

Diplomarbeit

**Erstellung dreidimensionaler Computermodelle
laryngealer Strukturen**

eingereicht von

Hansjörg Schlager

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der Klinik für **Hals-Nasen-Ohrenheilkunde**

unter der Anleitung von Betreuer

Markus Gugatschka, Ass.-Prof. Priv.-Doz. Dr.med.univ.et scient.med.

und

Claus Gerstenberger, Dipl.-Ing.

Graz, 28.06.2016

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, 28.06.2016

Hansjörg Schlager eh.

Vorwort und Danksagungen

Am Beginn dieser Arbeit möchte ich mein großes Interesse an der menschlichen Stimme in all ihrer Komplexität bekunden. Durch meine Passion, den Gesang, versuche ich immer wieder aufs Neue mehr Informationen und Erkenntnisse über die Stimme zu erlangen, um sie in ihrer Vielfalt möglichst gut verstehen zu können. Die funktionellen Aspekte und der facettenreiche Gebrauch der Stimme setzen mich immer wieder in Erstaunen. Ein fundiertes anatomisches Wissen ist meiner Meinung nach unerlässlich, um die einzelnen Mechanismen zur Erzeugung verschiedener Klänge verstehen zu können. Man kann zwar die einzelnen Gesangstechniken durch Anleitung nachahmen, um diese jedoch wirklich zu begreifen, muss man sich mit der muskulären Funktion des Kehlkopfs auseinandersetzen. So verbinde ich in dieser Arbeit meine zwei Leidenschaften: den Gesang und die Medizin.

Das genaue Thema dieser Arbeit wurde mir von meinen Diplomarbeitbetreuern nahegelegt und ich hatte sehr großes Interesse daran, durch dreidimensionale Rekonstruktion der intrinsischen Kehlkopfmuskulatur ein besseres Verständnis der komplexen Architektur des Kehlkopfs zu erlangen.

Meine ersten Worte des Dankes gehen an meine ganze Familie, die mich in der Zeit des Studiums stets unterstützt hat und mir immer zur Seite stand, sowohl in den erfreulichen, als auch in den weniger erfreulichen und meist sehr lernintensiven Phasen. Vor allem aber möchte ich meinen Eltern Ruperta und Georg Schlager danken. Es gibt eigentlich keine Worte, die beschreiben, wie sehr ich in ihrer Schuld stehe. Sie haben es mir ermöglicht diesen Weg einzuschlagen. Ich bin froh, dass ich sie mit meinem Abschluss sehr stolz mache. Ein besonderer Dank ergeht ebenfalls an meine Schwester Evelyn Eder, die mir in akademischen Dingen stets ein Vorbild war. Sie hat mir gezeigt, wie man seine Ziele erreichen kann.

Besonders danken möchte ich auch meinen Diplomarbeitbetreuern Markus Gugatschka und Claus Gerstenberger, die mir mit Rat und Tat zu Seite gestanden sind und keine Frage unbeantwortet ließen. Außerdem wurde mir ermöglicht, die technischen Geräte zu benutzen, die ich für diese Arbeit benötigte. Somit schließe ich auch meinen Dank an das Team des Biomedizinischen Instituts an, das sich

mühsam durch verschiedenste Scanprotokolle gekämpft hat, bis das bestmögliche Ergebnis erreicht werden konnte.

Zusätzlich geht auch ein herzliches Dankeschön über das Meer nach Liverpool an Prof. Jonathan Jarvis und Prof. Nathan Jefferey, die mich das nötige Handwerkszeug gelehrt haben, um meine Arbeit durchführen zu können.

Zum Schluss danke ich noch meinen Freunden, meinem Chor und meinem Ensemble, die mir in den oft beschwerlichen Lernphasen den nötigen Ausgleich geschaffen haben. Durch verständnisvolle Worte und befreiende Stunden gefüllt mit Gesang konnte ich genug Gelassenheit entwickeln, um alle Hindernisse zu bewältigen, die das wissenschaftliche Arbeiten bietet.

Zusammenfassung

Einleitung u. Fragestellung: Die anatomischen Strukturen des Larynx und im Speziellen die Larynx-Muskulatur sind in vivo nicht bzw. nur limitiert zugänglich. Die intrinsischen Muskeln sind von Schleimhaut überzogen, wodurch sie von luminal nicht volumetrisch quantifizierbar sind. Zur Analyse und Bestimmung von muskelspezifischen Fragestellungen ist eine dreidimensionale Darstellung erforderlich.

Methode/Material: Mit Hilfe eines Mikro-CT wurden hochauflösende Bilddaten von Schweinelarynges (n=6) generiert, die mit der 3D-Analyse Software *Avizo 9.0.0* in dreidimensionale Modelle umgewandelt wurden. Im Rahmen der Studie wurden unterschiedliche Kontrastmittelkonzentrationen (Iod-Kaliumiodid) getestet, um eine optimale Differenzierbarkeit des Knorpelskeletts und der intrinsischen Muskeln zum umliegenden Gewebe zu ermöglichen.

Ergebnisse: Aus dem generierten Modell wurden die Volumina des M. cricoarytaenoideus posterior (PCA), des M. thyroarytaenoideus (TA) und des M. vocalis berechnet. Das arithmetische Mittel aus den sechs Proben ergab für den PCA $1,05 \text{ cm}^3$ (SD: $\pm 0,12 \text{ cm}^3$), für den TA $0,92 \text{ cm}^3$ (SD: $\pm 0,18 \text{ cm}^3$) und für den M. vocalis $0,52 \text{ cm}^3$ (SD: $\pm 0,05 \text{ cm}^3$). Es zeigten sich keine Seitendifferenzen.

Diskussion/Schlussfolgerungen: Nach Applikation von jodhaltigem Kontrastmittels bietet das Mikro-CT eine optimale Möglichkeit, kontrastreiche und hochauflösende Bilder zu erzeugen, welche zur Generierung dreidimensionaler Bilddatensätze herangezogen werden können. Derart konnten zuverlässig und wiederholbar Modelle für die Berechnung laryngealer Muskelvolumina erstellt werden. Die Methodik der Kontrastmittelanreicherung, die Bestimmung der optimalen Kontrastmittelkonzentration, sowie der Prozess der Modellgenerierung dienen als Grundlage für weitere Studien.

Abstract

Introduction: The in vivo observation of the anatomical structures of the larynx, especially the musculature of the larynx, are limited due to the coverage with mucosa. As a consequence, there are difficulties in volumetric measurements. For an analysis and determination of muscle-specific studies it is necessary to obtain a three-dimensional image.

Material and Methods: The high resolution image data records of porcine larynges (n = 6) were produced with the assistance of a micro-CT scanner and were transformed into three-dimensional models with the 3D-analysis Software *Avizo 9.0.0*. As a part of the study different concentrations of the contrast media iodo-potassium iodine were tested to achieve the ideal concentration under which parts of the cartilage could be separated from the surrounding tissue.

Results: The volumes of the posterior cricoarytenoid muscle (PCA), the thyroarytenoid muscle (TA) and the vocalis muscle were calculated from the generated model. The arithmetical mean of the six samples add up to 1,05 cm³ (SD: ±0,12 cm³) for the PCA, 0,92 cm³ (SD: ±0,18 cm³) for the TA and 0,52 cm³ (SD: ±0,05 cm³) for the vocal muscle. There were no side differences.

Discussion: The use of micro-CT scanning in combination with the application of contrast media is a useful tool to generate high resolution images which could be used for producing three-dimensional image data records. Consequently, it was possible to create models for the measurement of laryngeal muscle volumes in a precise and reproducible way. This method of contrast enhancement, the determination of the ideal concentration of contrast media and the creation of three-dimensional image data records serve as a basis for further studies.

Inhaltsverzeichnis

Vorwort und Danksagungen	iii
Zusammenfassung	v
Abstract	vi
Inhaltsverzeichnis	vii
Abkürzungsverzeichnis	viii
Abbildungsverzeichnis	ix
Tabellenverzeichnis	x
1 Einleitung	11
1.1 Ziel der vorliegenden Arbeit	15
1.2 Die Anatomie des menschlichen Larynx	15
1.2.1 Das knorpelige Grundgerüst	16
1.2.2 Räume und bindegewebige Membranen	19
1.2.3 Die Muskulatur des Larynx	22
1.3 Die Anatomie des Schweinelarynx im Vergleich	30
2 Material und Methoden	32
2.1 Kontrastmittelpräparation des Larynx	32
2.1.1 Limitationen des Prozesses	33
2.2 Probenbezug und Präparation	34
2.3 Konservierung der Proben und Kontrastmittelanreicherung	35
2.4 Protokolle der Mikro-CT-Scans	37
2.5 Preprocessing der Mikro-CT Daten	38
2.6 3D-Modellierung der Kehlkopfbestandteile	40
2.7 Volumensbestimmungen der Muskulatur	42
3 Ergebnisse	43
3.1 Vorstudien zur Kontrastmittelanreicherung	43
3.2 Ermittlung der optimalen Kontrastmittelkonzentration	45
3.3 3D-Modell der laryngealen Strukturen	48
3.4 Ergebnisse der Volumensbestimmung	52
4 Diskussion	56
Literaturverzeichnis	65

Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
Art.	Articulatio
Cart./Cartt.	Cartilago /Cartilagine
CT	cricothyroid muscle, M. cricothyroideus, Anticus bzw. Computertomographie
I ₂ KI	Iod-Kaliumiodid
LCA	lateral cricoarytenoid muscle, M. cricoarytaenoideus lateralis, Lateralis
Lig.	Ligamentum
M./Mm.	Musculus/Musculi
MRT	Magnetresonanztomographie
N.	Nervus
PBFS	Phosphate-buffered formol-saline
PCA	posterior cricoarytenoid muscle, M. cricothyroarytaenoideus posterior, Posticus
Proc.	Processus
RLN	recurrent laryngeal nerve, N. laryngeus recurrens
SNR	Signal-to-noise ratio
STMF	slow tonic muscle fibers
TA	thyroarytaenoid muscle, M. thyroarytaenoideus

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Der menschliche Kehlkopf; Bild 1: Systematik der einzelnen Knorpel des Kehlkopfskeletts; Bild 2: Ansicht des Kehlkopfs von anterior (1)	19
Abbildung 2: Die Muskulatur des Larynx; Bild 1: Ansicht des Kehlkopfs von dorsal; Bild 2: Ansicht des Kehlkopfs von rechts nach Entfernen der rechten Lamina thyroidea (1)	26
Abbildung 3: Die Muskulatur des Kehlkopfs; Ansicht von kranial auf die Glottisebene (1)29	
Abbildung 4: Der Schweinelarynx, nach seiner Präparation; Bild 1: Ansicht von dorsal mit PCA (a); Bild 2 und 3: Ansicht von luminal nach Halbierung: M. vocalis (b), CT (c) und Lateralis (d).....	31
Abbildung 5: Präparation der Proben; Bild 1: Proben vor der Fixierung mit Formalin; Bild 2 und 3: Proben nach der Fixierung; Bild 4: Proben in den unterschiedlichen Kontrastmittelkonzentrationen.....	37
Abbildung 6: Durchführung der Mikro-CT-Scans; Bild 1: Siemens Inveon Mikro-CT-Scanner, Bild 2 und 3: Lagerung der Proben, während des CT-Vorgangs	38
Abbildung 7: Bild 1: Darstellung der verschiedenen Ansichten in Avizo; Bild 2: Markiertes Objekt, bevor es zum bestehenden Material hinzugefügt wird; Bild 3: Objekt nach dem Hinzufügen	41
Abbildung 8: Kontraste im Vergleich; Bild 1 und 2: Mikro-CT des Schweinekehlkopfs in horizontaler Ebene (0,9 % I2KI); Bild 3 und 4: Mikro-CT des Schweinekehlkopfs in horizontaler Ebene (1,8 % I2KI)	43
Abbildung 9: Mikro-CT des Schweinelarynx in horizontaler Ebene (1,8 % I2KI + Shaker)44	
Abbildung 10: Mikro-CT des Schweinelarynx in horizontaler Ebene (0,9 % I2KI + 4 % NBF)	45
Abbildung 11: Kontrastmittelstudie, Kontraste im Vergleich; Bild 1: 4F/1,8 %, Bild 2: 4F/3,75 %, Bild 3: 10F 7,5 %	46
Abbildung 12: Kontrastmittelstudie, Unterschiede durch Verwendung eines Exsikkators (+) oder unterschiedlicher Formalinkonzentrationen (4F vs. 10F); Bild 1: 4F/3,75+; Bild 2: 10F/3,75; Bild 3: 10F/3,75 +.....	47
Abbildung 13: Dreidimensionales Modell des Kehlkopfskeletts, Ringknorpel (a), Stellknorpel links (b), Stellknorpel rechts (c) und Schildknorpel (d)	49
Abbildung 14: Mikro-CT des Schweinelarynx in horizontaler Ebene; Darstellung der Muskulatur im Verlauf: TA links (blau), M. vocalis links (violett), PCA links (grün) und PCA rechts (orange)	50
Abbildung 15: Dreidimensionales Modell des Kehlkopfskeletts und der intrinsischen Kehlkopfmuskulatur	51
Abbildung 16: Volumensverteilung der intrinsischen Kehlkopfmuskulatur (Box-Plot)	53
Abbildung 17: Seitenvergleich der arithmetischen Mittel der intrinsischen Kehlkopfmuskulatur	54

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Mischverhältnisse zum Erlangen der benötigten Kontrastmittelkonzentration..	35
Tabelle 2: Protokoll mit den unterschiedlichen Präparationen im Rahmen der Kontrastmittelstudie.....	36
Tabelle 3: Absolutwerte der Muskelvolumina in cm ³	52

1 Einleitung

Der Larynx mit seinen unterschiedlichen Strukturen zählt zu den komplexesten Organen des menschlichen Körpers. Er ermöglicht nicht nur den Schutz vor Aspiration während des Schluckvorgangs, sondern dient auch wesentlich der Kommunikation. Im funktionellen Ablauf der einzelnen Vorgänge spielt vor allem die Kehlkopfmuskulatur eine entscheidende Rolle.

Das Problem an der Erforschung der intrinsischen Kehlkopfmuskulatur ist die schlechte Zugänglichkeit in vivo, da die Strukturen sowohl von Schleimhaut als auch vom umliegenden Gewebe bedeckt sind und somit ohne Zerstörung der natürlichen Verhältnisse nicht ausreichend darstellbar sind, um z.B. volumetrische Messungen durchführen zu können. Zusätzlich liegen die Larynx-Muskeln in mehr als einer Raumebene, wodurch sich eine weitere diagnostische Herausforderung ergibt. Dies wird vor allem in der Lupenlaryngoskopie, welche als Standarduntersuchung gilt, und in der mikroskopischen Laryngoskopie in Narkose deutlich. Hierbei können lediglich die Horizontal-Ebene und der subglottische Bereich dargestellt werden. Zur Analyse und Bestimmung von muskelspezifischen Fragestellungen ist es aber notwendig, diese Strukturen in ihrem Verlauf und in ihrer Ausdehnung genau abzubilden.

Für derartige Fragestellungen kann die dreidimensionale Rekonstruktion von Objekten herangezogen werden. Die Rekonstruktion eines Lebewesens kann dabei auf zwei unterschiedliche Weisen erfolgen. Einerseits besteht die Möglichkeit, die gewünschte Probe nach Konservierung durch einen mechanischen Serienschnitt in einzelne Schnittbilder umzuwandeln. Diese werden anschließend mit Hilfe eines Mikroskops digitalisiert und zu einem 3D-Datensatz zusammengefügt (1).

Obwohl es sich bei der histologischen Untersuchung um eine gut etablierte Methode handelt, gibt es einige Nachteile, die durch die Methodik selbst entstehen. So wird bei der Erstellung der einzelnen Schnitte die Probe für die Betrachtung unter dem Mikroskop zerstört und kann daher nur einmal verwendet werden. Zusätzlich kann es bei der Erzeugung der einzelnen Schnitte zur Deformierung des Gewebes kom-

men, da einzelne Materialien unterschiedliche physikalische Eigenschaften aufweisen. Besondere Sorgfalt muss bei der Rekonstruktion auf die richtige Lage der Objektträger gelegt werden, damit es bei deren Aneinanderreihung der Schnittbilder nicht zu einer Verschiebung oder Verdrehung und somit zu einer Artefaktbildung kommt (2-5).

Die Generierung hochwertiger Bilddaten ist bei diesem Verfahren nicht nur abhängig von der Auflösung des Mikroskops, sondern auch von der Anzahl der angefertigten Schnitte. Damit diese erhöht werden kann, muss die Schichtdicke verringert und in Relation die Schnittanzahl vergrößert werden. Dies bedeutet eine deutliche Steigerung des Arbeitsaufwandes, da viele Arbeitsschritte per Hand durchgeführt werden müssen. Dadurch ist eine durchschnittliche Auflösung von 60 - 340 µm erreichbar (2). Die Vergleichbarkeit der einzelnen Schnitte hängt zusätzlich von der Qualität der Färbung ab. Da jeder Schnitt separat angefärbt werden muss, kann es zu Unterschieden in der Kontrastierung der einzelnen Gewebe kommen (3).

Bei der zweiten Methode handelt es sich um die Abbildung des gesamten Volumens durch technische Hilfsmittel wie zum Beispiel der Magnetresonanztomographie (MRT) oder Computertomographie (CT), wobei das Endresultat ebenfalls Schnittbilder darstellt (1).

Die Möglichkeit das Volumen einer Probe in seiner Gesamtheit abzubilden, wie es mit Hilfe von Methoden der Bildgebung durchgeführt werden kann, bietet den Vorteil, dass das umliegende Gewebe intakt bleibt und nicht bei der anatomischen Präparation verletzt wird. Dadurch können die räumlichen Beziehungen der Komponenten zueinander genauer beobachtet werden (6). Zusätzlich kann im Vorfeld zur Verbesserung des Endresultats eine Optimierung des Scanprotokolls erfolgen (3). Zu beachten ist dennoch, dass es sich um eine ex vivo Untersuchung handelt und daher der fehlende Muskeltonus die Ergebnisse bis zu einem gewissen Grad verfälschen kann (6). Neben dem deutlich besseren Zeit-Auflösungs-Verhältnis bietet diese Technik die Möglichkeit, Materialien mit deutlichen Abschwächungseigenschaften von ionisierender Strahlung in besonders gutem Kontrast abzubilden (3).

Der große Vorteil des MRT liegt in der guten Weichteilkontrastierung, ohne dass dafür eine aufwendige Kontrastmittelapplikation notwendig ist. Dennoch unterliegt diese Technik durch die physikalischen Eigenschaften des Wassermoleküls einer

Limitation in der Auflösung von 8 μm . Bei einem MRI-Puls von 100 ms ist der Bewegungsumfang dieses Moleküls mittels Selbstdiffusion auf 8 μm beschränkt. Bei einer Erhöhung der Auflösung kommt es jedoch zum Anstieg der „signal-to-noise ratio“ (SNR), welche wiederum nur durch eine Verlängerung der Scandauer minimiert werden kann. Dadurch kommt es beim MRT zu deutlich längeren Aufnahmezeiten (3).

In dieser Studie wurde ein Mikro-CT verwendet, welches sich im Gegensatz zum konventionellen CT auf kleinere Volumina beschränkt. Diese werden mit einer sehr hohen Auflösung abgebildet. Aus den generierten Mikro-CT Daten ist es möglich Muskelvolumina zu bestimmen und mit Hilfe von 3D-Rekonstruktionen sowohl die Faserarchitektur als auch die Muskelvolumina genauer zu analysieren (7).

