergebnissen gezeigt werden, da sowohl die Hyaluronsynthasen HAS-1, -2 und -3 eine vermehrte Expression beim RE zeigten, als auch die Hyaluronidasen Hyal-1 und -2 (vgl. Abbildungen 43 und 44).

#### **4.2.2 Kollagenfaserqualität und -quantität beim Reinke-Ödem**

Neben der HA als großen Bestandteil der EZM (Ward et al. 2002), sind auch die Kollagenfasern bedeutend für die Anatomie und Physiologie der LP beziehungsweise der SL (Gray 2000).

In vielen Geweben finden Veränderungen in der Kollagenqualität und –quantität mit dem Prozess des Alterns oder durch pathologische Vorgänge statt (Culav et al. 1999). Eine pathologische Physiologie des Kollagenmetabolismus kann zu diversen Krankheiten wie Osteoarthritis oder Arteriosklerose führen (Visse und Nagase 2003). Die Kollagenfaserverteilung in der gesunden SL wurde als verknüpfendes Korbgeflecht beschrieben, das die Festigkeit der LP während deren Schwingungsvorgang bei der Phonation gewährleistet (Melo et al. 2003). Insbesondere soll das feine Fasernetzwerk die Gleichförmigkeit der LP während des Schwingungsvorgangs der SL aufrechterhalten (Melo et al. 2003). Ferner ist die dreidimensionale Struktur in der mittleren Schicht der LP für die Integrität der SL während der Phonation verantwortlich (Sato 1998). Sake et al. beschrieb bei 20 Patienten mit einem RE eine ungeordnete Konfiguration und Zerstörung der Kollagenfasern in der LP im Gegensatz zu der physiologischen geflechtartigen Anordnung (Sake et al. 2008), die in den mittleren Schichten der LP im Vergleich zu den oberen stärker ausgeprägt waren. Somit zeigte sich auch hier, dass die mittlere Schicht der LP bevorzugt pathologische Veränderungen beim RE aufweisen. Die Zerstörung des klassischen Aufbaus der SL-Histologie in der mittleren LP mit Destruktion und geringer Kollagenfaserdichte

beim RE konnten wir auch in unserer Arbeit zeigen (vgl. Abbildungen 21, 22 und 23, 24). Vermutlich werden die Kollagenfasern durch das Ödem verdrängt und die LP verliert ihre netzartige Struktur, was die SL-Dysfunktion bedingt.

Das fibrilläre Kollagennetzwerk der menschlichen LP wird von Kollagen Typ I und III gebildet (Tateya et al. 2007). In der mittleren Schicht liegt hauptsächlich Kollagenfaser Typ III vor (Melo et al. 2003, Prades et al. 2010). Bei unseren Untersuchungen zeigte sich eine verringerte Menge an Kollagen Typ III in der mittleren Schicht der LP (vgl. Abbildung 28), wiederum durch das Ödem bedingt, das für eine Verdrängung der Fasern sorgt und so das Bild einer verringerten Anzahl an Fasern im Vergleich zu anderen SL-Pathologien erzeugt. Auch Tateya et al. konnten an pathologisch unverändertem, menschlichem SL-Gewebe zeigen, dass Kollagen Typ I und Typ III essentiell für die Morphologie und Funktion sind (Tateya et al. 2006). Typ I sorgt in der oberflächlichen Schicht mit seiner bandartigen, dichten Anordnung für Zugfestigkeit. Außerdem sorgen diese Fasern dafür, dass die SL ihre Form auch unter Vibrationskräften während der Phonation beibehält. Typ III ist gleichmäßig in der LP verteilt und verleiht dem Gewebe Elastizität und Flexibilität (Tateya et al. 2006). Die Struktur in der oberen Schicht der LP geht beim RE nicht verloren. Dort bleibt das dichte Kollagenband, hauptsächlich aus Typ I, erhalten. Das wird auch durch unsere Ergebnisse bestätigt (vgl. Abbildung 25).