Die Technologie des Mikro-CTs bietet einige Vorteile gegenüber den gängigen Methoden der Analyse muskulärer Strukturen. Das Micro-CT erlaubt ein deutlich besseres Zeit-Nutzen-Verhältnis (2,3), denn für eine Auflösung von 36 μm wird im CT etwa eine Stunde Scanzeit benötigt. Das Mikro-CT ist lediglich von den Eigenschaften des Gerätes abhängig und es konnten bereits Auflösungen von 1 μm erzielt werden. Das 3-Tesla-MRT hingegen erreicht nur eine Auflösung von 300 μm bei einer Dauer von etwa 16 Stunden (3). In einer Studie von Chen et al. (8), in der versucht wurde den Larynx in einem 7-Tesla Mikro-MRT abzubilden, konnte bei einer Aufnahmezeit von zweieinhalb Stunden eine Auflösung von 175 x 175 x 250 μm pro Voxel erzielt werden.

Eine Weiterbearbeitung durch Rekonstruktionsprogramme erzeugt schließlich eine dreidimensionale Bildinformation, die aus Voxeln besteht. Diese enthalten im Fall des Mikro-CTs Informationen über die Abschwächung der ionisierenden Strahlung eines einheitlichen Volumens an einem bestimmten Punkt in der Probe, welcher als spezifischer Grauwert ausgegeben wird (1). Durch die Nutzung relativ hoher Energien sollte dieses Verfahren nicht an lebenden Organismen durchgeführt werden (3).

Bei der Erforschung von Geweben, die relativ ähnliche Absorptionseigenschaften bezüglich ionisierender Strahlung besitzen wie zum Beispiel Weichteile oder muskuläre Strukturen, hat das Mikro-CT bis jetzt nur eine geringe Bedeutung, da es

nicht möglich war, die einzelnen Strukturen in ausreichender Weise zu differenzieren (3). Einen Paradigmenwechsel konnte Metscher (1) durch seine Studien an Embryos erzielen. Seine Forschungen beschäftigten sich mit unterschiedlichen Kontrastmitteln, mit denen er ein besseres Ergebnis in der Darstellung diverser Strukturen bei Mikro-CT-Scans erzielen möchte. Diese führten zu dem Ergebnis, dass die Vorbearbeitung der Embryonen mit Iod-Kaliumiodid (I_2KI) in wässriger Lösung, nachdem diese zur Konservierung in Formalin eingelegt wurden, gute Ergebnisse in der Kontrastanreicherung boten.

Diese Forschungsergebnisse bildeten die Basis für eine gezieltere Erforschung von I_2KI durch Jefferey und Stephenson (7). In dieser Studie wird das Potential dieses Kontrastmittels, welches in der detailreichen Darstellung muskulärer Strukturen liegt, aufgezeigt. Durch ihre Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die Anreicherung der Proben mit jodhaltigem Kontrastmittel eine deutliche Verbesserung des Weichteilkontrasts im Gegensatz zur Kontrollgruppe erzielte. Bei dem untersuchten M. masseter konnten einzelne Muskelanteile mit ihrer septalen Trennung abgebildet werden. Dies lässt den Rückschluss zu, dass das Kontrastmittel eine stärkere Affinität zu Muskelfasern aufweist, jedoch das Epimysium, welches die Muskelkompartimente, und das Perimysium, welches einzelne Faserbündel voneinander trennt, ausspart. Selbst eine Trennung einzelner Fasern durch Endomysium konnte in einigen Bereichen des Scans nachgewiesen werden. Diese Erkenntnisse wurden durch eine histologische Nachbearbeitung der Proben bestätigt. Es zeigt sich zusätzlich, dass die Anreicherung des Gewebes mit Iod sowohl von der Einlegedauer, der Konzentration und auch von der Größe der jeweiligen Probe abhängt (7).

Diese Affinität des Iods zu muskulären Strukturen im Gegensatz zum Bindegewebe konnte in einer weiteren Versuchsreihe gezeigt werden, bei der Knochen und das ihn umgebende Gewebe nach der Behandlung mit I_2KI elektronenmikroskopisch untersucht wurde. Hier zeigte sich ebenfalls eine bessere Kontrastierung der quergestreiften Muskulatur (9).

Der genaue Mechanismus der Iod-Bindung an die Muskelfasern ist noch nicht erforscht, vermutet wird jedoch, dass es zum Einschluss des Iods in den Glykogenkomplex, welcher sich innerhalb der Muskelzelle befindet, kommt. Diese Bindung

bewirkt eine stärkere Absorption der ionisierenden Strahlung im Mikro-CT, welches zu einer Erhöhung des Kontrasts führt (7,10,11).

1.1 Ziel der vorliegenden Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die oben beschriebene Methode im Bereich der Larynxweichteile anzuwenden. Es soll erforscht werden, ob es möglich ist, die komplexen Verhältnisse, innerhalb dieses Organs auf diese Weise abzubilden. Dafür wird die minimale Konzentration von Kontrastmittel ermittelt, die ein optimales Ergebnis liefert, ohne dabei störende Nebeneffekte wie Schrumpfung auszulösen. Ein besonderes Augenmerk wird dabei auf die muskulären Strukturen gelegt, vor allem den M. cricoarytaenoideus posterior (PCA) und M. thyroarytaenoideus (TA), da diese beiden Muskeln Ziele einer späteren Forschungsarbeit werden, die sich mit dem Muskelwachstum durch elektrische Stimulation des N. laryngeus recurrens beschäftigt.

Im Rahmen dieser Diplomarbeit soll zusätzlich herausgefunden werden, ob es möglich ist, nach der Segmentation die Volumina der Muskeln zu bestimmen. Auf diese Weise können in weiteren Studien retrospektiv die erhobenen Volumina zum Nachweis des Muskelwachstums der Stimulations- gegenüber der Zielgruppe verglichen werden.

1.2 Die Anatomie des menschlichen Larynx

Wie bereits eingangs erwähnt, gilt der Larynx als eines der komplexesten Strukturen des menschlichen Körpers. Durch die fein regulierte Zusammenarbeit von Schleimhaut, Muskulatur und ihrer neuralen Versorgung ist es diesem Organ möglich, unterschiedlichste Aufgabenbereiche zu bewältigen. Der Larynx gehört zu den oberen Atemwegen und steht durch seine Sphinkterfunktion am Scheideweg von Atmung und Nahrung. Somit dient dieser als Schutz der Atemwege vor Aspiration während des Schluckvorgangs. Des Weiteren wird der Luftfluss während der Atmung durch

die Glottisstellung reguliert. Zuletzt ermöglicht der besondere Aufbau des Stimmapparats über die Phonation eine Kommunikation mit der Umwelt (12).

Im folgenden Kapitel wird daher näher auf den anatomischen Aufbau des Larynx eingegangen. Dieses Grundwissen ermöglicht es, die im Mikro-CT sichtbaren Strukturen den einzelnen Teilen des Kehlkopfs zuzuordnen.

1.2.1 Das knorpelige Grundgerüst

Der solide Anteil des Larynx, der den fibrösen Membranen und der Muskulatur als Ansatz dient, besteht sowohl aus einem knöchernen Anteil, dem Os hyoideum, als auch aus hyalinem bzw. elastischem Knorpel. Das Grundgerüst wird dabei von den hyalinen Knorpeln, der Cart. thyroidea, der Cart. cricoidea und den paarigen Cartt. arytaenoideae aufgebaut. Ein weiterer Bestandteil stellt die aus elastischem Knorpel bestehende Cart. epiglottica dar. Vor allem die hyalinen Anteile des Larynxskeletts zeigen eine Tendenz zur Verknöcherung, die etwa mit dem 25. Lebensjahr im Schildknorpel beginnt und auch im weiteren Verlauf des Lebens die anderen Knorpel betrifft. Um mögliche Missinterpretationen in der Auswertung der Mikro-CT Bilder zu vermeiden, muss diese Tatsache mitberücksichtigt werden (12).

Das Zungenbein (Os hyoideum)

Das Zungenbein spielt - neben der Vielzahl an Zungenmuskeln die hier ihren Ansatz finden - auch im Grundgerüst des Kehlkopfs eine wichtige Rolle, da es als Aufhängepunkt und den Levatormuskeln des Larynx als Ansatz dient (12). Dieses Sesambein besteht aus einem Körper und jeweils zwei Fortsätzen, die als großes und kleines Horn bezeichnet werden (13).

Der Schildknorpel (Cartilago thyroidea)

Die Cart. thyroidea als größter Knorpel des Kehlkopfskeletts besteht aus zwei rechteckigen Platten (Laminae), die sich in der Mitte vereinigen und dabei einen vom Geschlecht abhängigen Winkel bilden. Auch die Form des Schildknorpels unterliegt

einem Geschlechtsdimorphismus. Die Fusionsstelle der Platten ist als Prominentia thyroidea von vorne her tastbar und gilt als wichtige Landmarke. Da die Laminae nicht komplett miteinander verschmelzen, entsteht oberhalb der Prominentia die Incisura thyroidea superior und unterhalb die nur seichte Incisura thyroidea inferior. Am hinteren oberen Ende des Schildknorpels entspringt auf beiden Seiten jeweils ein Cornu superius, das über das Lig. thyrohoideum laterale eine Verbindung mit dem Cornu majus des Zungenbeins eingeht und ein Cornu inferius, das in gelenkiger Verbindung mit dem Ringknorpel steht (12-14).

Der Ringknorpel (Cartilago cricoidea)

Die Cart. cricoidea liegt direkt unterhalb der Cart. thyroidea und formt einen geschlossenen Ring um den Atemweg. Die Trachea bildet dessen Fortsetzung und geht über die erste Trachealspange eine enge Verbindung mit dem Lig. cricotracheale ein (14). Seine Form wird mit der eines Siegelrings verglichen, da er aus einem nach anterior gerichteten Bogen, dem Arcus, und einer dorsalen Fläche, der Lamina, besteht (13).

Die Lamina erreicht etwa eine Höhenausdehnung von 20 - 30 mm (12,14) und flacht nach vorne hin ab auf 5 - 7 mm (14). Dieser Teil ist durch die Haut tastbar und dient somit auch als Orientierungspunkt. Durch die dorsoantere Höhendifferenz weist der Ringknorpel unterschiedliche Durchmesser auf. Die Form der Unterseite ist annähernd kreisförmig, die obere Öffnung entspricht einer Ellipse (14).

An der seitlichen Außenfläche des Ringknorpels befinden sich neben der gelenkigen Verbindung zum Cornu inferius der Cart. thyroidea, die Ansatzflächen des M. cricothyroideus und des M. constrictor pharyngis inferior. An der Rückfläche findet man zwei seichte Gruben, an denen der PCA ansetzt. In der Mitte zwischen diesen Einbuchtungen befindet sich eine Leiste, die zur Fixation der Lamina muscularis externa des Ösophagus dient. Die gelenkige Verbindung zu den Cartt. arytaenoideae befindet sich am kranialen Ende der Lamina (13).

Die Epiglottis (*Cartilago epiglottica*)

Die Epiglottis ist ein dünner elastischer Knorpel, der mit seinem breiten oberen Ende die vordere Begrenzung des Kehlkopfeingangs bildet. Von den Seitenflächen zieht eine Schleimhautfalte, die Plica aryepiglottica, zu den Stellknorpeln und umschließt den Aditus laryngis (14). Nach unten verjüngt sie sich zu einem Stiel, dem Petiolus, der mit Hilfe des Lig. thyroepiglotticum an der Innenseite des Schildknorpels unterhalb der Incisura thyroidea superior befestigt ist. Die Form der Epiglottis wird mit der eines Blattes verglichen (12).

Die *Cartilago epiglottica* weist zwei Seiten auf, eine linguale Vorderseite, deren unterer Teil über das Lig. hyoepiglotticum eine Verbindung zum Zungenbein hat, und eine laryngeale Hinterseite (14).

Der Stellknorpel (*Cartilago arytaenoidea*)

Der paarig angelegte Stellknorpel sitzt mit seiner Basis an der hinteren Oberkante dem Ringknorpel auf. Neben einer Spitze sind die beiden Fortsätze, Proc. vocalis und muscularis, für seine pyramidenähnliche Form verantwortlich. Dieser Knorpel besteht aus insgesamt drei Flächen: eine Rückfläche, die als Ursprung für den M. arytaenoideus transversus dient, einer medialen Fläche, die mit Schleimhaut überzogen den intercartilaginären Teil der Glottis bildet und einer antero-lateralen Fläche. Dieses Areal des Stellknorpels wird von der Spitze bis zum Proc. muscularis durch eine Leiste in zwei Gruben unterteilt. Beide dienen als wichtige Ansatzpunkte, die obere Einbuchtung für das Lig. vestibulare und die untere für die Mm. vocalis und thyroarytaenoideus lateralis (14).

Die *Cart. arytaenoidea* besteht zum Großteil aus hyalinem Knorpel, bis auf den Apex und die Procc. vocales, die aus elastischem Knorpel aufgebaut sind (12). Man nimmt an, dass dies auf die Funktion zurückzuführen ist, denn bei der Adduktion berühren sich die Procc. vocales nur an diesen Stellen (14).

Zusätzliche Knorpel des Grundgerüsts

Im Bereich des oberen Kehlkopfs befinden sich noch einige kleinere Knorpel. Die *Cartt. corniculatae* (Santorini) sitzen den Spitzen der Stellknorpel auf. Zusammen

mit den Cartt. cuneiformes (Wrisberg) geben sie den Plicae aryepiglotticae ihre typische Form und sind durch die Schleimhaut zu erahnen. Ihre Funktion liegt in der Verstärkung der aryepiglottischen Falten, wodurch sie beim Schlucken helfen, die Nahrung in die Sinus piriformes zu leiten. In das Lig. thyrohyoideum laterale eingebettet findet man die nicht immer vorhandene Cart. triticea (12).

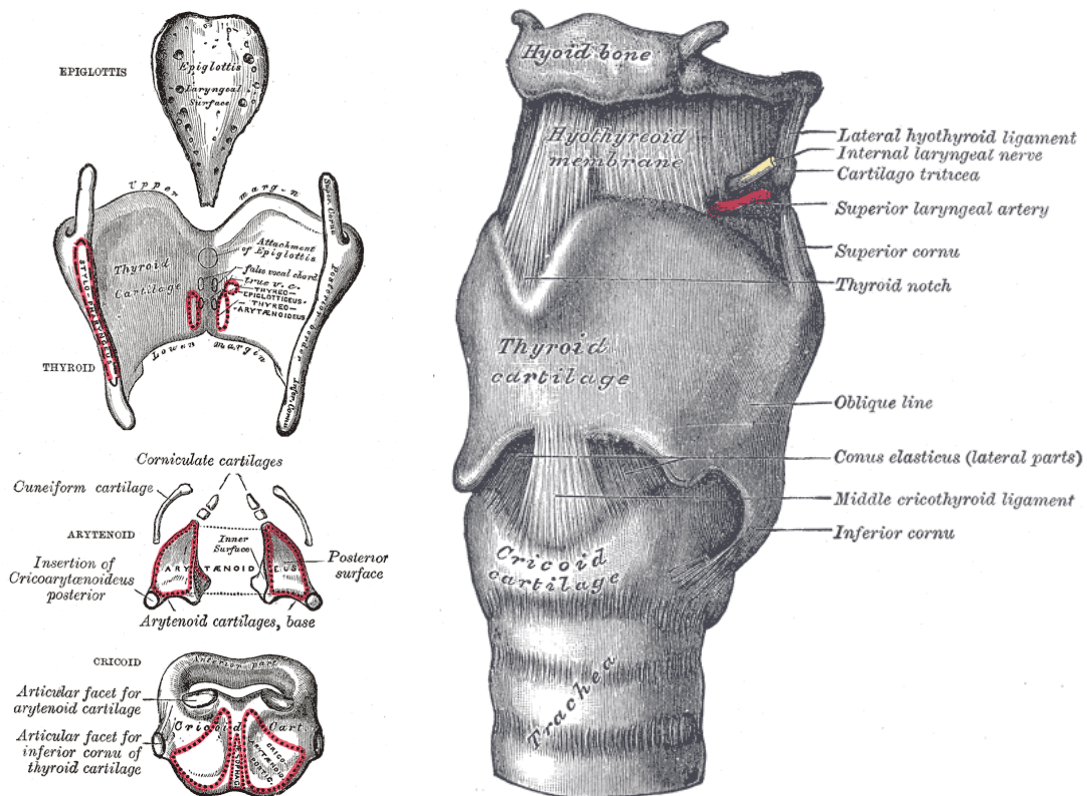


Abbildung 1: Der menschliche Kehlkopf; Bild 1: Systematik der einzelnen Knorpel des Kehlkopfskeletts; Bild 2: Ansicht des Kehlkopfs von anterior (1)

1.2.2 Räume und bindegewebige Membranen

In der anatomischen Literatur wird bei den bindegewebigen Membranen des Kehlkopfs zwischen externen und internen Anteile unterschieden. Die äußeren Kehlkopfbänder befestigen den Kehlkopf zwischen dem Zungenbein und der Trachea. Die inneren Bandstrukturen verbinden die laryngealen Knorpel innerhalb des Kehlkopfs. (13). Zwischen diesen bindegewebigen Verbindungen und dem Kehlkopfskelett entstehen Räume, die keine abgeschlossenen Kompartimente ergeben (14).

Extrinsische Kehlkopfbänder

Die Membrana thyrohyoidea, die aus fibroelastischem Bindegewebe aufgebaut ist, reicht vom Corpus und den Cornua maiores des Os hyoideum bis zum oberen Rand und den Cornua superiores des Schildknorpels. Nach vorne und zu beiden Seiten verdickt sich diese Membran zu einem Lig. thyrohyoideum medianum und den beiden Ligg. thyrohyoidea lateralia. So wird der Kehlkopf nach oben hin am Zungenbein befestigt. Die kaudale Verbindung des Kehlkopfs zur Trachea besteht durch das Lig. cricotracheale (14).

Intrinsische Kehlkopfbänder

Die Membrana fibroelastica laryngea, die mit ihrem dichten Netz aus elastischen Fasern zur Lamina propria gerechnet wird (13), spannt sich zwischen dem laryngealen Grundgerüst auf, wobei sie sich an zwei Stellen, den Ligg. vocalia und vestibulares, verdickt. Im Raum zwischen den Bändern fehlt diese Membran. Die Membrana fibroelastica laryngea lässt sich in die Membrana quadrangularis und den Conus elasticus untergliedern (14).

Die Membrana quadrangularis verbindet die Seitenflächen der Epiglottis mit den Stellknorpeln und läuft nach kranial und kaudal in einen freien Rand aus. Die freien Ränder verdichten sich zu Bandstrukturen. Den oberen Rand bildet das Lig. aryepiglotticum, welches als Grundlage für die gleichnamige Schleimhautfalte dient. Das Lig. vestibulare, das vom unteren Anteil der Epiglottis bis zur Fovea triangularis des Stellknorpels zieht, wird durch den unteren freien Rand aufgebaut (12).

Die Verbindung zwischen Ring- und Schildknorpel ist durch das Lig. cricothyroideum gegeben, welches aus der Membrana cricothyroidea und dem dünneren Conus elasticus besteht. Die Membrana cricothyroidea reicht vom Unterrand des Thyroids bis zum Oberrand des Cricoids und ist im vorderen Bereich zum Lig. cricothyroideum medianum verdichtet (14). Die Ligamenta triangularia, die zusammen den Conus elasticus bilden, inserieren mit der Unterkante am Ringknorpel (12). Diese bindegewebige Membran läuft an der Innenseite des Schildknorpels nach oben bis zum Ansatzpunkt etwa in der Mitte des Winkels. Von dort läuft der freie obere Rand, der sich zum Lig. vocale verdichtet, bis zum Proc. Vocalis des Stellknorpels (14).