### **4.2.3 Veränderung der elastischen Fasern beim Reinke-Ödem**

Die polymere Elastin-Struktur verleiht den elastischen Fasern die Funktion der Elastizität. Die Elastizität ist abhängig von dem Elastinanteil (Gray et al. 2000). Reife elastische Fasern mit einem hohen Elastinanteil sind vor allem in der mittleren Schicht der LP zu finden und sind dort wichtig für die viskoelastischen Eigenschaften des Gewebes (Gray et al. 2000). In der oberen Schicht der LP zeigte sich bei den RE-Gewebeproben und bei dem Vergleichskollektiv generell eine geringe Dichte an elastischen Fasern (vgl. Abbildung 31). In der mittleren Schicht der LP war eine physiologische Dichte bei den RE-Patienten, im Vergleichskollektiv war dagegen eine geringere Dichte an elastischen Fasern zu beobachten (vgl. Abbildung 32). Ein dem Vergleichskollektiv ähnliches Bild wurde bei SL-Gewebeproben von älteren Menschen beschrieben, die aufgrund der Stimmbelastung und Schwingungsveränderungen eine sehr geringe Anzahl an elastischen Fasern in den oberen Schichten der LP, einzelne elastische Fasern in den mittleren Schichten der LP und die meisten in den tiefen Schichten der LP aufwiesen (Roberts et al. 2011).

In der oberen Schicht der LP zeigt sich normalerweise ein Netzwerk aus dünnen, wellenförmig angeordneten elastischen Fasern, welches parallel zur Basalmembran verläuft (Sake et al. 2010). Sowohl in der oberen als auch in der mittleren Schicht der LP konnten wir in beiden Kollektiven eine strukturlose Anordnung der elastischen Fasern beobachten. Ein hoher Grad einer Faserdestruktion konnte jedoch nicht gezeigt werden. Gleiches beschrieb Sake et al. in ihren Untersuchungen über die elastischen Fasern beim RE und sprachen von einem „verworrenen Charakter“ der elastischen Fasern. Die Fasern seien nicht mehr wellenförmig angeordnet, teilweise fragmentiert und nicht mehr parallel zur Basalmembran ausgerichtet (Sake AS et al. 2010).

#### **4.2.4 Veränderungen an der Epithelschicht und Basalmembran beim Reinke-Ödem**

Eine mehrschichtige Epithelzellschicht und die Basalmembran bedecken die LP-Anteile kehlkopflumenwärts (Rosen und Simpson 2008). Die Aufgaben der Basalmembran sind die Anheftung der Epithelzellen an das Stroma, die Konstanthaltung der Polarität des Epithels sowie damit verbundene Barriere- und Transportfunktionen (Knöbber 1994). In elektronenmikroskopischen Untersuchungen von Knöbber zeigten sich ungleichmäßig verbreiterte Areale in der Lamina densa, vermehrt Ankerfilamente und eine lückenhafte Basalmembran bei 9 Patienten mit einem RE (Knöbber 1994). Verdickungen der Basalmembran konnten auch bei anderen gutartigen SL-Pathologien beobachtet werden (Dickers et al. 1993). Eine generell verdickte oder lokal verbreiterte Basalmembran beim RE und eine physiologische Breite der Basalmembran bei SL-Polypen und Pseudozysten konnten auch in einer weiteren Studie bestätigt werden (Hantzakos et al. 2009). Diese Ergebnisse konnten auch in unseren Untersuchungen erzielt werden (vgl. Abbildung 37). Die Epithelzellen sind im normalen histologischen SL-Gewebe mehrschichtig und unverhornt. Die Basalzellschicht ist mit Desmosomen an der Basalmembran verankert (Gray 1997). Eine Vermehrung der Epithelzellschicht war bei Patienten mit einem RE nicht zu erkennen, jedoch zeigten die anderen pathologischen Veränderungen der SL des Vergleichskollektivs eine Vermehrung der Zelllagen der Epithelzellen (vgl. Abbildung 36). Auch trat eine Keratinisierung der Epitheldeckschicht bei RE- im Gegensatz zu N-RE-Veränderungen äußerst selten auf (vgl. Abbildung 40). Eine gelegentliche und somit seltene Keratinisierung der Epitheldeckschicht beim RE im Vergleich zu SL-Polypen, -Knötchen und Pseudozysten wurde auch in einer anderen Studie nachgewiesen (Hantzakos et al. 2009). Das Auftreten einer Verhornung der Deckzellschicht wird besonders bei stark ausgeprägten Ödemen beobachtet, hierbei kommt es zum Kontakt mit der kontralateralen

SL und somit zur stetigen Traumatisierung der obersten Zellschichten, die dann eine Keratinisierung als Schutz aufweisen.

Ein vermehrter Tabak- bzw. Nikotinkonsum führten zu einer Hyperplasie und Keratinisierung des Epithels (Marcotullio et al. 2002). Bei unseren Untersuchungen waren die RE-Patienten zwar alle Raucher, man konnte jedoch keine verbreiterte Epithelzellschicht erkennen.

#### **4.2.5 Vaskuläre Strukturen im Stimmlippengewebe**

Im nicht pathologisch veränderten SL-Gewebe sind vor allem sehr kleine Arteriolen und Venolen vorhanden, welche parallel zum frei beweglichen Randsaum der SL verlaufen. In einer Studie an acht menschlichen Gewebeproben von Verstorbenen im höheren Alter, zeigten sich Blutgefäße in allen Schichten der LP, ebenfalls parallel zur Oberfläche der SL verlaufend (Roberts et al. 2011). In einem Versuch mit 80 Gewebeproben von Patienten mit einem RE, zeigten sich im subepithelialen Gewebe viele kleine Gefäße, die über Anastomosen verbunden waren. Ebenso zeigten die Blutgefäße eine deutlichen Weitung der Gefäßlichtung und eine dünne Gefäßwand (Jovanovic et al. 2007). Ein erweitertes Gefäßlumen bei Patienten mit einem RE konnte in unseren Untersuchungen ebenfalls bestätigt werden (vgl. Abbildung 41). Diese subepitheliale Mikrovascularisierung könnte ein Indikator für die Entstehung eines Ödems in der SL sein. Durch das Sprechen und die Schwingung der SL baut sich ein stetiger Druck im Gewebe und auch in den dort verlaufenden Gefäßen auf, was schließlich zu einer erhöhten Permeabilität führt. Eine gesteigerte Permeabilität wiederum führt zur einer Gefäßdilataion und Ausbildung des Ödems in der SL (Sato et al. 1999).

## 5 Zusammenfassung

Das RE ist eine gutartige, pathologische Veränderung der SL. Die Krankheit äußert sich durch Funktionsverlust der SL-Mechanik, einhergehend mit Verschlechterung der Stimmqualität bis hin zum Stimmverlust oder Dyspnoe. Fast ausschließlich tritt die Erkrankung bei Frauen mittleren Alters auf. Prädisponierende Faktoren sind vor allem langjähriger Tabakkonsum, eine hohe Belastung der Stimme sowie ösophagler Reflux. Laryngoskopisch ist eine breite, wulstartige, ödematöse Schwellung der SL-Schleimhaut zu beobachten, deren histologische Charakterisierung Ziel dieser Arbeit war. Histologisch kommt es zu diversen Veränderungen in der EZM des SL-Gewebes im Vergleich zu anderen Pathologien der SL, was in der vorliegenden Arbeit aufgezeigt wird. Im Gegensatz zu anderen Erkrankungen der SL zeigt sich beim RE eine deutliche Akkumulation an HA in der LP. Jedoch konnte weder eine isolierte vermehrte Genexpression der synthetisierenden HAS-1, -2 und -3 noch eine isolierte verminderte Genexpression der abbauenden Hyal-1 und -2 beim RE festgestellt werden, sondern nur ein erhöhter Turnover der HA. Die Kollagen- und elastischen Fasern verloren beim RE deutlich an Struktur. Es kam durch die Entstehung des Ödems in der LP zu einer Destruktion der feinen Netzwerke der jeweiligen Fasern. Eine erhöhte Anzahl an Gefäßen in der LP beim RE konnte nicht gezeigt werden, jedoch besaßen die Gefäße ein deutlich erweitertes Lumen im Vergleich zu den N-RE assoziierten gutartigen Veränderung der SL. Neben der EZM wurde auch die epitheliale Deckschicht inklusive der Basalmembran der LP lichtmikroskopisch untersucht. Es war eine wesentlich breitere Basalmembran beim RE zu erkennen. Die epitheliale Deckschicht war dagegen eher gering verändert und zeigte gegenüber den anderen Pathologien eine verminderte Anzahl an Zelllagen. Die Genese von gutartigen SL-Erkrankungen ist aufgrund von bekannten Risikofaktoren so gut wie aufgeklärt. Mittels der vorliegenden Untersuchungen ließen sich histologische Unterschiede vor allem in der EZM zwischen dem RE und anderen Erkrankungen der SL erkennen. Jedoch war kein eindeutiger Kausalzusammenhang hinsichtlich möglicher Risikofaktoren und den Veränderungen der EZM, insbesondere der HA, beim RE zu erkennen. Dies sollte in weiterführenden Studien erforscht und geklärt werden; hier sind vor allem die MMP's zu nennen, von denen vermutet wird, dass sie über aktive Reparatur- und Umbaumechanismen die physiologische Struktur der SL erhalten beziehungsweise wiederherstellen können.