Aufbau der Stimmlippen

Die Stimmlippen bestehen jeweils aus fünf Schichten, die in folgender Art und Weise von außen nach innen angeordnet sind: Die Mukosa, bestehend aus einem geschichteten Plattenepithel und der Basallamina, stellt die erste Schicht dar. Diese Schleimhautschicht ist sehr dünn und an der Lamina propria befestigt, wodurch sich deren perlweiße Farbe in vivo ergibt. Auf die Mukosa folgt die dreischichtige Lamina propria, die sich jeweils aus einer anderen Art von Bindegewebe zusammensetzt. Die oberste Schicht enthält lockeres kollagenes und elastisches Bindegewebe und geht nur eine lockere Verbindung mit dem Lig. vocale ein. Die mittlere Schicht bestehend aus kollagenen Fasern formt zusammen mit der tiefsten Schicht der Lamina propria, die kollagenes Bindegewebe enthält, das Lig. vocale. Dieses vereint sich an der vorderen Kommissur mit dem Perichondrium und bildet das Broyle-Band, welches Blut- und Lymphgefäße mit sich führt. Der M. vocalis bildet die letzte und innerste Schicht der Stimmlippen (12).

Gliederung der Cavitas laryngis

Im Inneren kann der Kehlkopf in drei getrennte Bereiche unterteilt werden, die vor allem eine klinische Bedeutung haben: der supraglottische Raum, die Glottis und der subglottische Raum (15).

Die Supraglottis kann wiederum in zwei Kompartimente untergliedert werden. Der Epilarynx erstreckt sich von der laryngealen Fläche der Epiglottis über die Plicae aryepiglotticae zu den Höckern des Stellknorpels. Darunter liegt das Vestibulum bestehend aus dem Petiolus der Epiglottis, den Taschenfalten und den Ventriculi laryngis (15).

Durch die Rima vestibuli, die den Spaltraum zwischen den Falten darstellt, gelangt man ins mittlere Stockwerk, die Cavitas glottica. Den unteren Abschluss bildet der freie Rand des Conus elasticus, die Plicae vocales, die zusammen mit den Stellknorpeln die sagittal eingestellte Rima glottidis bilden. Man kann zwischen der Pars intermembranacea, die von den Stimmlippen, und der Pars intercartilaginea, die im hinteren Bereich von den Stellknorpeln begrenzt wird, unterscheiden. Zu beiden Seiten eröffnet sich dieser Bereich in die Ventriculi laryngis, die sich weiter kranial in die Sacculi laryngis fortsetzen (13).

Von der Rima glottidis bis zur unteren Begrenzung des Stellknorpels reicht das dritte Stockwerk des Larynx, die Cavitas infra- oder subglottica. Die Form dieses Raums verjüngt sich zu den Stimmlippen hin, was darauf schließen lässt, dass dessen Funktion in der Beschleunigung des Luftstroms zur Rima glottidis hin liegt (14).

1.2.3 Die Muskulatur des Larynx

Die Muskulatur des Larynx kann in ihrer Funktion und Lage in drei Gruppen eingeteilt werden: die akzessorische, die extrinsische und die intrinsische Muskulatur. Die akzessorische Muskulatur setzt nur mit einem Punkt am Larynx an und hat so die Möglichkeit, diesen zu heben bzw. zu senken (12). Zu den Levatoren gehören die Mm. digastricus, genohoideus und mylohoideus. Die Funktion dieser Muskulatur besteht in der Aspirationsprophylaxe, da der Kehlkopf beim Schluckvorgang unter den Zungengrund gezogen wird. Weitere Vertreter dieser Gruppe sind der M. stylohyoideus und hyoglossus. Zur Gruppe der Larynxdepressoren werden die Mm. sternohyoideus, sternothyroideus und omohoideus gerechnet. Der M. thyrohoideus nähert den Schildknorpel und das Os hyoideum einander an. Durch den Ansatz der mittleren und unteren Schlundschnüerer am Larynx kann dieser zusätzlich nach hinten oben gezogen werden (12). Auf die akzessorische Muskulatur wird in diesem Kapitel nicht weiter eingegangen, da sie im Rahmen der Studie nicht näher untersucht wurden. Allerdings gilt zu erwähnen, dass sie durch die Lageänderung des Kehlkopfs einen Einfluss auf die Tonhöhe und das Timbre der Stimme haben (14).

Durch seine Lage an der Außenfläche des Kehlkopfs wird der paarige M. cricothyroideus (CT, „Anticus“) zu der Gruppe der extrinsischen Kehlkopfmuskeln gezählt. Dieser Muskel hat seinen Ursprung am vorderen Abschnitt des Ringknorpels und teilt sich in seine zwei Anteile. Während die Pars recta am unteren Rand der Cart. thyroidea inseriert, zieht die Pars obliqua schräg nach posterior zum Cornu inferior (13). Durch die Kontraktion des Muskels wird der vordere Anteil des Ringknorpels dem Schildknorpel angenähert. Diese Kippbewegung bewirkt eine Dehnung der Stimmlippen bis zu einem Drittel ihres Ausgangswerts. Dadurch sinkt die Masse in Relation zur Länge, wodurch die Kanten der Stimmlippen spitzer werden. Diese Adaptionen können zur Steigerung der Tonhöhe genutzt werden. Gleichzeitig treten

die Stimmbänder relativ gesehen etwas tiefer und bewirken eine Adduktion der Rima glottidis (12).

Die letzte Gruppe enthält die intrinsischen Larynxmuskeln, welche an den Stellknorpeln ansetzen (12). Neben der in dieser Arbeit verwendeten, klinisch relevanten Einteilung der Muskulatur nach ihrer Hauptfunktion auf die Glottis, Ad- oder Abduktion, gibt es zahlreiche weitere Möglichkeiten der Klassifikation. Neben der Ab- und Adduktion der Stimmbänder haben die Kehlkopfmuskeln einen wichtigen Einfluss auf die Phonation, in dem sie die physikalischen Eigenschaften der Stimmbänder modulieren. So können sie durch Änderung der Spannung oder der Masse die Vibrationseigenschaften den notwendigen Anforderungen anpassen (12). Es kann zwischen dem Stellapparat, der Einfluss auf die Form der Rima glottidis hat, und dem Spannapparat, der die unterschiedlichen Spannungszustände der Stimmlippen reguliert, unterschieden werden (15). Die Öffnungsfläche der Glottis wird durch die Mm. cricoarytaenoideus lateralis, arytaenoideus obliquus, arytaenoideus transversus und den PCA reguliert. Die unterschiedlichen Spannungszustände der Stimmlippen können durch den PCA, den TA, den M. vocalis und den extrinsischen M. cricothyroideus verändert werden. Zu beachten ist, dass sich die Funktionen dieser Gruppen häufig überschneiden. Zur letzten Gruppe, welche Einfluss auf den Kehlkopfeingang hat, gehören die Mm. aryepiglotticus, thyroepiglotticus und arytaenoideus obliquus (14).

Zum leichteren Verständnis der Bewegungsabläufe innerhalb des Larynx wird einerseits die Bewegung im Gelenk zwischen Stell- und Ringknorpel auf die Rotationskomponente reduziert, andererseits wird die Funktion eines einzelnen Muskels isoliert beobachtet. Zum exakten Verständnis der komplexen Bewegungsmuster mit ihrer Feinregulierung ist es jedoch wichtig, die Interaktionen zwischen den einzelnen Gruppen nicht zu vernachlässigen (12).

Adduktoren der Glottis

Der M. arytaenoideus transversus ist der einzige unpaarige Muskel und verbindet die beiden Stellknorpel an der Rückfläche miteinander. Durch seinen Ansatz an den lateralen Rändern nähern sich bei deren Kontraktion die beiden Cartt. arytaenoideae einander an, ohne dabei zu rotieren, wodurch der Anteil der Rima glottidis,

der sich zwischen den Stellknorpeln befindet, verschlossen wird. Oberflächlich zu diesem zieht von der Spitze des Stellknorpels zum kontralateralen Proc. muscularis der paarige M. arytaenoideus obliquus. Durch die günstigere mechanische Kraftwirkung ist ihre Funktion vermutlich stärker als die des M. arytaenoideus transversus, aber sie bewirken dennoch nur eine geringe Adduktion der Stimmlippen (14). Am freien Rand der Membrana quadrangularis verläuft der M. aryepiglotticus als Fortsetzung des M. arytaenoideus obliquus von der Epiglottis zu den Stellknorpeln (12). Die beiden Muskeln zusammen ermöglichen durch ihre meist schwache Ausprägung nur eine geringe Sphinkterwirkung am Kehlkopfengang (14).

Der M. cricoarytaenoideus lateralis setzt am vorderen Anteil des Proc. muscularis an. Seinen Ursprung hat er im anterolateralen Bereich des Ringknorpels. Die Kontraktion bewirkt eine Annäherung der beiden Muskelfortsätze des Stellknorpels, wodurch die Pars membranacea geschlossen wird. Neben der Adduktion bewirkt dies eine Relaxation und Verkürzung der Stimmlippen (14). Durch den Zug an diesen werden die freien Enden verschmälert. Die äußersten Fasern haben das Potential, die Stellknorpel zur Abduktionsstellung zu bringen, da sie in der Achse des Gelenks liegen. Bei der Flüsterstellung wird die Pars membranacea der Stimmlippen aneinander geführt, bei gleichzeitiger Entfernung der Pars intercartilaginea voneinander. Es entsteht durch die Kombination der ab- und adduktorischen Eigenschaften des Muskels ein Dreieck, durch welches Luft für die Phonation entweichen kann (12).

Die Kontraktion der oben genannten Muskeln führt zu einer Adduktion der Glottis vor allem im hinteren Bereich. Dieser Vorgang reduziert den Atemfluss am Beginn der Phonation. Es bleibt im Bereich der Pars membranacea ein Spalt bestehen. Die Stimme würde bei isolierter Kontraktion dieser monoton klingen und wäre in der Lautstärke unflexibel (16).

Abduktoren der Glottis

Der einzige Vertreter dieser Gruppe ist der PCA. Dieser entspringt von den beiden Einkerbungen an der Rückfläche des Cricoids. Er verläuft zur posterokraniellen Fläche des Proc. muscularis. Durch die Rotation des Stellknorpels und der damit verbundenen Entfernung der Procc. musculares voneinander, bewirkt dieser Muskel

bei Kontraktion als einziger eine Abduktion der Stimmbänder. Zusätzlich kann dieser Muskel durch Gegenzug bei der Kippbewegung des Schildknorpels eine Verlängerung der Stimmbänder bewirken (12,14).

Beim Menschen besteht der PCA aus zwei unterschiedlichen Kompartimenten, welche von eigenen Nervenästen des Nervus laryngeus recurrens (RLN) versorgt werden. Zwischen den zwei Bereichen sind nur wenige Anastomosen vorhanden, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass es sich um getrennte Muskeln mit eigener Funktion handelt. Es wird zwischen einem vertikalen, der seitlich am Proc. muscularis ansetzt, und einem horizontalen Anteil, der am mittleren Bereich des Fortsatzes inseriert, unterschieden. Der Funktionsunterschied konnte beim Menschen noch nicht festgestellt werden, jedoch wurde in Experimenten mit Hunden (17) diese Thematik untersucht. Anatomisch gesehen unterscheidet sich der Hund in dem Aspekt vom Menschen insofern, dass der PCA aus drei Kompartimenten besteht: einem horizontalen, schrägen und einem vertikalen. Diese inserieren in unterschiedlicher Weise am Proc. muscularis, wodurch drei verschiedene Bewegungsmuster ausgeführt werden können. Eine seitliche Gleitbewegung ermöglicht es dem Stellknorpel die Glottis bei normaler Inspiration in einer Dreiecksform zu öffnen. Bei starker Inspiration kommt es durch eine Rückwärtsneigung des Stellknorpels zu einem lateralen Auseinanderweichen der Procc. vocales. Es ergibt sich die Form eines Pentagons, welches die maximale Öffnungsfläche darstellt. Bei der dritten Bewegung handelt es sich um eine reine Rotation, wobei dieses Bewegungsmuster nicht genau nachgewiesen werden kann (12).

Das vertikale und schräge Kompartiment führt bei elektrischer Stimulation die ersten beiden Bewegungen, also ein seitliches Gleiten und ein nach hinten Neigen des Stellknorpels aus. Dies ist für die Abduktion bei der Inspiration von Bedeutung. Der horizontale Anteil hingegen verursacht eine Schwenkbewegung der Procc. vocales, die eventuell bei der Positionierung während der Phonation eine Rolle spielen könnten. Es besteht zusätzlich die Möglichkeit, dass es zu keiner Abduktion, sondern im Gegenteil zur Adduktion mit einer Annäherung der hinteren Anteile des Stellknorpels kommt (12).

Die muskulären Kompartimente können in weiterer Folge aufgrund ihrer Zusammensetzung aus „slow-twitch“-Fasern und „fast-twitch“-Fasern unterschieden werden. Die jeweilige Zusammensetzung hat Einfluss, ob es sich um dynamische oder tonische Bewegungen handelt. Bei der Untersuchung der drei Anteile des PCA wurde festgestellt, dass das horizontale Kompartiment mit 41 % fast doppelt so viele „slow-twitch“-Fasern enthält wie das schräge Kompartiment (23 %), was wiederum auf einen Funktionsunterschied der beiden Anteile schließen lässt (12).

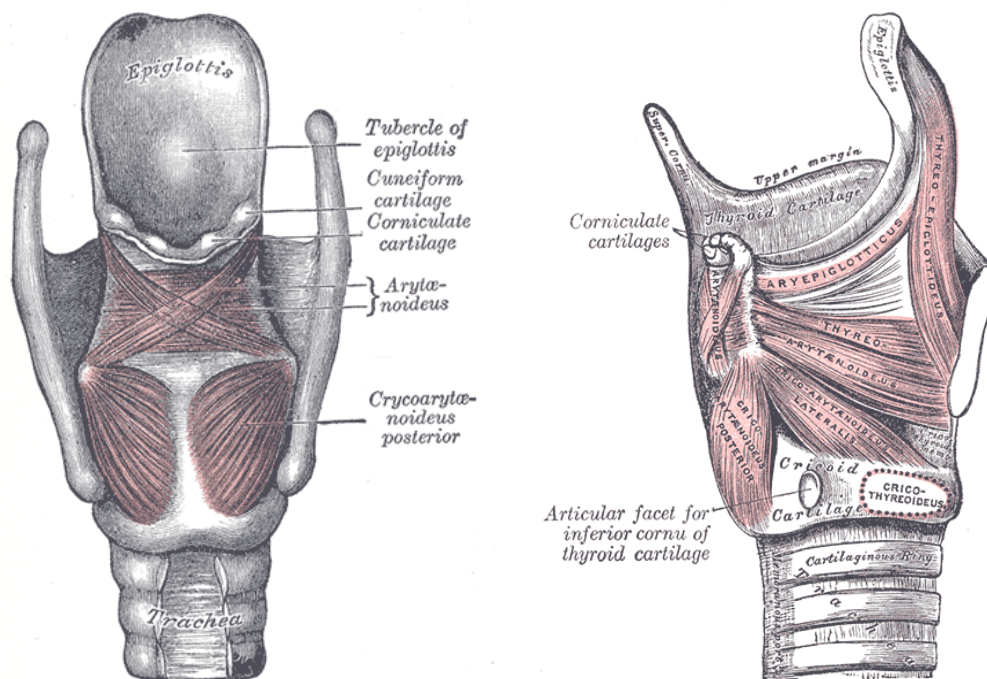


Abbildung 2: Die Muskulatur des Larynx; Bild 1: Ansicht des Kehlkopfs von dorsal; Bild 2: Ansicht des Kehlkopfs von rechts nach Entfernen der rechten Lamina thyroidea (1)

Muskulatur zur Stimmlippenspannung

Der TA entspringt als erster Vertreter dieser Gruppe an der Innenseite des Schildknorpels (untere Hälfte) und zieht zur Fovea oblongata des Stellknorpels. Dieser breite Muskel lässt sich in verschiedene Bereiche untergliedern (14). Untersucht wurde die Teilung dieses Muskels am Hundemodell. Dazu wurden die Muskelfasern nach ihrem Adenosintriphosphat (ATP)-Gehalt angefärbt, um ihren Gehalt an „slow-twitch“ und „fast-twitch“ Fasern zu ermitteln. Mit Hilfe dieser Methode konnten drei unterschiedliche Konzentrationsansammlungen in den Fasern ermittelt werden, welche zusammengefasst ein Kompartiment ergeben. Der laterale Anteil wird als „Muskularis“ bezeichnet und besteht bis zu 100 % aus „fast-twitch“ Fasern. Dieses

Kompartiment erstreckt sich vom Schildknorpel bis zum Proc. muscularis. Bei der Kontraktion kommt es zu einer Adduktion der Stimmlippen, wodurch die Pars membranacea geschlossen wird (12). Die posteriore Glottis bleibt geöffnet. Dadurch wird die Phonationszeit durch vermehrten Luftverlust vermindert. Um einen vollständigen Verschluss zu erzielen, erfolgt die Zusammenarbeit des LCA, des TA und der Mm. arytaenoidei. Durch deren Kontraktion kann sowohl die Tondauer als auch die Grundfrequenz erhöht werden. Dabei stabilisiert der LCA die Stimmbänder und reduziert den benötigten Luftstrom. Der TA ändert die physikalischen Eigenschaften der Stimmlippen über deren Steifigkeit. Somit sind beide Muskeln wichtig für eine effiziente und laute Stimme (16).

Der mediale Anteil, der M. vocalis oder auch nur Vocalis, reicht vom Proc. vocalis zum Conus elasticus und der Schleimhaut der Cavitas infraglottica. Die Verbindung zur Schleimhaut ermöglicht es, durch Spannungsänderungen die Schwingungseigenschaften der Stimmlippen zu beeinflussen. Im Hundemodell wurde zusätzlich zu den bereits erwähnten zwei Kompartimenten ein mittlerer Anteil gefunden, der als Pars centralis bezeichnet wird. Dieser reicht von der bindegewebigen Fortsetzung der Membrana cricothyroidea bis zur Fossa oblongata. Dessen Aufgabe liegt in der Verkürzung der Stimmlippen. Der Mensch besitzt lediglich zwei Kompartimente, den Muskularis und den Vocalis. Diese lassen sich ebenfalls durch die Zusammensetzung der Muskelfasern unterscheiden. Es besteht ein Wechsel von beinahe 100 % „fast-twitch“ Fasern lateral in annähernd 100 % „slow-twitch“ Fasern medial, wodurch man eine Trennung der beiden Anteile in der Mitte dieses Übergangs vermutet. Des Weiteren werden beide Anteile durch eigene Nervenäste versorgt (12).