## 6 Literaturverzeichnis

Berbohm H, Kaschke O, Nawka T: Kurzlehrbuch Hals- Nasen- Ohrenheilkunde, Thieme Verlag, Stuttgart 2009

Boenninghaus HG, Lenarz T: HNO. 13. Auflage; Springer Verlag, Berlin/Heidelberg 2007

Bornstein P (1974): The Biosynthesis of Collagen. *Annu Rev Biochem* 43, 567–603

Bosman FT, Stamenkovic I (2003): Preface to extracellular matrix and disease. *J Pathol* 200, 421–422

Buhler RB, Sennes LU, Mauad T, Melo ECM, Silva LFF, Saldiva PHN (2008): Collagen Fiber and Versican Distribution Within the Lamina Propria of Fetal Vocal Folds. *Laryngoscope* 118, 371–374

Butler JE, Hammond TH, Gray SD (2001): Gender-Related Differences of Hyaluronic Acid Distribution in the Human Vocal Fold. *Laryngoscope* 111, 907–911

Chan RW, Gray SD, Titze IR (2001): The importance of hyaluronic acid in vocal fold biomechanics. *Otolaryngol. Head Neck Surg* 124, 607–614

Chan RW, Titze IR (1999): Hyaluronic Acid (With Fibronectin) As a Bioimplant for the Vocal Fold Mucosa. *Laryngoscope* 109, 1142–1149

Cohen E, Kolbus A, van Trostenburg M, Rudas M, Horvat R, Schneider B (2009): Immunohistochemical Examinations of Sex Hormone Receptors in Benign Vocal Fold Lesions. *Folia Phoniatr Logop* 61, 259–262

Culav EM, Clark CH, Merrilees MJ (1999): Connective Tissues: Matrix Composition and Its Relevance to Physical Therapy. *Phys Ther* 79, 308–319

Debelle L, Tamburro AM (1999): Elastin: molecular description and function. *Int J Biochem Cell Biol* 31, 261–272

Deutzmann R, Brückner-Tudermann L, Brückner P: Binde- und Stützgewebe; In: Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC (Hrsg.): Biochemie und Pathochemie; 8. Auflage; Springer-Verlag, Heidelberg 2007, 715–754

Dijkers F, Nikkels P (1995): Benign lesions of the vocal folds: histopathology and phonotrauma. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 104, 698–703

Dijkers FG, Nikkels PGJ (1999): Lamina propria of the mucosa of benign lesions of the vocal folds. *Laryngoscope* 109, 1684–1689

Dijkers FG, Hulstaert CE, Oosterbaan JA, Cervera-Paz FJ (1993): Ultrastructural Changes of the Basement Membrane Zone in Benign Lesions of the Vocal Folds. *Acta Otolaryngol* 113, 98–101

Fränkel B (1889): Zur Histologie der Stimmbänder. *Virchows Arch. path. Anat.* 118, 370–375

Gray SD (2000): Cellular physiology of the vocal fold. *Otolaryngol Clin North Am* 33, 679–697

Gray SD (1997): Benign pathologic responses of the larynx. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 5, 129–132

Gray SD, Titze IR, Alipour F, Hammond TH (2000): Biomechanical and histologic observations of vocal fold fibrous proteins. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 109, 77–85

Gray SD, Titze IR, Chan R, Hammond TH (1999): Vocal Fold Proteoglycans and Their Influence on Biomechanics. *Laryngoscope* 109, 845–854

Hahn MS, Kobler JB, Starcher BC, Zeitels SM, Langer R (2006a): Quantitative and Comparative Studies of the Vocal Fold Extracellular Matrix I: Elastic Fibers and Hyaluronic Acid. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 115, 156–164



- Hahn MS, Kobler JB, Zeitels MD, Langer R (2006b): Quantitative and Comparative Studies of the Vocal Fold Extracellular Matrix II: Collagen. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 115, 225–232
- Hajek M (1925): Beiträge zur Anatomie der Stimmlippen. *Hals-, Nasen- Ohrenheilk* 13, 161–172
- Hamacher S, Matern S, Roeb E (2004): Extrazelluläre Matrix – von der Grundlagenforschung zur klinischen Bedeutung. *Dtsch Med Wochenschr* 124, 1976–1980
- Hammer SS (Hrsg.): *Stimmtherapie mit Erwachsenen*, 3. Auflage; Springer Verlag, Heidelberg 2007
- Hammond TH, Zhou R, Hammond EH, Pawlak A, Gray SD (1997): The intermediate Layer: A Morphologic Study of the Elastin and Hyaluronic Acid Constituents of Normal Human Vocal Folds. *J voice* 11, 59–66
- Hammond TH, Gray SD, Butler J, Zhou R, Hammond E (1998): Age- and gender-related elastin distribution changes in human vocal folds. *Otolaryngol. Head Neck Surg* 119, 314–322
- Hantzakos A, Remacle M, Dikkers FG, Degols JC, Delos M, Friedrich G, Giovanni A, Rasmussen N (2009): Exudative lesions of Reinke's space: a terminology proposal. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 266, 869–878
- Hirano M: *Clinical examination of voice*, Springer Verlag, Wien, New York 1981, 100
- Hubmacher D, Apte SS (2013): The biology of the extracellular matrix: novel insights. *Curr Opin Rheumatol* 25, 65–70
- Jacobson K, O'Dell D, Holifield B, Murphy TL, August JT (1984): Redistribution of a Major Cell Surface Glycoprotein during Cell Movement. *J Cell Biol* 99, 1613–1623

Jovanovic MB, Mulutinovic Z, Perovic J, Grubor A, Milenkovic S, Malobabic S (2007): Contact Telescopy Reveals Blood Vessel Alterations of Vocal Fold Mucosa in Reinke's Edema. *J Voice* 21, 355–360

Kahane JC (1987): Connective Tissue Changes in the Larynx and Their Effects on Voice. *J Voice* 1, 27–30

Kielty CM, Sherratt MJ, Shuttleworth CA (2002): Elastic fibres. *J Cell Sci* 115, 2817–2828

Kirsner RS, EaglsteinWH (1993): The wound healing process. *Dermatologic Clin* 11, 629–640

Kleinsasser O (1974): Mikrolaryngoskopie und endolaryngeale Mikrochirurgie. Teil II Rückblick auf 2500 Fälle. *HNO* 22, 69–83

Kleinsasser O: Mikrolaryngoskopie und endolaryngeale Mikrochirurgie. 3. Auflage; Schattauer-Verlag, Stuttgart 1991

Knöbber D (1994): Die Basalmembran bei Erkrankungen der Stimmlippen: Elektronenmikroskopische und immunmorphologische Befunde. *Laryngo-Rhino-Otologie* 73, 642–646

Korn GP, Martins JRM, Park SW, Mendes A, Kobayashi EY, Nader HB, Biase NGD (2012): Concentration of Hyaluronic Acid in Human Vocal Folds in Young and Old Subjects. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery* 145, 981–986

Kreil G (1995): Hyaluronidases – A group of neglected enzymes. *Protein Sci* 4, 1666–1669

Lebl MDA, Martins JRM, Nader HB, Simões MJ, Biase ND (2007): Concentration and Distribution of Hyaluronic Acid in Human Vocal Folds. *Laryngoscope* 117, 595–599

Lee JY, Spicer AP (2000): Hyaluronan: a multifunctional, megaDalton, stealth molecule. *Curr Opin Cell Biol* 12, 581–586

Lehmann W, Pampurik J, Guyot J-P (1989): Laryngeal Pathologies Observed in Microlaryngoscopy. *Oto-Rhino-Laryngol* 51, 206–215

Lemaître V, D'Armiento J (2006): Matrix Metalloproteinases in Development and Disease. *Birth Defects Res C Embryo Today* 78, 1–10

Marcotullio D, Magliulo G, Pezone T (2002): Reinke's Edema and Risk Factors: Clinical and Histopathologic Aspects. *Am J Otolaryngol* 23, 81–84