Der M. vocalis kann wiederum in ein oberes und unteres Kompartiment unterteilt werden. Das größere untere Kompartiment besteht aus einem großen Faszikel, in dem die Fasern eng aneinander gereiht liegen. Dieser reicht vom Conus elasticus zum medialen Anteil des Stellknorpels. Der Conus elasticus reicht lediglich bis zur Hälfte des freien Stimmlippenrandes. Beim Menschen lässt sich der untere Anteil nicht eindeutig abgrenzen, aber man findet an derselben Stelle eine erhöhte Anzahl an „slow-twitch“ Fasern. Es wird vermutet, dass dieser Anteil die Grundfrequenz der Schwingung bestimmt und somit eine führende Rolle in der Funktion der Stimmbän-

der einnimmt. Das obere Kompartiment hingegen setzt sich aus Muskelfasern zusammen, die in kleinen Gruppen angeordnet vom Proc. vocalis in die Mukosa der Stimmlippen einstrahlen. Diese einzelnen Gruppen werden unterschiedlich innerviert und können somit auch einzeln gesteuert werden. Beim Menschen ist dieses obere Kompartiment des M. vocalis durch Muskelfaservermehrung deutlicher ausgeprägt, als bei anderen Spezies. Beim Neugeborenen ist dieser Bereich der Stimmbänder noch überwiegend mit Weichteilgewebe ausgefüllt. Es wird davon ausgegangen, dass die Vermehrung des oberen Kompartiments einen engen Zusammenhang mit der menschlichen Sprache hat (12).

Das obere Kompartiment des M. vocalis stellt eine Besonderheit dar, da es eine große Menge an Muskelspindeln und seltenen Muskelfasern enthält. Diese speziellen Fasern weisen eine Länge zwischen 2 und 5 mm auf. Eine weitere einzigartige Eigenschaft liegt in der intramuskulären Vernetzung. Durch die Länge der einzelnen Fasern liegt deren Ursprung und auch deren Ansatz innerhalb des Muskels. Zusätzlich findet sich eine Serienschaltung der Fasern durch dünne Sehnen, wobei diese Sehnen wiederum ins Endomysium größerer Fasern einmünden. Das obere Kompartiment formt, wie die extraokkulären Muskeln, eine netzartige Struktur, denn viele Muskelfasern innerhalb des Gefüges teilen sich und gehen eine Verbindung mit anderen Fasern ein. Ein spezieller Muskelfasertyp, die „slow tonic muscle fibers“ (STMF), wurde in größeren Mengen im oberen Kompartiment gefunden. Diese Fasern ähneln glatten Muskelzellen, da sie eine langsame Kontraktion ermöglichen. Deren Lage lässt vermuten, dass sie durch Änderungen der Vibrationseigenschaften der Kanten einen Einfluss auf die Phonation haben und somit die menschliche Sprache erst ermöglichen (12).

Zusammengefasst erfüllt diese Muskelgruppe folgende Anforderungen: Eine Funktion liegt in der Verkürzung und somit Entspannung im hinteren Bereich der Stimmbänder, da die Stellknorpel durch ihre Zugrichtung nach vorne zum Schildknorpel verlagert werden. Die Tonhöhe kann durch Zug in den vorderen Bereichen der Stimmbänder mit gleichzeitiger Entspannung der hinteren Anteile moduliert werden. Durch die Änderung der Masse kann das Timbre verändert werden. Eine weitere Aufgabe liegt in der Unterstützung der Adduktion durch die Rotation des Proc. muscularis nach medial (14).

Der M. thyroepiglotticus stellt eine Fortsetzung des TA zur Epiglottis dar. Dieser durchläuft die Plica aryepiglottica, wo auch einige Fasern enden. Seine Funktion liegt in der Vergrößerung des Larynxeingangs (14).

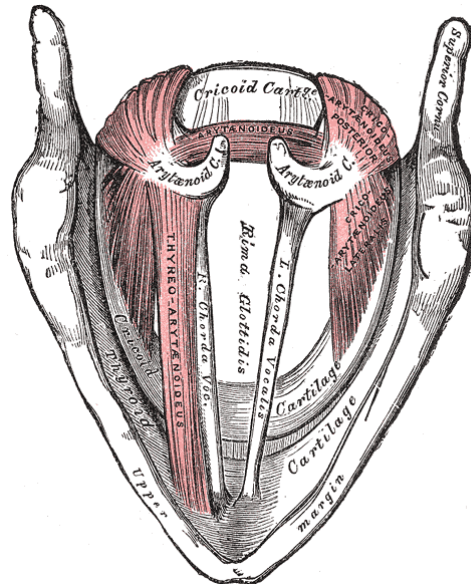


Abbildung 3: Die Muskulatur des Kehlkopfs; Ansicht von kranial auf die Glottisebene (1)

Volumensbestimmungen der Muskulatur

Es gibt nur sehr wenige Studien zur Masse und Ausrichtung der intrinsischen Kehlkopfmuskulatur. Bei den wenigen, die existieren, sind meist nur einzelne beziehungsweise geringe Probenanzahlen verwendet worden. In der ex vivo Studie von Cox et al. (18) wurde das Volumen des TA an sechs menschlichen Larynges erforscht, in der diese Muskeln nach Präparation abgewogen wurden. Dies ergab eine durchschnittliche Masse von 823 mg bei einer Länge von 18,3 mm. Die Faserausrichtung in zwei Ebenen ergab in transversaler Ausrichtung einen Winkel von 11° und in der sagittalen einen Winkel von $13,8^\circ$ (18). Ein anderer Zugang ist die Volumensbestimmung aus Rekonstruktionen bildgebender Verfahren. Durch die Verwendung des MRT konnte die Volumina des TA (rechts $862,75 \text{ mm}^3$ und links $851,56 \text{ mm}^3$) und des PCA (rechts $605,1 \text{ mm}^3$ und links $599,02 \text{ mm}^3$) ermittelt werden (8).

1.3 Die Anatomie des Schweinelarynx im Vergleich

Die Anatomie des Schweinekehlkopfs zeigt eine große Ähnlichkeit mit dem menschlichen Larynx. Es lassen sich beim Schwein Ventrikel und zwei prominente Falten erkennen (19). Diese werden als obere und untere Stimmlippe bezeichnet, da sich anhand von Schwingungsexperimenten zeigte, dass beide Falten bei der Phonation in Schwingung geraten (20). In Relation zu den langen Stimmlippen verfügen Schweine nur über einen kurzen Proc. vocalis (19). Die obere der beiden enthält einen deutlich tastbaren Knorpelfortsatz. Die untere Stimmlippe, welche weniger deutlich definiert ist, besteht aus einem muskulären Grundstock, der von einer relativ dünnen oberflächlichen Schicht überzogen ist. Diese Schicht wird an den Ansatzpunkten kräftiger (21). In Relation zu den menschlichen sind die Stimmlippen des Schweins länger (22) und auch dicker (23). Eine durchschnittliche Länge der oberen Stimmlippe beträgt 28 ± 9 mm und der unteren 28 ± 2 mm (21). Der Ventrikel, welcher schlitzförmig konfiguriert ist, ermöglicht eine gute Trennung der beiden Stimmlippen. Mit einer Neigung von etwa 40° liegt das vordere Ende der Stimmlippen tiefer als das hintere (20). Die histologische Untergliederung der Schichten weist, bis auf das Fehlen eines deutlich abgrenzbaren Stimmbandes eine Ähnlichkeit zu der des Menschen auf (19). Eine vordere Kommissur lässt sich nicht erkennen (24).

Das Knorpelskelett zeigt einige Unterschiede zum menschlichen Larynx. Der Schildknorpel ist in seiner vertikalen Ausdehnung länger (22,24) und die Laminae sind nicht gerade, sondern seitlich abgerundet. Somit ähnelt dieser eher der Form eines Kanus. An der Oberseite fehlen die Hörner und der Abstand zum Zungenbein ist vergrößert. Der Ringknorpel zeigt eine elliptische Form. Eine weitere Besonderheit bilden die Stellknorpel, die an der Spitze sowohl mit den Cartt. corniculatae als auch mit den aryepiglottischen Falten verschmolzen sind (24). Zusätzlich ist ein supraglottischer Gang mit einer Länge von etwa 2 – 4 cm vorhanden (20).

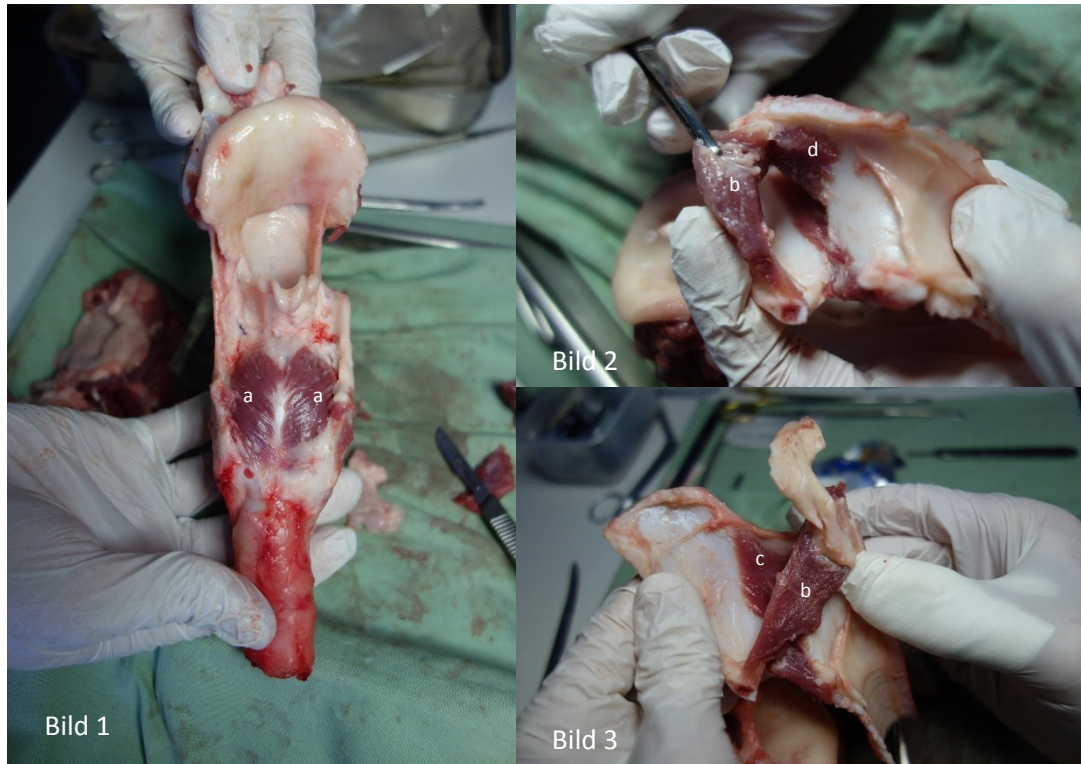


Abbildung 4: Der Schweinelarynx, nach seiner Präparation; Bild 1: Ansicht von dorsal mit PCA (a); Bild 2 und 3: Ansicht von luminal nach Halbierung: M. vocalis (b), CT (c) und Lateralis (d)

Die Ansätze, Ursprünge und Verteilung der intrinsischen Kehlkopfmuskulatur haben ebenfalls eine große Ähnlichkeit mit der des Menschen, mit der einzigen Ausnahme, dass der M. arytaenoideus obliquus fehlt. In der makroskopischen Begutachtung weist der PCA nur einen Bauch auf, jedoch lässt das Verteilungsmuster der Versorgungsäste des RLN, welches dem menschlichen ähnelt, den Rückschluss zu, dass dieser nicht nur aus einem Kompartiment besteht (25). Die Beweglichkeit des Kehlkopfs in der Art. cricothyroidea ist dem Menschen sehr ähnlich, wodurch eine bessere Kontrolle der Tonhöhenregulierung ermöglicht wird. Die Beweglichkeit der Stimmbänder in der Horizontalebene hat jedoch ein geringeres Ausmaß (22).

Diese Ähnlichkeiten zum menschlichen Larynx weisen darauf hin, dass das Schweinemodell eine gute Alternative für die Erforschung der Phonation beim Menschen ist.

2 Material und Methoden

2.1 Kontrastmittelpräparation des Larynx

Zur Konservierung der Larynges wurde eine Phosphat-gepufferte Formaldehyd-Kochsalz-Lösung (phosphate-buffered formol-saline, PBFS) verwendet. Dabei handelt es sich um ein polymerisiertes Formaldehyd, welches als 4%ige Lösung in einer Phosphat-gepufferten Kochsalzlösung aufgelöst wird. Diese Art der Konservierung erlaubt eine längere Haltbarkeit der Proben (7). Die Fixierung der Proben mit PBFS hat jedoch Einfluss auf das Volumen der Muskulatur. Zu Beginn kommt es zu einer raschen Volumenzunahme, an die sich eine Phase mit langsamer stufenweiser Abnahme anschließt (26).

Anschließend wurden die Proben in unterschiedliche Kontrastmittelkonzentrationen eingelegt. Das Kontrastmittel besteht aus einer wässrigen Iod-Kaliumiodid-Lösung (I_2KI). Ein großer Vorteil dieser Methode liegt in seiner Reversibilität, denn das Iod kann mit Hilfe von erneuter Behandlung mit PBFS aus der Probe entzogen werden. Somit können sowohl das Scanprotokoll, als auch die Anreicherung des Materials, vor allem wenn dieses nur schwer zugänglich oder selten ist, im Nachhinein optimiert werden (7,27).

Bevor man die Proben - nach der Durchführung der Scans - zur histologischen Bestätigung der Ergebnisse weiterverarbeitet, sollte das jodhaltige Kontrastmittel ausgewaschen werden. Das Gewebe wird durch die Konservierung spröde und es könnte ansonsten zu Artefakten bei der Erstellung der histologischen Schnitte kommen. Dazu werden die Proben zwei bis fünf Wochen erneut in PBFS eingelegt, wobei hier das Konservierungsmittel wöchentlich ausgetauscht werden sollte. Die Dauer des Auswaschvorgangs wird durch die Konzentration, die Einlegedauer und die Probengröße beeinflusst (2).

Um vor dem Scannen überschüssige Kontrastmittelreste zu entfernen, sollten die Proben mit PBFS gespült werden. Dieser Vorgang bewirkt, dass an der Oberfläche anhaftendes Kontrastmittel keinen artifiziell erhöhten Kontrast dieser Regionen im Mikro-CT-Scan hervorruft (7).

2.1.1 Limitationen des Prozesses

Die Höhe der Konzentration der Iod-Kaliumiodid-Lösung hat Einfluss auf das Volumen der Muskulatur. Es zeigte sich in der Studie von Vickerton et al. (26), dass es mit steigender Konzentration zu einer Schrumpfung der muskulären Strukturen kommt. Dabei ist zu beachten, dass innerhalb der ersten beiden Tage die größten Veränderungen auftreten. Nach sieben Tagen ist eine Plateauphase erreicht, nach der es zu keinen wesentlichen Volumenunterschieden mehr kommt. Dieser Effekt ist unabhängig von der Höhe der Konzentration.

Zu beachten ist, dass es sich bei dieser Studie um isolierte Gewebeanteile handelt und daher nicht klar ist, ob dieses Ausmaß an Volumensänderungen bei der Verwendung zusammenhängender Komponenten - wie in unserem Fall des gesamten Larynx – eintritt. Es könnte entweder zu einer gleichbleibenden Schrumpfung jedoch mit stärkerer Zerreißung des Gewebes kommen, oder der Effekt fällt durch die Unterstützung und den Schutz des umgebenden Gewebes geringer aus (26).

Eine andere Studie zeigt hingegen keine wesentliche Schrumpfung der muskulären Strukturen, welche in histologischer Nachbearbeitung kontrolliert wurde (27). Somit lässt sich die Vermutung aufstellen, dass die Variabilität der Muskelgröße innerhalb einer Spezies eine wesentlichere Rolle spielt, als das Ausmaß des Schrumpfungseffekts selbst.

Nicht nur die Konzentration des Kontrastmittels, sondern auch die Art des Konservierungsmittels hat einen Einfluss auf das Volumen der Probe. Obwohl sich in der Studie von Vickerton et al. (26) gezeigt hat, dass Glutaraldehyd zu den geringsten Volumensänderungen des Gewebes führt, wurde dennoch PBFS wegen der besseren Verfügbarkeit zur Verwendung für derartige Experimente empfohlen. Bei dieser Art der Konservierung kommt es nach initialer Volumenzunahme zu einer stufenweisen Schrumpfung der muskulären Strukturen. Bei 10 % Volumensabnahme wird ein Plateau erreicht. In diversen Studien, die dieses Verfahren verwenden, wurde ebenfalls PBFS als Konservierungsmittel verwendet (2-4,6,7,27-29).

Eine weitere Limitation dieses Verfahrens liegt in der Größe des verwendeten Untersuchungsobjekts. Beim Versuch mit größeren Proben, wie zum Beispiel Eichhörnchen, zeigte sich bereits eine Grenze der passiven Diffusionskapazität des Kontrastmittels. In einer Arbeit von Jeffery et al. (7) wird darauf hingewiesen, dass dies eventuell durch einen aktiven Prozess wie direkte Injektion von Kontrastmittel ins Gewebe, oder die Nutzung einer Druckkammer umgangen werden kann. Die Verwendung von Injektionen wurde jedoch abgelehnt, da man befürchtet ungewollte Volumensdifferenzen durch Flüssigkeitsresiduen zu erzeugen. Dies könnte die daraus gewonnenen Messergebnisse verfälschen. Zusätzlich kann davon ausgegangen werden, dass es durch die Depots zu einer Veränderung der natürlichen Faserverläufe und dadurch zur Schaffung artifizieller Grenzen kommt, vor allem wenn Luft miteingebracht wird (6).

2.2 Probenbezug und Präparation

Die verwendeten Schweinelarynges wurden vom Schlachthof bezogen. Um das Material vor den natürlichen Zersetzungsprozessen zu schützen, wurden diese im Kühlschrank bei -20 °C gelagert. Diese Art der Konservierung hat keinen Einfluss auf die Volumina der muskulären Strukturen (26). Beim Larynx zeigt sich jedoch laut Stevens et al. (23) eine geringe Ausdehnung sämtlicher Gewebe um etwa 5 %. Aufgrund des geringen Unterschieds wird dieser Aspekt in der weiteren Studie vernachlässigt.

Um die Diffusionsstrecke des Kontrastmittels zu den gewünschten Strukturen zu verkürzen, wurden alle Kehlköpfe vor dem Einlegen in das Kontrastmedium der gleichen Präparation unterzogen. Die infrahyoidale Muskulatur wurde vom Schildknorpel entfernt. Die Trachea wurde unterhalb des zweiten bis dritten Trachealrings abgesetzt. Des Weiteren wurden an der Rückseite der Pharynx und der Ösophagus mit seinen anhaftenden Verbindungen zum Knorpelskelett gelöst und abgetragen. Die Präparation an der Rückseite wurde fortgesetzt, bis der PCA sichtbar war. Am kranialen Ende des Larynx wurde das Zungenbein und die Epiglottis unter Durchtrennung der Plica aryepiglottica abgesetzt.

2.3 Konservierung der Proben und Kontrastmittelanreicherung

Eine gründliche Literaturrecherche ergab, dass für vorliegende Forschungszwecke unterschiedliche Protokolle zur Konservierung und Kontrastmittelanreicherung der Proben verwendet wurden. Alle, bis auf eine Arbeit (3), in der 10%iges PBFS benutzt wurde, verwendeten hauptsächlich 4%iges PBFS (2,4,6,7,30,31). Bei der Wahl der Kontrastmittelkonzentration liegt eine große Spannweite von 1,8 % - 15 % Iod-Kaliumiodid vor (2,27,30). In zwei Publikationen (6,31) wurden sogar Konzentrationen bis zu 25 % I₂KI gebraucht. Bei der Einlegedauer gibt es ebenfalls Schwankungsbreiten von minimal 2 Tagen (2) bis zu maximal 7 Wochen (6).

Die Schweinekehlköpfe wurden nach der Beseitigung von Rückständen mit PBS in 4%igem PBFS konserviert. Nach sieben Tagen wurde jeweils eine Probe in ein Behältnis mit unterschiedlicher Kontrastmittelkonzentration gegeben. Um die gewünschten Konzentrationen von 1,8 %, 3,75 %, 7,5 % und 15 % zu erreichen, wurden die Bestandteile des Kontrastmittels (Iod und Kaliumjodid), wie in der nachfolgenden Tabelle erläutert, zusammengemischt. Es wurde ein Volumen von 250 ml angesetzt, um die Proben vollständig zu bedecken. In Versuchsreihen, in denen mehr Kontrastmittel benötigt wird, sind die Mischungsverhältnisse einfacher zu erzeugen.

Iod-Konzentration in %	I ₂ in g	Kaliumiodid in g	H ₂ O in g
1,8	1,5625	3,125	245,3125
3,75	3,125	6,25	240,625
7,5	6,25	12,5	231,25
15	12,5	25	212,5

Tabelle 1: Mischverhältnisse zum Erlangen der benötigten Kontrastmittelkonzentration

Mit dieser Anordnung konnten zufriedenstellende Ergebnisse erreicht werden, so dass bei der endgültigen Versuchsreihe sieben Schweinekehlköpfe verwendet wurden, die, wie in der anschließenden Tabelle angeführt, jeweils in unterschiedlicher

Weise auf die Scans vorbereitet wurden. Es wurde untersucht, ob man durch zusätzliche Maßnahmen, wie z.B. die Verwendung eines Exsikkators oder die Verwendung einer anderen Formalin-Konzentration, die Kontrastmittelanreicherung weiter verbessert werden kann.

ID	NBF-Konzentration (%)	I2KI-Konzentration (%)	Exsikkator
Larynx-4/1,8	4	1,8	nein
Larynx-4/3,75	4	3,75	nein
Larynx-4/3,75-+	4	3,75	ja
Larynx-4/7,5	4	7,5	nein
Larynx-10/3,75	10	3,75	nein
Larynx-10/3,75-+	10	3,75	ja
Larynx-10/7,5	10	7,5	nein

Larynx – [NBF-Konzentration in %] / [Kontrastmittelkonzentration des I₂KI in %]

Tabelle 2: Protokoll mit den unterschiedlichen Präparationen im Rahmen der Kontrastmittelstudie

In weiterer Folge wurden die Proben für eine Woche in der jeweiligen Formalin-Konzentration fixiert, um den Verwesungsprozess, der bei den vorherigen Versuchen deutlich aufgetreten war, zu minimieren. Anschließend wurden die unterschiedlichen Iod-Kaliumiodid-Konzentrationen vorbereitet und die Proben für weitere zehn Tage in der Lösung belassen, damit das Kontrastmittel genug Zeit hatte, in die muskulären Strukturen zu diffundieren. Das Vakuum, das mit Hilfe des Exsikkators appliziert wurde, konnte nach einer Woche entfernt werden. Der vorgesehene Zeitraum für die Anreicherung des Kontrastmittels von einer Woche wurde aufgrund von technischen Schwierigkeiten deutlich überschritten. Die Proben wurden während dieser Zeit weiterhin in der Lösung belassen.

In zuvor durchgeführten Versuchsreihen, bei denen die frischen Proben direkt in eine 0,9%iges bzw. 1,8%iges I₂KI-Lösung eingelegt wurden, konnten keine zufriedenstellenden Ergebnisse erreicht werden. Diese wurden durchgeführt, um den unerwünschten Effekt der Muskelschrumpfung durch das Kontrastmittel zu umgehen.

Das Kontrastmittel drang nur unzureichend in das Gewebe ein und es kam zu deutlichen Zersetzungsprozessen, die nicht nur als Bodensatz in den Einlegegläsern, sondern auch in den Mikro-CT-Bildern sichtbar waren. Optimierungsversuche, wie die Verwendung eines Shakers oder der Wechsel des Kontrastmittels während der Einlegedauer, konnten ebenfalls keine Verbesserung der Ergebnisse erzielen.



Abbildung 5: Präparation der Proben; Bild 1: Proben vor der Fixierung mit Formalin; Bild 2 und 3: Proben nach der Fixierung; Bild 4: Proben in den unterschiedlichen Kontrastmittelkonzentrationen

2.4 Protokolle der Mikro-CT-Scans

Nach mehreren Anpassungen des Akquisitionsprotokolls wurden die Kehlköpfe an der Abteilung *Core Facility Alternative Biomodels und Preclinical Imaging* im Bereich Biomedizinische Forschung der Medizinischen Universität Graz an einem *Siemens Inveon* Mikro-CT-Scanner durchgeführt. Folgende Einstellungen wurden dafür verwendet: 80 kV/100 μ A, 0,5 mm Alufilter, 5000 ms Belichtungszeit bei voller Rotation mit einer 360° Projektion. Bei einer Aufnahmezeit von etwa 35 Minuten konnte damit

eine Auflösung von 52,62 μm in 1024 Schichten erzielt werden. Die dadurch entstandenen Rohdaten wurden mit der Rekonstruktionssoftware des *Inveon acquisition workplace* in DICOM-Files umgewandelt.

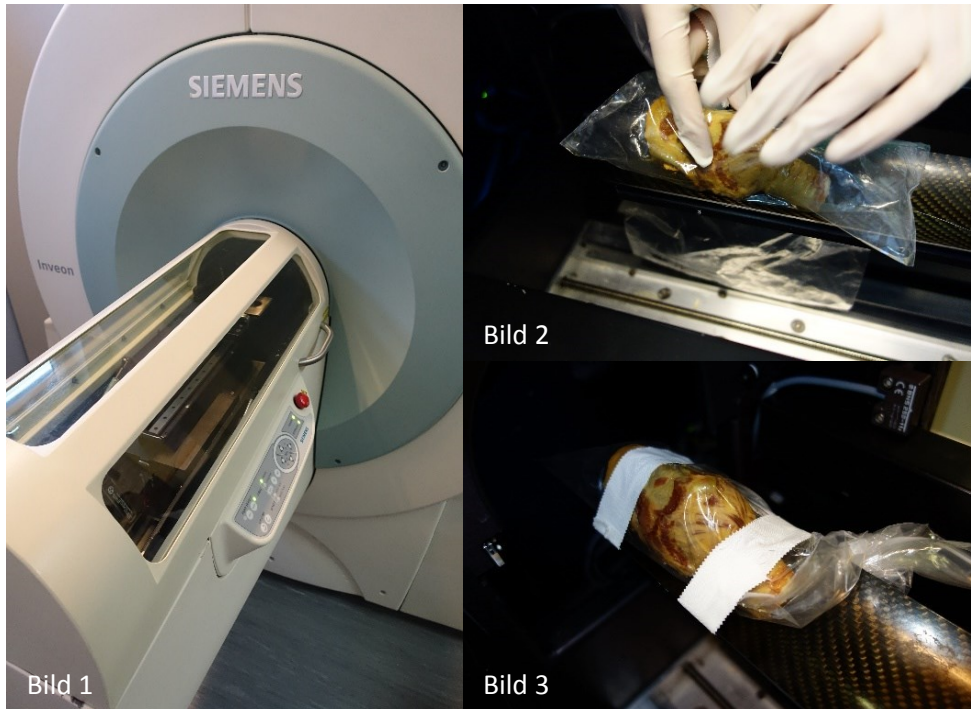


Abbildung 6: Durchführung der Mikro-CT-Scans; Bild 1: *Siemens Inveon* Mikro-CT-Scanner, Bild 2 und 3: Lagerung der Proben, während des CT-Vorgangs

2.5 Preprocessing der Mikro-CT Daten

Zur einheitlichen Vorbereitung der im Mikro-CT generierten DICOM-Bilddatensätze wurde die Freeware *ImageJ 1.49q* verwendet. Im ersten Schritt wurden die einzelnen Bilder mit Hilfe der Funktion „Image-Sequenz“ in das Programm importiert, wodurch sich die Einzelbilder in korrekter Reihenfolge darstellten. Noch vor der Bearbeitung wurden die Rohdaten als TIFF-Datei gespeichert. Dieses File beinhaltet einen dreidimensionalen Datensatz, welcher anschließend ins Segmentierungsprogramm *Avizo 9.0.0 (FEI Software, USA)* geladen werden kann.

Um den Bildkontrast zu erhöhen, ohne dabei die Areale überbelichtet darzustellen, die bereits durch das Kontrastmittel stark angefärbt wurden (z.B. PCA), wurde die

Funktion „Enhance Contrast“ mit einer Einstellung von 1.0 % verwendet. Anschließend wurde „Sharpen“ ausgeführt, was zwar das Bildrauschen erhöht, aber subjektiv eine verbesserte Darstellung der Kanten und dadurch eine bessere Differenzierbarkeit der Kompartimente ermöglicht.

Durch eine leicht unterschiedliche Positionierung der Proben beim Scanvorgang kam es zu Abweichungen in der Ausrichtung der Probe. Um die einzelnen Proben für die Segmentierung und Volumensberechnung besser vergleichen zu können, wurden diese einheitlich durch Definition von Landmarken in eine annähernd gleiche Position gebracht. Die Knorpelleiste der Cartilago cricoidea und die Prominentia thyroidea fungierten in der axialen Schnittführung als Orientierungspunkte.

Durch das Winkelmaß wurde die Größe der Abweichung bestimmt und mit Hilfe der Funktion „Rotate“ korrigiert. Mit der „Preview“-Funktion konnte sofort überprüft werden, ob man den richtigen Rotationswinkel gewählt hat. Zusätzlich ist zu beachten, dass es durch die Drehung der Probe zum Abschneiden der Bilder an den Bildgrenzen kommt. Durch die Auswahl „Bicubic“ in der Drop-Down-Leiste wurde der durch die Drehung entstandene neue Bildabschnitt mit einer schwarzen Bildinformation ausgefüllt. Somit werden fehlende Bildelemente ergänzt und es entsteht ein quaderförmiges dreidimensionales Bildobjekt.

Nach der Korrektur wurde die koronare Bildebene eingestellt. Um diese Bildserie zu erhalten, muss der dreidimensionale Datensatz mit der Funktion „Reslice“ neu geschnitten werden. Zuerst wurde im Pop-up Fenster „Top“ ausgewählt, wodurch der virtuelle Schnittvorgang von oben startet. Zusätzlich ist es notwendig, die Funktion „Flip vertically“ auszuwählen, damit das Bild in der richtigen räumlichen Orientierung angezeigt wird.

In der koronaren Schnittebene wurde wie zuvor vorgegangen, wobei in dieser Ebene ein Lot durch die Luftsäule des Lumens als Markierung dient. Erneut wurde die Bildserie in die sagittale Ansicht gebracht. Als Zusatzparameter fungierte „Left“ und „Rotate 90°“. In dieser Ebene wurden keine Veränderungen getätigt.

Zur letzten Kontrolle wurden die Bilder in die axiale Ausgangslage durch „Reslice“ zurückgebracht. Auch hier empfiehlt sich die Auswahl „Bottom“ und „Rotate 90°“. Für die standardisierte Durchführung ist es unabdingbar, dass bei allen „Reslice“-

Funktionen die angegebenen Parameter angewendet werden. Nur so ist das Bild nach Import in *Avizo* in allen drei Raumebenen korrekt ausgerichtet. Abschließend wurde das Datenvolumen reduziert, indem nicht benötigt Scanbereiche durch die Funktion „Crop“ weggeschnitten wurden.

2.6 3D-Modellierung der Kehlkopfbestandteile

Der als TIFF-Datei gespeicherte Datensatz wurde nach seiner Vorbearbeitung in das Computerprogramm *Avizo 9.0.0* geladen. Mit dieser Software können einzelne Strukturen aus den Schnittbildern hervorgehoben werden, um diese anschließend als dreidimensionales Objekt abzubilden.

Grundsätzlich bietet das Programm diverse semiautomatische Tools, die allerdings in dieser Studie nicht optimal eingesetzt werden konnten: Einzelne Strukturen ließen sich in bestimmten Bildabschnitten nur eingeschränkt voneinander unterscheiden. Dadurch konnten die Grenzen zwischen zwei Objekten teilweise nur im Bildverlauf genauer differenziert werden.

Zusätzlich wird zum Gebrauch dieser Technik ein erweitertes Repertoire an anatomischen Wissen vorausgesetzt. Aufgrund jener Defizite können die implementierten Algorithmen der Software die Grenzen nicht erkennen und die Objekte würden falsch dargestellt werden. In Anbetracht dieser Erkenntnis wurde die Segmentierung der einzelnen Strukturen des Larynx bewusst manuell durchgeführt.

Zur Erstellung des Modells wurde der Kehlkopf, welcher nach Konservierung mit 4%igem PBFS in einer Lösung mit 3,75%igem Iod-Kaliumiodid vorbehandelt wurde, verwendet. Folgende Strukturen wurden dabei näher betrachtet und als einzelne Objekte dargestellt: Schildknorpel, Ringknorpel, Stellknorpel links und rechts, PCA links und rechts, M. vocalis links und rechts, TA links und rechts und zusätzlich LCA links. Um jene Strukturen zu markieren, wurden diese zuerst in der axialen Schichtführung isoliert und anschließend, wie zuvor erklärt, segmentiert. Zur Korrektur der Fehler, die durch die Interpolation entstanden, wurden die Strukturen in allen drei Bildebenen nachkontrolliert.

Die weitere Bearbeitung lässt sich wie folgt nachvollziehen: Im Abschnitt „Segmentation“ des Benutzerinterface werden alle drei Schnittebenen und auch die bereits eingezeichneten Strukturen in einem eigenen Bildschirmbereich dargestellt (Abbildung 7, Bild 1). Zur Erstellung eines neuen Objekts wird zunächst „Create new Material“ ausgewählt. Danach kann man aus verschiedenen graphischen Tools auswählen, mit denen man die gewünschte Struktur im CT-Bild markiert. Die effizienteste und einfachste Methode ist das „Lasso-Tool“. Mit der zusätzlichen Funktion „Auto-Trace“ und „Trace-Kanten“ im Freihand-Modus werden größere Sprünge von Grauwerten automatisch erkannt. Damit kann das Objekt effizient gekennzeichnet werden. Es werden immer wieder per Mausklick neue Punkte festgesetzt, von denen die Auto-Trace-Linien ausgehen. Nach der kompletten Umrahmung erscheint das markierte Feld rot hervorgehoben (Abbildung 7, Bild 2). Nun kann dieses Objekt dem zuvor erstellten Material hinzugefügt werden (Abbildung 7, Bild 3).

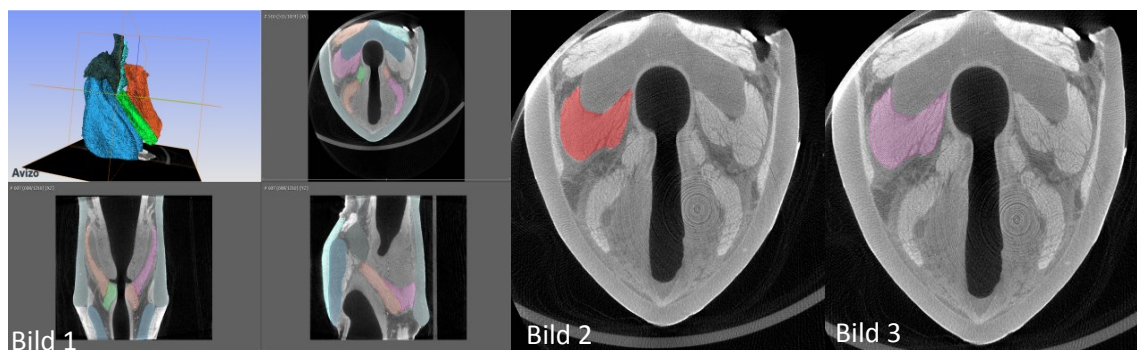


Abbildung 7: Bild 1: Darstellung der verschiedenen Ansichten in Avizo; Bild 2: Markiertes Objekt, bevor es zum bestehenden Material hinzugefügt wird; Bild 3: Objekt nach dem Hinzufügen

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, die Markierung zu belassen und einige Schnitte weiter zu scrollen, um diesen Vorgang erneut durchzuführen. Auf diese Weise wird das gleiche Objekt in zwei unterschiedlichen Schichten gekennzeichnet. Mit der Funktion „Interpolate“ wird der Bereich in den dazwischenliegenden Schichten durch Annäherung an die markierten Objekte ausgefüllt. Durch die Kennzeichnung der gewünschten Struktur in einem Abstand von etwa 40 - 50 Schichten kann eine zeitlich effizientere Segmentierung erfolgen. Zu beachten ist, dass die Genauigkeit dieser Methode mit der Anzahl der dazwischenliegenden Schichten abnimmt. Die Abweichungen, die dabei entstehen, werden mit Hilfe des „Lasso“-Tools oder der „Pinsel“-Funktion korrigiert. Nach der Fertigstellung der Segmentation muss das

Objekt mit der Funktion „Lock“ gesperrt werden. Dies verhindert zum einen, dass bei der Erstellung eines anderen Materials das zuvor segmentierte Objekt in Bereichen, in denen diese zwei Objekte aneinanderstoßen, bei einer überlappenden Markierung überschrieben wird. Zum anderen, passt sich das neu eingezeichnete Objekt an das vorherige an, da nur freie Pixel zum neuen Objekt hinzugefügt werden können.

2.7 Volumensbestimmungen der Muskulatur

Zur Auswertung der Muskelvolumina wurden folgende Muskeln nach dem im vorherigen Kapitel beschriebenen Protokoll segmentiert: PCA links und rechts, TA links und rechts, M. vocalis links und rechts. Dafür wurden auch die Bilddatensätze, die von Proben mit den anderen Kontrastmittelkonzentrationen gewonnen wurden, verwendet.

Nach Abschluss der Segmentierung der einzelnen Muskeln wurde im Bereich „Projekt“ die Funktion „Generate Surface“ ausgeführt. Dadurch wird eine Oberfläche über das gesamte Objekt gelegt. Aus diesem konnten nun mit der Funktion „Surface Area Volume“ die Volumina berechnet werden. Die Ergebnisse wurden in einer eigenen Tabelle dargestellt.

Die Auswertung der Daten wurde mittels *Microsoft Excel 2010* und *IMB SPSS Statistics 22* durchgeführt. Dafür wurden die zuvor in *Avizo* bestimmten Volumina, welche in diesem Programm als die Voxelanzahl eines Objekts angegeben werden, mit dem Volumen eines Voxels ($0,0000001457 \text{ cm}^3$) multipliziert. Die Ausgabe der entsprechenden Muskelvolumina erfolgte in cm^3 . Daraus wurde in weiterer Folge eine deskriptive Analyse erstellt. Das arithmetische Mittel und die Standardabweichung wurden aus den vorhandenen Proben errechnet und mit Hilfe des Programms graphisch abgebildet. Zur Klärung einer Seitendifferenz in den unterschiedlichen Muskelgruppen fanden entsprechende statistische Tests ihre Anwendung.

3 Ergebnisse

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse der einzelnen Kontrastmittelversuche dargelegt. Eine Reihe von Bildern soll die unterschiedlichen Kontraste veranschaulichen. Dafür wurden die unbearbeiteten Bilder verwendet. Des Weiteren werden im Verlauf des Kapitels die Volumina, die aus den Segmentierungen gewonnen wurden, präsentiert und graphisch dargestellt.