Mayet A (1955): Zur funktionellen Anatomie der menschlichen Stimmlippe, *Z. Anat.* 119, 87–115

Mayet A (1961): Die morphologischen Grundlagen des Reinke'schen Stimmbandödems, *Archiv für Ohren-Nasen-Kehlkopfheilkunde* 177, 160–173

McKee CM, Lowenstein CJ, Horton MR, Wu J, Bao C, Chin BY, Choi AMK, Noble PW (1997): Hyaluronan Fragments Induce Nitric-oxide Synthase in Murine Macrophages through a Nuclear Factor  $\kappa$ B-dependent Mechanism. *J Biol Chem* 272, 8013–8018

Melo ECM, Lemos M, Filho JAX, Sennes LU, Saldiva PHN, Tsuji DH (2003): Distribution of Collagen in the Lamina Propria of the Human Vocal Fold. *Laryngoscope* 113, 2187–2191

Meyer K, Palmer JW (1934): The polysaccharide of the vitreous humor. *J Biol Chem* 107, 629–634

Nawaka T, Hosemann W (2005): Gestörte Stimme, chirurgische Verfahren. *Laryngo – Rhino – Otol* 84, Suppl 1, 201–212

Necas J, Bartosikova L, Brauner P, Kolar J (2008): Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Vet Med* 53, 397–411

Neumann A, Schinzel R, Palm D, Riederer P, Munch G (1999): High molecular weight hyaluronic acid inhibits advanced glycationendproduct-induced NF- $\kappa$ B activation and cytokine expression. *FEBS Lett* 453, 283–287

Ohkawara Y, Tamura G, Iwasaki T, Tanaka A, Kikuchi T, Shirato K (2000): Activation and Transforming Growth Factor- $\alpha$  Production in Eosinophils by Hyaluronan. *Am J Respir Cell Mol Biol* 23, 444–451

Ohno T, Hirano S, Rousseau B (2009): Age-Associated Changes in the Expression and Deposition of Vocal Fold Collagen and Hyaluronan. *Otol Rhinol Laryngol* 118, 735–741

Pastuzek P, Krecicki T, Zalesska-Krecicka M, Jelen M, Rak J, Krajewska B (2003): Histological and Electron Microscopic Investigation of Reinke's Edema. *Pol J Pathol* 54, 61–64

Prades JM, Dumollard JM, Duband S, Timoshenko A, Richard C, Dubois MD, Martin C, Peoc'h M (2010): Lamina propria of the human vocal fold: histomorphometric study of collagen fibers. *Surg Radiol Anat* 32, 377–382

Probst R, Greves G, Iro H (Hrsg.): Hals-Nasen-Ohrenheilkunde. 3. Auflage; Thieme Verlag, Stuttgart 2008

Ramos HVL, Neves LR, Martins JRM, Nader HB, Pontes P (2012): Influence of aging on hyaluronic acid concentration in the vocal folds of female rats. *Braz J Otorhinolaryngol* 78, 14–18

Raabe J, Pascher W (1999): Das Reinke-Ödem: Eine Untersuchung zu Frage der Ätiologie, der Prognose und der Wirksamkeit therapeutischer Interventionen. *Laryngo-Rhino-Otol* 78, 97–102

Reinke F (1895): Untersuchungen über das menschliche Stimmband, *Fortschr Med* 13, 469–478

Reinke F (1897): Über die funktionelle Struktur der menschlichen Stimmlippe mit besonderer Berücksichtigung des elastischen Gewebes, *Anat Hefte* 9, 103–115

Roberts T, Morton R, Al-Ali S (2011): Microstructure of the Vocal Fold in Elderly Humans. *Clin Anat* 24, 544–551

Rosen C, Simpson C: (Hrsg.) *Operative Techniques in Laryngology*. 1. Auflage; Springer Verlag, Berlin/Heidelberg 2008

Sake AS, Imamura R, Sennes LU, Tsuji DH, Mauad T, Saldiva PHN (2010): Elastic Fibers in Reinke's Edema. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 119, 609–614

Sake F, Imamura R, Sennes L, Maud T, Saldiva P, Tsuji D (2008): Disarrangement of Collagen Fibers in Reinke's Edema. *Laryngoscope* 118, 1500–1503

Sato K (1998): Reticular Fibers in the Vocal Fold Mucosa. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 107, 1023–1028