3.1 Vorstudien zur Kontrastmittelanreicherung

In den Vorstudien zur Ermittlung der optimalen Kontrastmittelkonzentration wurde die Gewebeanreicherung bei frischem Gewebe untersucht, welches nicht mit Konservierungsmittel vorbehandelt wurde. Bei einer Konzentration von 0,9 % I₂KI konnten lediglich die oberflächlicheren Bereiche des Larynx wie der PCA oder der CT einen zufriedenstellenden Kontrast erreichen. Diese Muskeln konnten mit einzelnen Septen und der Abgrenzung einzelner Muskelbündel dargestellt werden. Die Diffusionskapazität für tiefer liegende Strukturen war jedoch zu gering. Von luminal konnte das Kontrastmittel nur wenig ins Gewebe eindringen. Durch eine Verdoppelung der Konzentration auf 1,8 % konnte eine deutliche Verbesserung der Iodaufnahme in die Muskulatur erzielt werden, was eine einfachere Abgrenzung zusätzlicher Muskelgruppen wie der Mm. interarytaenoidei ermöglichte. Luminal zeigte sich eine verbesserte Penetration ins Innere des Kehlkopfs. Alle Bereiche des Larynx konnten mit dieser Versuchsanordnung noch nicht homogen angereichert werden.

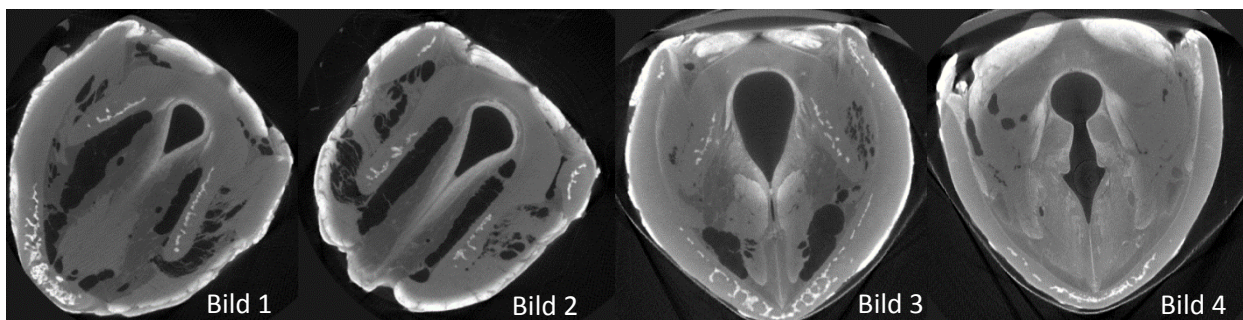


Abbildung 8: Kontraste im Vergleich; Bild 1 und 2: Mikro-CT des Schweinekehlkopfs in horizontaler Ebene (0,9 % I₂KI); Bild 3 und 4: Mikro-CT des Schweinekehlkopfs in horizontaler Ebene (1,8 % I₂KI)

Bei der Durchsicht der Daten dieser Versuchsreihe fielen deutliche Veränderungsprozesse auf. Es fanden sich hypodense Areale, die sich bevorzugt zwischen der Muskulatur und auch um das Binde- und Fettgewebe verteilten. Die Dichtewerte ließen darauf schließen, dass es sich um grob- und feinblasige Lufteingschlüsse handelt, die sich durch Zersetzungsvorgänge innerhalb des Gewebes gebildet hatten. Daraus ergab sich die Notwendigkeit, das Gewebe vor einer weiteren Bearbeitung mit Kontrastmittel zu fixieren, um derartige Veränderungen zu vermeiden. Als Kontrolle wurde bereits in dieser Versuchsreihe zusätzlich ein Kehlkopf in eine Mischung aus PBFS und Iod-Kaliumiodid-Lösung mit einer Konzentration von 0,9 % eingelegt. Dieser zeigte keine hypodensen Einschlüsse, die auf ein Eindringen von Luft in die Probe hingewiesen hätten.

Bei der Bildauswertung des Versuchsprotokolls, in denen ein Shaker zur besseren Verteilung des Kontrastmittels um die Probe verwendet wurde, konnte in den Mikro-CT-Bildern festgestellt werden, dass im Gegensatz zur Probe mit derselben Konzentration eine große Anzahl hypodenser Einschlüsse im Inneren des Kehlkopfgewebes sichtbar wurde (Abbildung 9).

Dies lässt vermuten, dass es sich dabei um eingebrachte Artefakte handelt, da durch die Methode des Schüttelns vermehrt Luft ins Gewebe gelangen konnte. Durch das große Ausmaß der Einschlüsse konnten besonders luminal die Strukturen schwer voneinander differenziert werden.

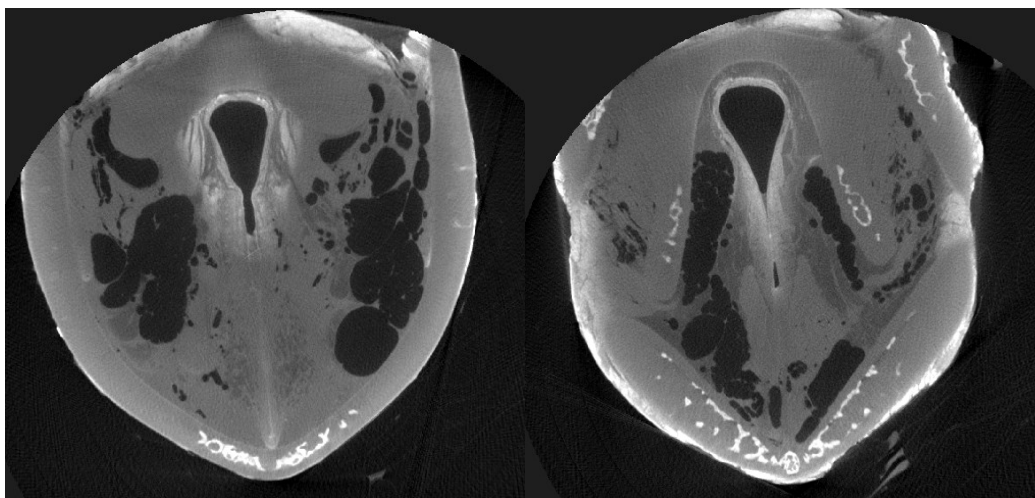


Abbildung 9: Mikro-CT des Schweinelarynx in horizontaler Ebene (1,8 % I₂KI + Shaker)

In Anbetracht der zuvor gewonnenen Ergebnisse konnte durch die gleichzeitige Applikation von 4%igem NBF und einer 0,9%igen Lugol'schen Lösung das gesamte Gewebe durchdringend fixiert werden. Dies zeigte sich deutlich im Fehlen der erwähnten Lufteinschlüsse.

Das gesamte Gewebe wies, im Gegensatz zu den ausschließlich mit Kontrastmittel behandelten Präparaten, einen veränderten Bildeindruck auf. Die Muskulatur und der Knorpel erreichten annähernd gleiche Grauwerte und waren somit nur sehr schwer zu differenzieren. Die Muskulatur selbst zeigte eine homogene Färbung, ohne dass Septen oder Muskelbündel zu unterscheiden wären. Das umliegende Bindegewebe hingegen blieb ausgespart und bildete sich hypodenser ab.

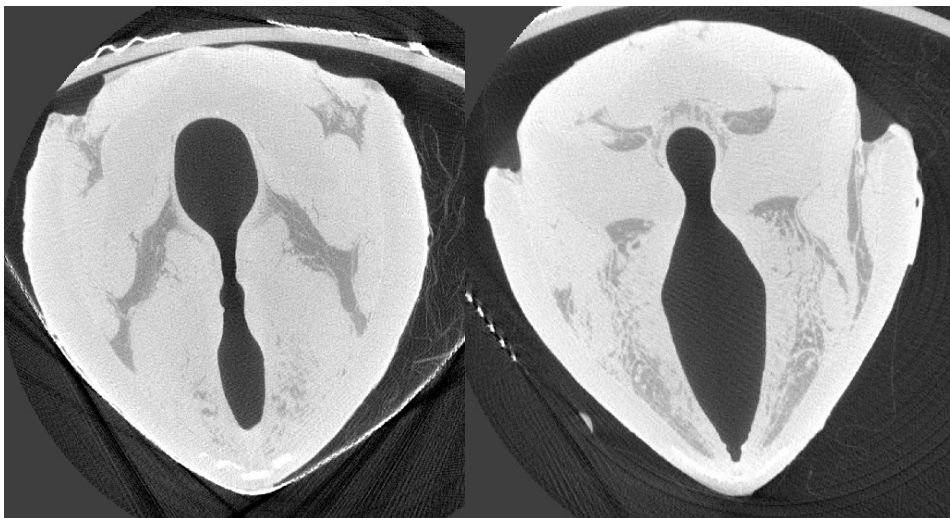


Abbildung 10: Mikro-CT des Schweinelarynx in horizontaler Ebene (0,9 % I₂KI + 4 % NBF)

3.2 Ermittlung der optimalen Kontrastmittelkonzentration

Um die Auswirkung der höheren Kontrastmittelkonzentrationen auf die Darstellung der Muskulatur, ergo den Bildeindruck besser abschätzen zu können, wurde eine Vergleichsprobe mit 1,8 % I₂KI herangezogen. In den Voruntersuchungen zeigte sich bei dieser Konzentration bereits eine mäßige Kontrastierung der oberflächlichen Bereiche des Kehlkopfs. Die tiefer liegenden Strukturen indes konnten mit dieser Konzentration nicht erreicht werden. Bei diesem Scandurchgang zeigte die

Probe erneut eine homogene Kontrastierung der oberflächlich liegenden Muskulatur. In gewissen Bereichen war es möglich, die Muskeln durch Septen in einzelne Bündel zu unterteilen. Die tiefliegende Muskulatur wurde zwar durch das Formalin hervorgehoben, konnte aber nur bedingt von dem umgebenden Bindegewebe abgegrenzt werden.

Bei einer Steigerung der Kontrastmittelkonzentration auf 3,75 % I₂KI konnte bereits ein guter Kontrast zwischen der Muskulatur und dem umliegenden Gewebe erzielt werden. Die einzelnen Muskeln zeigten eine gute Detailschärfe. Diese wurde vor allem durch die gute Abgrenzbarkeit der Muskulatur zum Bindegewebe und Knorpel ermöglicht. In der Muskulatur konnten einzelne Abschnitte durch Septen erahnt werden. Zusätzlich konnte der Verlauf der Muskeln mit ihren Ansätzen und Ursprüngen im dreidimensionalen Datensatz nachvollzogen werden.

Besonders anzumerken gilt, dass bei einer Konzentration von 7,5 % I₂KI nur mehr eine geringe Verbesserung des Kontrasts im Vergleich zur vorgehenden Probe erzielt werden konnte. Im nachstehenden Bild lässt sich dies insofern dokumentieren, dass lediglich die Septierung vergrößert und stärker ausgeprägt wirkt.

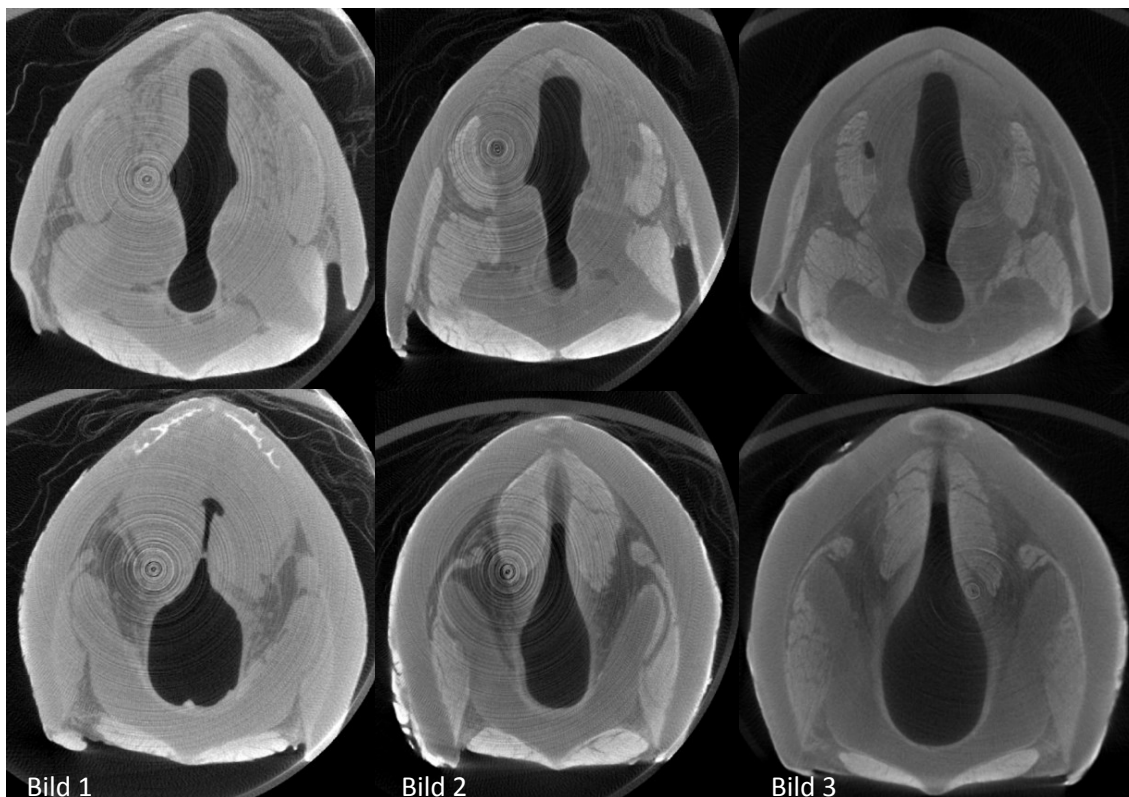


Abbildung 11: Kontrastmittelstudie, Kontraste im Vergleich; Bild 1: 4F/1,8 %, Bild 2: 4F/3,75 %, Bild 3: 10F 7,5 %

In diesem Kontrastmittelprotokoll wurde darüber hinaus erforscht, ob durch zusätzliche Maßnahmen der Kontrast und die Detailschärfe innerhalb der Muskulatur erhöht werden kann. Beim Gebrauch unterschiedlicher Konzentrationen von Formalin (4%iges vs. 10%iges) konnte keine wesentliche Veränderung der Kontrastmittelaufnahme beobachtet werden. Durch Applikation eines Vakuums während der Kontrastmittelanreicherung konnte im Vergleich eine geringe Verbesserung des Bildeindrucks erreicht werden. Die Grenzen und Septen innerhalb der Muskulatur wirkten klarer definiert und in der Muskulatur war auch eine feinere Unterteilung erkennbar.

In den direkt exponierten Muskeln (PCA oder CT) kam es zu einer sehr starken Aufnahme des I₂KI, wodurch der Kontrast innerhalb des Muskels selbst gemindert wurde. Dies konnte jedoch durch eine entsprechende Fensterung während der Segmentierung ausgeglichen werden. In der tiefer liegenden Muskulatur erzielte man hingegen eine homogene Kontrastmittelanreicherung.

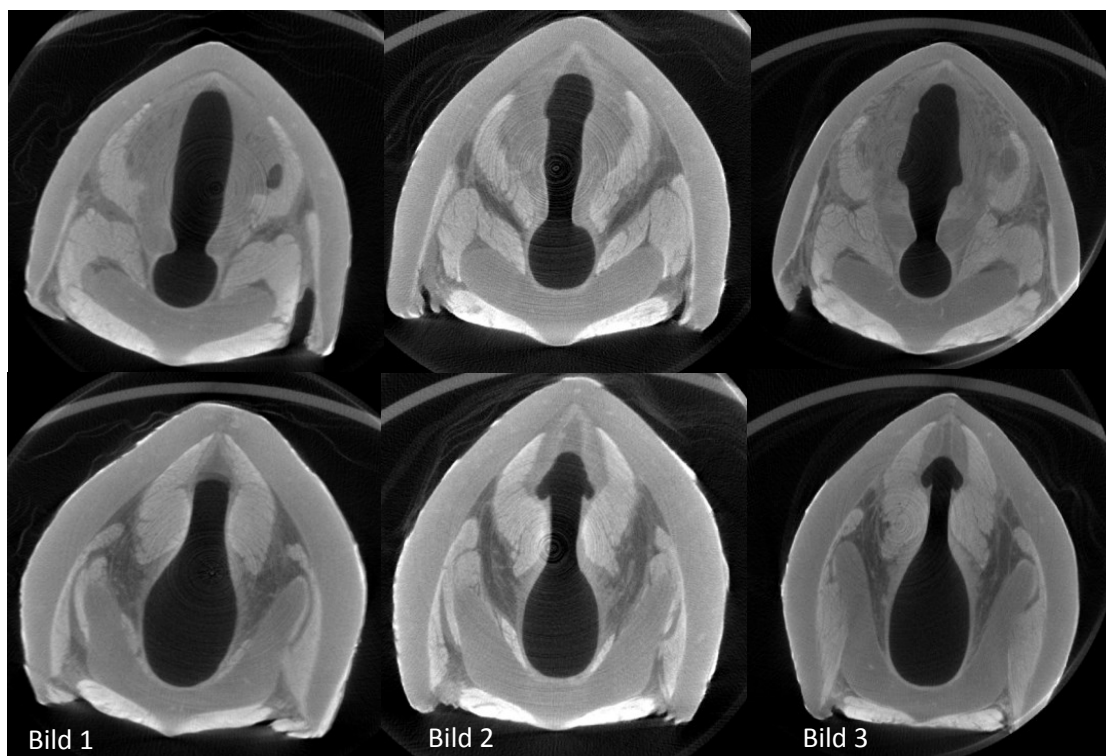


Abbildung 12: Kontrastmittelstudie, Unterschiede durch Verwendung eines Exsikkators (+) oder unterschiedlicher Formalinkonzentrationen (4F vs. 10F); Bild 1: 4F/3,75+; Bild 2: 10F/3,75; Bild 3: 10F/3,75 +

3.3 3D-Modell der laryngealen Strukturen

Ausgehend von den im vorangegangenen Unterkapitel formulierten Erkenntnissen, konnten diese unter dem Aspekt der Erstellung eines 3D-Modells der laryngealen Strukturen im Folgenden angewendet werden.

Zuerst wurde mit Hilfe des Rekonstruktionsprogramms *Avizo* das Modell des Knorpelskeletts erstellt, um die Lage der Muskeln und deren Verlauf im Kehlkopf besser beurteilen zu können. Durch die gute Differenzierbarkeit des Knorpels gegenüber dem umgebenden Weichteilgewebe konnte dieses einfach abgebildet werden. Als Problemstellung erwies sich die Größe der einzelnen Proben, die den möglichen Scanbereich überstieg. Sowohl am oberen als auch unteren Ende konnten Anteile des Kehlkopfs vom Gerät nicht erfasst werden. Für eine Darstellung des gesamten Kehlkopfs wäre es notwendig, zwei Abschnitte hintereinander zu generieren, welche anschließend mit dem Rekonstruktionsprogramm zusammengefügt werden können. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt, da alle Strukturen, die für die Generierung eines Modells benötigt wurden (im Speziellen TA und PCA), innerhalb eines Scanvorgangs aufgenommen werden konnten.

Diese Methode erwies sich als sehr simpel und effizient vor allem in der Erstellung eines dreidimensionalen Modells des Knorpelskeletts. Durch die gute Abgrenzbarkeit und die hohe Auflösung konnten sehr viele Details erfasst werden, wie beispielsweise die Knorpelleiste, die die paarig angelegten PCAs voneinander trennt oder auch die Fortsätze der Stellknorpel. Es ließen sich die typischen Formen von Schild-, Ring- und Stellknorpel mit ihren Ansatzflächen für die Muskulatur räumlich gut nachvollziehen. Eine Schwierigkeit stellte die Abgrenzung des Unterrands des Ringknorpels zur ersten Trachealspange dar, da diese sich überlagerten und keine definierte Grenze bildeten.

Mit diesem Vorgang der Probenpräparation konnten Unterschiede zur menschlichen Anatomie aufgezeigt werden, die bereits in vorherigen Arbeiten zur Kehlkopf-anatomie des Schweins (19-22,24) näher beschrieben wurden. Auch die in dieser Abhandlung durchgeführten Versuchsreihen zeigen die Unterschiede wie folgt: Die *Cart. thyroidea* ist deutlich größer und reicht kahnförmig weit nach kranial. Die *Laminae* bilden durch die Rundungen die Form eines Hufeisens. Die unteren Hörner

sind nur sehr wenig ausgeprägt, die oberen nicht vorhanden. Am Ansatzpunkt der Stimmlippen weist der Knorpel eine Änderung seiner Struktur auf, die entweder als Ossifikation oder als Übergang der Elastizitätsmodule ineinander interpretiert werden könnte.

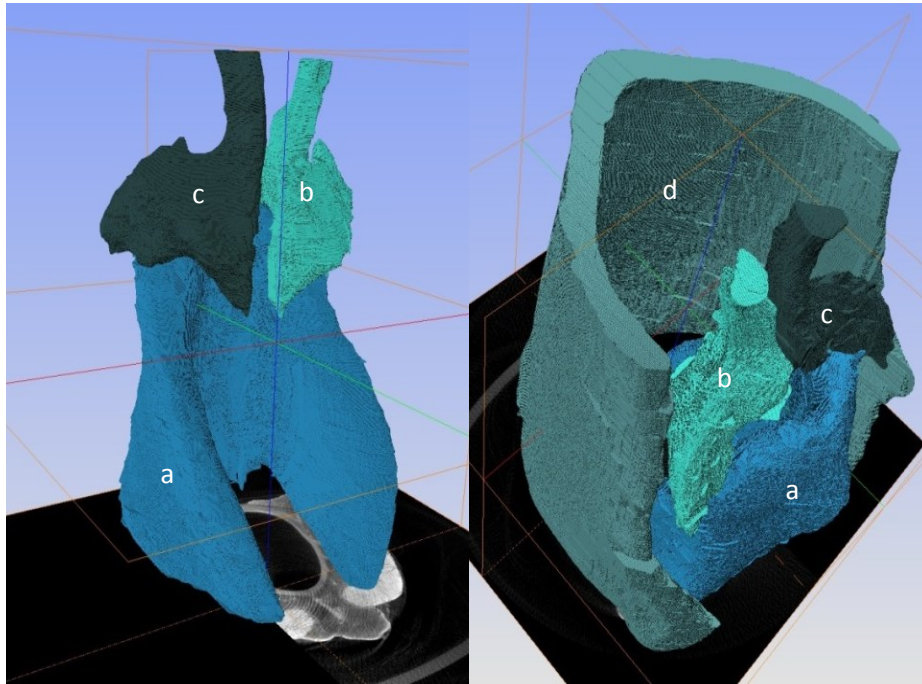


Abbildung 13: Dreidimensionales Modell des Kehlkopfskeletts, Ringknorpel (a), Stellknorpel links (b), Stellknorpel rechts (c) und Schildknorpel (d)

Der Ringknorpel wies durchgehend ein elliptisches Lumen auf und seine Rückfläche ragte weit nach kranial. Durch die Ansätze des PCA zeigte er deutliche Abflachungen, die kranial durch eine Knorpelleiste voneinander getrennt sind. Der Übergang zum Stellknorpel ließ sich gut differenzieren. Die pyramidenähnliche Form der Cart. arytaenoidei konnte grob erahnt werden. Die Procc. musculares und vocales stellten sich deutlich dar. Die kranialen Fortsätze waren verlängert und schienen durch bindegewebige Strukturen miteinander verbunden.

Mit dieser Art der Darstellung konnten die Ansätze und Ursprünge der Muskulatur und deren Verlauf im dreidimensionalen Raum gut nachvollzogen werden. Die Segmentierung selbst erwies sich durch die deutliche Kontrastierung beim Gebrauch des 3,75%igen Kontrastmittels als relativ einfach. Durch die Aufnahme des Iods in die Muskulatur im Gegensatz zu den bindegewebigen Ummantelungen war es möglich, einzelne Muskelbündel durch deren Septierung nachzuverfolgen. Im Rahmen

dieser Arbeit wurde lediglich das Gesamtvolumen der Muskeln bestimmt. Die separate Darstellung der einzelnen Muskelbündel böte darüber hinaus Potenzial zur näheren Betrachtung. Es wäre möglich, einzelne Bereiche oder auch einzelne Faserbündel hervorzuheben, jedoch würde dies durch die manuelle Segmentierung sehr viel mehr Arbeitsaufwand erfordern.

Ein weiteres Hindernis stellte das aufgetretene Ringartefakt dar, da es in manchen Bereichen die Abgrenzbarkeit der Muskulatur erschwerte. Vor allem die Differenzierung zwischen M. vocalis und TA verlor im Übergang dadurch an Genauigkeit.

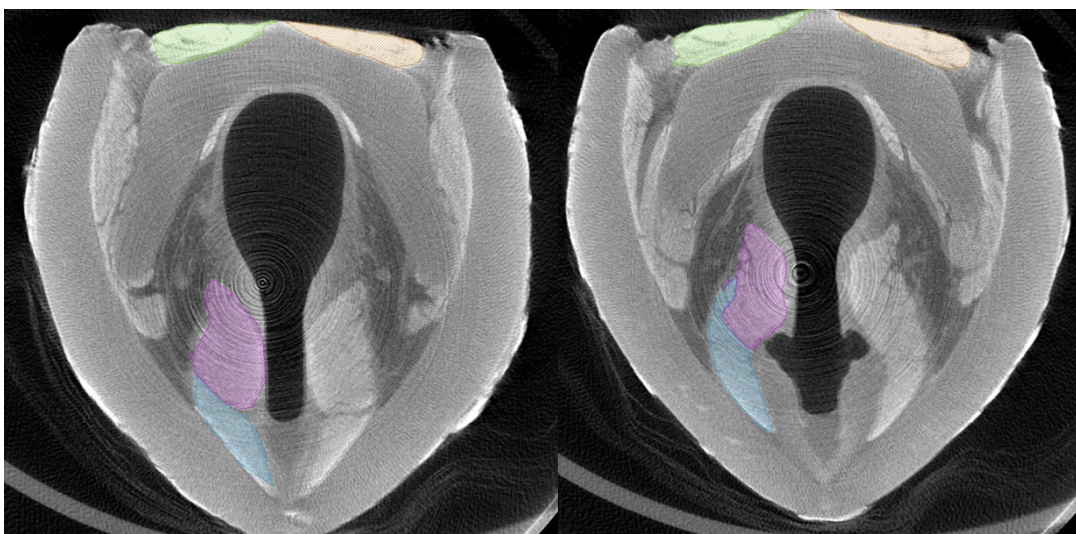


Abbildung 14: Mikro-CT des Schweinelarynx in horizontaler Ebene; Darstellung der Muskulatur im Verlauf: TA links (blau), M. vocalis links (violett), PCA links (grün) und PCA rechts (orange)

Die Segmentierung des PCA konnte ohne Schwierigkeiten durchgeführt werden, da dieser eine gut abgekapselte Struktur darstellt. Nur an den kaudalen Grenzen des Muskels war es schwierig, diesen klar zu begrenzen. Dennoch kann man den Verlauf der Fasern und seine mögliche Zugrichtung als einzigen Öffner der Stimmlippen erkennen.

Die zweite Muskelgruppe, auf die während der Segmentation besonderes Augenmerk gelegt wurde, war der TA mit dem M. vocalis. Diese waren im gesamten Verlauf klar vom Binde- und Fettgewebe zu differenzieren und konnten besonders an deren Ansätzen und Ursprüngen gut in zwei unterschiedliche Muskelpaare unterteilt werden. Im mittleren Bereich war die Abgrenzung erschwert, zumal die einzelnen Muskelfasern ineinander übergingen. Die Grenzen konnten jedoch im Verlauf er-

ahnend werden. Aufgrund dessen wurden der TA und der M. vocalis als zwei voneinander getrennte Muskeln dargestellt. In der unterhalb angeführten Abbildung kann sowohl der Verlauf der Muskulatur, als auch deren Lage im Raum nachvollzogen werden. Bei der zusätzlichen Einblendung des Knorpelskeletts werden die Ursprünge bzw. Ansätze der Muskulatur veranschaulicht.

Das nachfolgend angeführte Bild zeigt das erstellte dreidimensionale Modell des Kehlkopfskeletts und der intrinsischen Kehlkopfmuskulatur in der Planungsansicht von Avizo. Folgende Strukturen sind sichtbar: Schildknorpel (a), Ringknorpel (b), Aryknorpel rechts (c), Aryknorpel links (d), TA rechts (rot), M. vocalis rechts (gelb), PCA rechts (violett), TA links (hellgrün), M. vocalis links (dunkelgrün) PCA links (braun) und Lateralis links (rosa). Das erste Bild zeigt die Ansicht von kranial auf die Glottisebene. Dies entspricht der Perspektive bei der Untersuchung des Kehlkopfs durch die flexible Endoskopie oder (Mikro-)laryngoskopie. Bild zwei und drei stellen jene Muskulatur dar, die an der Cart. aryaenoidea entspringt. Hier sind die Ursprünge der Muskulatur sowohl am Proc. vocalis als auch am Proc. muscularis sichtbar. Das vierte Bild zeigt das Modell von der Rückseite mit der Ausdehnung der Mm. cricoarytaenoidei posteriores. Im fünften und sechsten Bild präsentiert sich die Ausdehnung des TA und des M. vocalis im Raum. Es wurde jeweils der Ansatz bzw. der Ursprung in einem Bild entfernt, um deren gesamten Verlauf besser erahnen zu können.

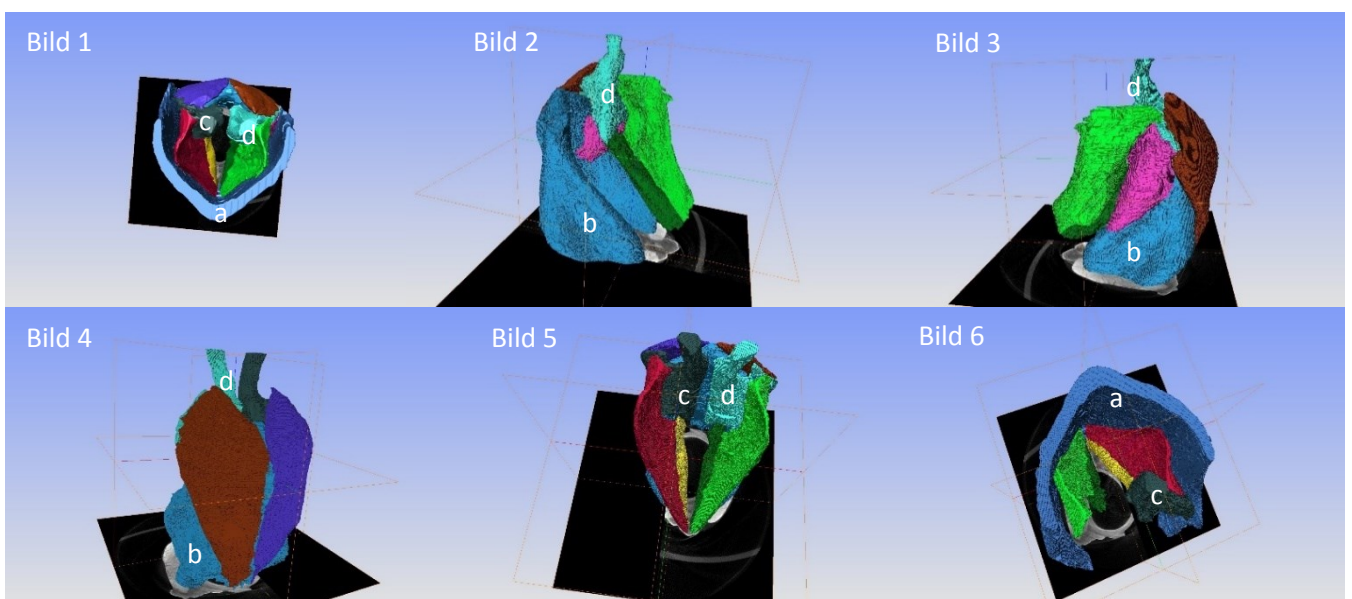


Abbildung 15: Dreidimensionales Modell des Kehlkopfskeletts und der intrinsischen Kehlkopfmuskulatur

3.4 Ergebnisse der Volumensbestimmung

Die Volumina der drei Muskelpaare TA, M. vocalis und PCA wurden aus den Rekonstruktionen von insgesamt sechs Proben bestimmt. Die ermittelten Absolutwerte können aus der unten angeführten Tabelle entnommen werden.

Volumen in cm ³	Vocalis_L	Vocalis_R	TA_L	TA_R	TA+V_L	TA+V_R
Larynx_4F_3.75	0,56	0,52	1,0	0,95	1,56	1,47
Larynx_4F_3.75_EX	0,56	0,57	0,79	0,72	1,35	1,29
Larynx_4F_7.5	0,44	0,43	0,81	0,81	1,25	1,24
Larynx_10F_3.75	0,51	0,49	1,03	0,96	1,54	1,45
Larynx_10F_3.75_EX	0,51	0,49	1,04	1,07	1,55	1,56
Larynx_10F_7.5	0,57	0,59	1,02	0,87	1,59	1,46

Volumen in cm ³	Posticus_L	Posticus_R
Larynx_4F_3.75	1,21	1,10
Larynx_4F_3.75_EX	0,90	0,86
Larynx_4F_7.5	1,02	1,01
Larynx_10F_3.75	1,12	1,16
Larynx_10F_3.75_EX	1,19	1,16
Larynx_10F_7.5	0,93	0,95

Tabelle 3: Absolutwerte der Muskelvolumina in cm³

Zuerst wurde das arithmetische Mittel der einzelnen Muskeln aus den Messergebnissen ermittelt. Dafür wurde jeweils die linke und rechte Seite als separate Probe gezählt (n=12). Der größte Muskel ist der PCA mit einem arithmetisches Mittel von 1,05 cm³ (SD: ± 0,12 cm³). Der zweitgrößte Muskel ist der TA mit einem Volumen von 0,92 cm³ (SD: ± 0,12 cm³). Die kleinste Muskelgruppe stellt der M. vocalis dar, welcher ein Volumen von 0,52 cm³ (SD: ± 0,05 cm³) ergibt. Da der TA und der M. vocalis nicht in allen Bereichen klar voneinander zu differenzieren war, wurde die Summe aus den beiden Muskeln ermittelt. Zusammen ergeben diese ein arithmetisches Mittel von 1,44 cm³ (SD: ± 0,13 cm³).

Zur näheren Beschreibung der Stichproben und zur Begutachtung deren Verteilung wurde eine Boxplot-Grafik erstellt. In dieser unten angeführten Grafik lässt sich erkennen, dass aufgrund der kleinen Stichprobenanzahl die Unterschiede zwischen

den einzelnen Muskelgruppen sehr groß sind. Es liegen jeweils vier Proben innerhalb des Quartilen-Bereichs und die übrigen beiden ergeben das Maximum und Minimum.

Beide Mm. cricoarytaenoidei posteriores zeigen eine homogene Verteilung der Werte. Die Mittelwerte und Mediane sind annähernd gleich und es gibt keine größeren Ausreißer. Hingegen zeigen die addierten Werte von TA und M. vocalis eine größere Differenz des Mittelwerts zum Median. Dieser befindet sich im Bereich der 75. Quartile. Dies wird vor allem auf der linken Seite durch einen Ausreißer nach unten deutlich. In den Volumina des TA rechts zeigen sich ebenso große Abweichungen des Minimums bzw. des Maximums vom Quartilenbereich.

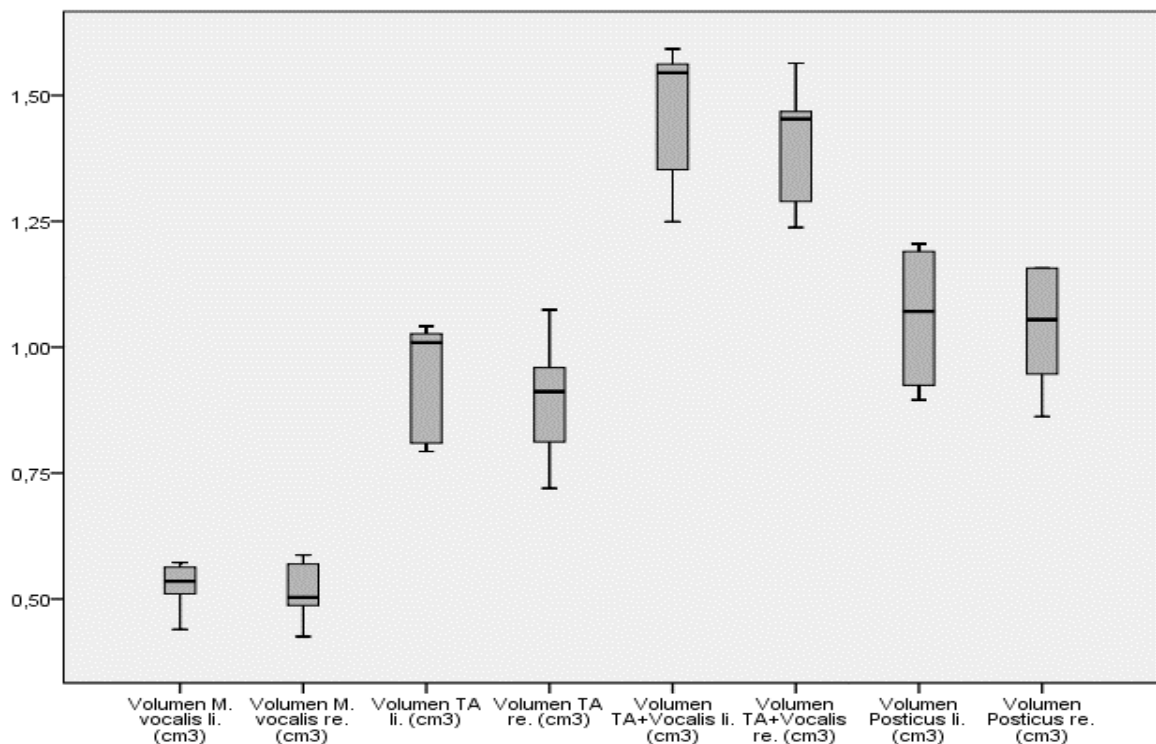


Abbildung 16: Volumensverteilung der intrinsischen Kehlkopfmuskulatur (Box-Plot)

Aus der Grafik lässt sich ableiten, dass bei diesen Stichproben der PCA am ehesten einer Normalverteilung folgt. Um eine tatsächliche Normalverteilung der Proben zu überprüfen, wurde ein Kolmogorov-Smirnov-Test mit Signifikanzkorrektur nach Lilliefors durchgeführt. Dies ergibt, dass bei allen Muskeln bis auf den TA links und die

Summe vom TA und M. vocalis links von einer Normalverteilung ausgegangen werden kann.

Wenn man die Absolutwerte der paarig angelegten Muskeln separat betrachtet ergibt sich bei nahezu allen Muskeln eine Größendominanz der linken Seite. Bei der Berechnung des arithmetischen Mittels (M. vocalis li. 0,53 cm³ vs. M. vocalis re. 0,51 cm³, TA li. 0,95 cm³ vs. TA re. 0,90 cm³, PCA li. 1,06 cm³ vs. PCA re. 1,04 cm³) zeigt sich diese Größendominanz ebenso. Die geringsten Seitenunterschiede sind beim PCA zu vermerken.