Sato K, Hirano M, Nakashima T (1999): Electron microscopic and immunohistochemical investigation of Reinkes' edema. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 108, 1068–1072

Sato K, Hirano M, Nakashima T (2001): Fine Structure of the Human Newborn and infant Vocal Fold. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 110, 417–424

Schade G, Hess M (2001): Flexible versus starre Laryngoskopie und Stroboskopie, unterschiedliche Befunde bei Stimmstörungen. *HNO* 49, 562–568

Schiebler TH, Korf HW (Hrsg): *Anatomie: Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie*. 10. Auflage; Steinkopff Verlag, Heidelberg 2007

Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Voll M, Wesker K (Hrsg.): *Prometheus Lernatlas der Anatomie – Hals und Innere Organe*. 1. Auflage; Thieme Verlag, Stuttgart 2005

Schweinfurth JM, Thibeault SL (2008): Does Hyaluronic Acid Distribution in the Larynx Relate to the Newborn's Capacity for Crying? *Laryngoscope* 118, 1692–1699

Snoek van Beurden P A.M., Von den Hoff J W. (2005): Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Biotechniques* 38, 73–83

Stern R, Jedrzejewski MJ (2006): Hyaluronidases: Their Genomics, Structures, and Mechanisms of Action. *Chem Rev* 106, 818–839

Tateya T, Tateya I, Bless DM (2006): Collagen Subtypes in Human Vocal Folds. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 115, 469–476

Tateya T, Tateya I, Bless DM (2007): Immuno-Scanning Electron Microscopy of Collagen Types I and III in human Vocal Fold Lamina Propria. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 116, 156–159

Thibeault SL (2005): Our understanding of the Reinke space. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 13, 148–151

Thibeault SL, Gray SD, Li W, Ford CN, Smith ME, Davis RK (2002): Genotypic and phenotypic expression of Vocal Fold Polyps and Reinke's Edema: A preliminary study. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 111, 302–309

Thibeault SL, Rousseau B, Welham NV, Hirano S Bless DM (2004): Hyaluronan Levels in Acute Vocal Fold Scar. *Laryngoscope* 114, 760–764

Tillmann B, Rudert H (1982): Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen zum Reinke-Ödem, *HNO* 30, 280–284

Tillmann B, Rudert H, Schünke M, Werner J (1995): Morphological studies on the pathogenesis of Reinke's edema. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 252, 469–474

Visse R, Nagase H (2003): Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases: Structure, Function, and Biochemistry. *Circ Res* 92, 827–839

Voelter C, Kleinsasser N, Joa P, Nowack I, Martinez R, Hagen R, Voelker HU (2008): Detection of hormone receptors in the human vocal fold. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 265, 1239–1244

Volić SV, Klapan I, Seiwerth S, Ibrahimpašić T(2004) Extracellular matrix of reinke space in some pathological conditions. *Acta Otolaryngol* 124, 505–508

Ward PD, Thibeault SL, Gray SD (2002): Hyaluronic Acid: Ist Role in Voice. *J Voice* 16, 303–309

Woessner JF (1994): The family of Matrix Metalloproteinasen. *Ann N Y Acad Sci* 732, 11–21

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinen Betreuerinnen, Frau Dr. med. Perske und Frau PD Dr. med. Völter, die mir das Thema bereitstellten und mich während meiner Promotionsarbeit betreuten und anleiteten.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Professor Dr. med. Heinz-Joachim Radzun, der mir die Möglichkeit einräumte, meine Promotionsarbeit in seinem Institut zu absolvieren.

Weiterer Dank gebührt dem gesamten Laborteam, insbesondere Herrn Rolf Kleinhans und Herrn Axel Stange, die mir bei der experimentellen Durchführung mit Rat und Tat zur Seite standen, sowie Frau Anke Klages und Nicole Putzer für die aufgebrauchte Zeit und stetige Geduld, mich in die molekularbiologischen Methoden einzuarbeiten.

Zudem gilt mein Dank der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde der Georg-August-Universität Göttingen, besonders Herrn Prof. Dr. Olthoff, für die Bereitstellung von Patientendaten und -gewebe aus dem entsprechenden Krankengut.

Danken möchte ich auch noch Frau Dr. Imme Haubitz für die Unterstützung bei der Durchführung der statistischen Analysen.