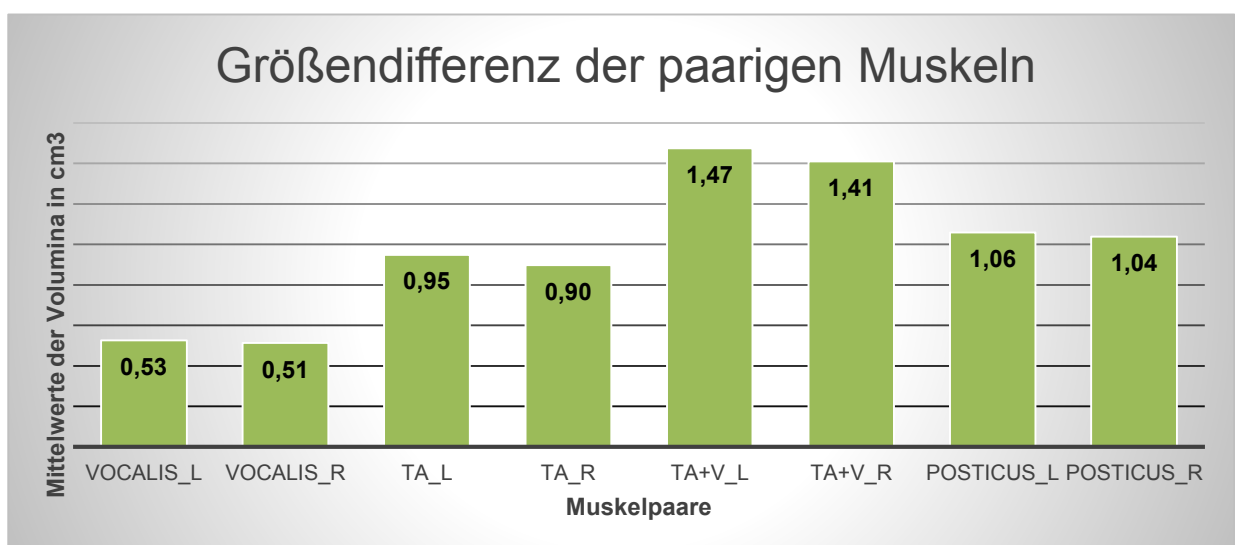


Abbildung 17: Seitenvergleich der arithmetischen Mittel der intrinsischen Kehlkopfmuskulatur

Um eine mögliche Seitendifferenz statistisch zu beweisen, wurde ein T-Test für unabhängige Stichproben bei jenen Muskelgruppen durchgeführt, bei denen durch den Kolmogorov-Smirnov-Test eine Normalverteilung angenommen werden kann. Dieses Testverfahren wurde gewählt, da es zwischen links und rechts keine Ursache-Wirkungsbeziehung gibt. Die Muskelpaare befinden sich zwar im selben Bezugssystem, jedoch sind sie durch ihre unterschiedliche Versorgung durch Gefäße und Nerven anderen Einflüssen ausgesetzt.

Zur Klärung der Homogenität der Varianzen wurde vor der Berechnung ein F-Test durchgeführt. Dieser ergibt eine Homoskedastizität, womit der entsprechende T-

Test angewendet wird. Das Ergebnis dieser Auswertung ergibt sowohl für den Vergleich des linken und rechten M. vocalis (p-Wert: 0,691) als auch für den linken und rechten PCA (p-Wert: 0,781) kein signifikantes Ergebnis.

Da der Kolmogorov-Smirnov-Test für den TA links und rechts bzw. für die Summe von TA und M. vocalis links und rechts unterschiedliche Verteilungen ergeben hat, wurde folglich ein Permutationstest durchgeführt, um eine Größendifferenz zwischen den Seiten festzustellen. Die Ergebnisse aus diesem Test zeigen für den TA links und rechts (p-Wert: 0,2338) bzw. für die Summe von TA und M. vocalis links und rechts (p-Wert: 0,2143) ebenfalls kein signifikantes Ergebnis.

4 Diskussion

Die Mikro-CT-gestützte Erstellung dreidimensionaler Modelle von Organen und anatomischen Strukturen stellt eine neue und elegante Methode dar, die es ermöglicht, die gewünschten Proben in ihrer Gesamtheit abzubilden, ohne diese bei der Generierung der Schnittbilder zu zerstören. Durch die gleichzeitige Verwendung des muskelsensitiven Kontrastmittels I₂KI und des Rekonstruktionsprogramms Avizo lassen sich Muskelverläufe im dreidimensionalen Raum nachverfolgen. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, die Volumina der segmentierten Objekte zu bestimmen.

Diese Form der Analyse muskulärer Strukturen wurde bereits in einer Vielzahl von Experimenten mit unterschiedlichen Fragestellungen sowohl an diversen Tierspezies (2-4,27-29,31,32) als auch an menschlichen Feten (30) angewendet. Die Technik der dreidimensionalen Rekonstruktion laryngealer Strukturen fand jedoch erst im Rahmen von herkömmlichen CT- (33,34), Mikro-MRT-Untersuchungen (8) oder bei histologischer Aufarbeitung (5) Gebrauch.

Ziel dieser Arbeit war es zu klären, inwiefern mit dem zuvor erläuterten Verfahren die anatomischen Verhältnisse der intrinsischen Kehlkopfmuskulatur abgebildet werden können. Vor allem bestand das Interesse darin zu überprüfen, ob es möglich ist, aus den gewonnenen Bilddaten die Volumina der Muskulatur zu berechnen.

Aus den Ergebnissen dieser Studie lässt sich ableiten, dass es auf relativ einfache Art und Weise möglich ist, Modelle mit dieser Form der Probenbearbeitung zu gewinnen. Es kann bestätigt werden, dass jene Methodik ein einfaches und effizientes Instrument zur Berechnung der Muskelvolumina darstellt. Die verwendeten Versuchsprotokolle können als Grundlage für weitere Projekte mit ähnlichen Fragestellungen herangezogen werden.

Für diese Forschungsarbeit wurden Schweine als Modelltiere verwendet. Diese Vorgehensweise erscheint plausibel, da zum einen große Ähnlichkeiten zum menschlichen Kehlkopf in Bezug auf Größe und Anordnung der Muskulatur besteht. Zum anderen ist die Probenbeschaffung über den Schachhof einfach und kostengünstig.

Die Modelle dienen einer guten Veranschaulichung komplexer anatomischer Gegebenheiten im dreidimensionalen Raum. Die Funktion der Muskulatur kann bei diesen Modellen nur bedingt nachvollzogen werden, da bei der groben Segmentierung, die zur Bestimmung eines Muskelvolumens ausreicht, keine einzelnen Muskelfasern berücksichtigt werden. Dadurch fehlt in diesen Abbildungen der Vektor, der die Richtung der Kontraktion vorgibt. Jedoch kann in Zusammenschau mit den CT-Bildern, die Funktion im Groben nachvollzogen werden. Zum Beispiel lässt sich die Funktion der beiden muskulären Komponenten des TA im dreidimensionalen Modell erahnen. Die äußersten Anteile des TA können durch den Ansatz am lateralen Rand des Processus muscularis eine optimale Kraftwirkung erzielen und somit durch die Rotation der Stellknorpel die Stimmlippen schließen. Die mittleren Anteile können dabei durch das Ineinandergreifen der Muskelfasern mit dem M. vocalis an der Änderung der Spannungszustände der Stimmlippen beteiligt sein. Der M. vocalis als innerster Anteil kontrolliert die Spannung der Stimmlippen, denn durch seine Lage abseits eines guten Rotationspunkts kann er nur bedingt am Glottisschluss teilnehmen. Somit ergibt sich eine funktionelle Koppelung der beiden muskulären Anteile.

Durch die Tatsache, dass diese Technik ausschließlich zur Klärung von Problemstellungen ex vivo durchgeführt werden kann, stellt sich die Frage, ob die Modelle, die anhand von exzidierten Kehlköpfen generiert werden, dem tatsächlichen Sachverhalt im lebendigen Schwein entsprechen. Durch den Tonusverlust der Muskulatur, sowohl der intrinsischen als auch der akzessorischen, welche den Kehlkopf in seiner Ausgangslage stabilisiert, ist davon auszugehen, dass es zu veränderten Verhältnissen als in vivo kommt. Dieses Problem wurde auch von Cox und Jeffery (6) beschrieben. Trotz dieser veränderten Bedingungen dienen die Modelle einem leichteren Verständnis der Funktion von komplexen laryngealen Strukturen. Ferner ist dies bei Forschungsarbeiten, die sich mit dem relativen Wachstum der Muskulatur beschäftigen, nicht relevant, weil beide Seiten diesem Effekt unterliegen.

Die Generierung der Modelle und deren Genauigkeit wird durch verschiedene Parameter beeinflusst. Der Kontrast und somit die Differenzierbarkeit des Knorpels und der Muskulatur vom umliegenden Gewebe wird maßgeblich von der Kontrastmittelkonzentration beeinflusst. Je höher die Konzentration gewählt wird, desto bes-

ser ist die Anreicherung des I₂KI in der Muskulatur und dadurch auch die Genauigkeit der Modelle. Kritisch einzuwenden ist, dass es bei einer zu hohen Konzentration zu Schrumpfungseffekten der Muskulatur kommt, wie bereits von Vickerton et al. (26) beschrieben wurde. In Folge dessen wird die Berechnung der Muskelvolumina beeinflusst.

In der Literatur wurden verschiedene Kontrastmittelkonzentrationen (1,8 % - 25 %) mit unterschiedlichen Einlegedauern (zwei Tage bis sieben Wochen) beschrieben (2,6,27,30-32). Diese Varianz ließ als primäres Forschungsziel die Ermittlung der optimalen Konzentration definieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die intrinsische Kehlkopfmuskulatur des Schweines eine optimale Kontrastmittelkonzentration von 3,75 % ermittelt. Bei dieser Versuchsanordnung konnte dahingehend eine gute Differenzierung der muskulären Strukturen gewährleistet werden.

Durch die Verwendung eines Exsikkators erhoffte man sich eine Erhöhung des Diffusionsdrucks in Richtung Gewebeinneres, wodurch die Aufnahme des I₂KI in die Muskulatur unterstützt werden sollte. Dies führte zu einer geringen Kontraststeigerung in den tieferliegenden Strukturen. Es wird empfohlen, dieses Gerät zu verwenden, sofern es zur Verfügung steht. Dies ist jedoch nicht obligat, um brauchbare Ergebnisse zu erreichen.

Nicht nur das Kontrastmittel beeinflusst die Volumensberechnungen in dieser Versuchsanordnung, sondern auch die Konservierung durch Formalin. Dies führt ebenso zu einer Schrumpfung der Muskulatur bis zu 10 % (26). Um diesen Effekt zu umgehen, wurde in Voruntersuchungen versucht frisches Gewebe ohne Vorbearbeitung mit Formalin zu verwenden. Dabei kam es ,neben der unzureichenden Aufnahme des Kontrastmittels in die Muskulatur, innerhalb des Gewebes zu hypodensen Einschlüssen, die die innere Architektur des Kehlkopfs veränderten. Aufgrund der niedrigen Dichtewerte wurde vermutet, dass es sich dabei um Lufteinschlüsse handelt, die durch Zersetzungsprozesse innerhalb des Gewebes entstehen können. Zusätzlich wurde beobachtet, dass Bereiche, die mit dem Iod eingefärbt wurden, deutlich geringere bis keine Veränderungen aufwiesen. Je höher die Konzentration des Kontrastmittels gewählt wurde, desto geringer waren die Veränderungen. Dieser Effekt kam vor allem im Bereich des PCA zu tragen. Es ist nicht klar, ob sich dies durch die kompaktere Struktur des PCA ergibt, und dadurch eine

natürliche Barriere gegen das Eindringen der Luft besteht, oder ob das Iod einen schützenden Faktor vor schnellerer Zersetzung darstellt. Die Verwendung eines Shakers zu besserer Verteilung des Kontrastmittels um die Probe, brachte keinen zusätzlichen Effekt für eine bessere Kontrastierung. Im Gegenteil, durch die Bewegung der Probe kam es zu einer Vermehrung der hypodensen Einschlüsse innerhalb des Gewebes.

Eine erst nach der Präparation erschienene Studie von Li et al. (32) beschäftigte sich mit dem Problem der erschwerten Kontrastanreicherung größerer Proben. Aus deren Ergebnissen lässt sich ableiten, dass vor allem eine verlängerte Einlegedauer, entscheidend ist. Zusätzlich um das Angebot an Iod zur Gewebeanreicherung zu steigern, wurde das Kontrastmittel in regelmäßigen Abständen gewechselt. Dies wird damit begründet, dass es nach einer längeren Einlegephase zu einer Stagnation der Diffusion des I₂KI kommt, da die Konzentration von Iod innerhalb des Gewebes höher ist als in der Flüssigkeit. Vor allem die Haut lagert ein hohes Maß an Iod ein und bildet dadurch eine Diffusionsbarriere. Durch einen Austausch der Kontrastmittelflüssigkeit sollte somit die Kontrastierung der tieferliegenden Strukturen ermöglicht werden.

Im Vergleich zu den Bilddaten, die in der vorliegenden Arbeit gewonnen wurden, konnte eine ähnlich gute Färbung der Muskulatur ohne Wechsel des Kontrastmittels bei annähernd gleicher Konzentration (3,75 % vs. 2,97 %) generiert werden. Zu erwähnen ist jedoch, dass in dieser Versuchsanordnung störende Gewebeanteile wie Haut und die akzessorische Muskulatur entfernt wurden. Dadurch kommt es im Gegensatz, wie in der Studie von Li et al. (33) beschrieben - ein gesamter Gänsekopf -, primär zu einer Reduktion von natürlichen Barrieren. Dies wiederum erleichtert das Eindringen des Kontrastmittels in die tiefer gelegenen Strukturen.

Bei Erhöhung der Kontrastmittelkonzentration kam es in der oberflächlich liegenden Muskulatur wie dem PCA zu einer deutlich intensiveren Einlagerung im Gegensatz zu den tiefer gelegenen Muskelpartien. Dies wurde in der Publikation von Li et al. (32) darauf zurückgeführt, dass die Bindung des Iods an Glykogen einen verzögerten Transport durch das Gewebe erzeugt und somit das Kontrastmittel in den äußeren Bereichen durch eine verlängerte Diffusionszeit einlagert wird. Um diesen

Effekt zu minimieren wird ein mehrfacher Wechsel des Kontrastmediums mit stetigem Anstieg der Konzentration (z.B. 1%, anschließend 2% und für die letzte Phase 3%) empfohlen.

Ein weiterer Faktor, der die Modellgenerierung beeinflusste, ist die Auflösung der Proben durch Verwendung des richtigen Scanprotokolls für das Mikro-CT. Nach mehreren Adaptionen konnte eine Auflösung von 52,62 μm pro Voxel erreicht werden. In ähnlichen Studien bei denen ebenso Mikro-CTs verwendet wurden, konnten Auflösungen im Bereich von 64 μm (31) bzw. zwischen 72 – 85,8 μm (32) pro Voxel erreicht werden. Im Vergleich mit den Werten aus der Studie von Chen et al. (8), die ein 7T-Mikro-MRT verwendet haben, konnte eine Auflösung von 175 x 175 x 250 μm pro Voxel bei einer Aufnahmedauer von zweieinhalb Stunden erzielt werden. Die für diese Arbeit gewählte Methode hingegen konnte bei einer Akquisitionsdauer von etwa 40 min eine bessere Auflösung erzielen. Zu erwähnen gilt, dass bei der Verwendung des Mikro-MRT die Präparation der Proben nicht notwendig ist, da das MRT bereits durch das Aufnahmeverfahren einen Vorteil in der Darstellung der Weichteilstrukturen bietet.

Die Genauigkeit der Modellerstellung im Zentrum der Probe wurde durch ein Ringartefakt erschwert, das auch nach mehreren Adaptation und wiederholten Scansvorgängen nicht zu minimieren war. Die Forschungstätigkeit konnte trotz des Ringartefakts erfolgen, dennoch wäre es für weitere Studien ratsam, die Einstellungen des Mikro-CT derart zu konfigurieren, dass das Ringartefakt geringer ausgeprägt bzw. nicht vorhanden ist. Zur genaueren Beurteilung der einzelnen Muskelbündel könnte ebenfalls noch eine Verfeinerung des Akquisitionsprotokolls erfolgen, um Fragestellungen in diesem Bereich besser beantworten zu können.

Die Software *Avizo* bietet alle nötigen Funktionen, die für eine Segmentierung von anatomischen Strukturen benötigt wird. Die Handhabung ist relativ einfach, vor allem für Anwender, die bereits Erfahrung mit Grafikprogrammen haben, da die Tools zur Markierung der Objekte ähnlich sind. Für Fragestellungen im Bereich der Modellerstellung, besonders in Kombination mit hochauflösenden Mikro-CT Bildern, stellt das Programm eine nützliche Software dar. Durch wenige zusätzliche Schritte ist es möglich, aus den Modellen die Volumina der Objekte zu berechnen.

Die Modellerstellung selbst erwies sich als sehr zeitaufwendig, da keine semiautomatischen Tools verwendet werden konnten. Die Grenzen zwischen der Muskulatur und dem Bindegewebe konnte stellenweise nur durch den Verlauf bestimmt werden, deswegen wird für Forschungen in diesem Bereich eine reine computergestützte Analyse kaum möglich sein.

Die Genauigkeit der Modelle und somit die volumetrischen Berechnungen sind bei der manuellen Segmentierung in *Avizo* von der präzisen Arbeit des Softwarebedieners abhängig. Einerseits kann durch die Wahl eines kleinen Intervalls bei der Interpolation der Schichten die Exaktheit des Modells erhöht werden, andererseits erhöht dies jedoch deutlich den Arbeitsaufwand. In dieser Arbeit wurde auf ein Interpolationsintervall von etwa 40 – 50 Schichten zurückgegriffen. Ein zu großes Abweichen der Markierungen des Objekts von dem dargestellten Muskel konnte bei der Kontrolle korrigiert werden. Um zusätzlich die Detailgenauigkeit zu erhöhen, wurde das Objekt in allen drei Schnittebenen nachkontrolliert und nachjustiert.

In der Interpretation der Bilddaten kann sich durch die Entscheidung des Softwareanwenders eine gewisse Spannbreite ergeben, welche Elemente noch zu einer Struktur gezählt werden und welche nicht mehr Teil des Objekts sind. Aufgrund dessen sollte bei der Durchführung dieser Technologie die Auswertung der Bilddaten und die Segmentation von ein und derselben Person durchgeführt werden, um einen Bias durch unterschiedliche Interpretationen desselben Objekts zu vermeiden.

Die graphische Darstellung der Modelle in *Avizo* wirkt durch die Zusammensetzung aus Schnittbildern, in denen Objekte zweidimensional markiert werden, sehr grob und kantig. Dies entspricht nicht den natürlichen runden Formen, wie sie in der Natur vorkommen. Die Software ermöglicht eine Glättung der Oberflächen, jedoch werden diese automatisch durchgeführt. Dabei gehen häufig Informationen verloren und das Objekt wirkt in dieser Darstellung stark verzerrt. Um eine natürlichere Form der Modelle für genauere Darstellungen zu generieren, wäre es ratsam, die in *Avizo* erstellten Modelle in einer anderen Software nachzubearbeiten.

Im Verlauf der Forschungsarbeit kam es am Biomedizinischen Institut zu technische Gebrechen des Mikro-CT-Scanners. Dadurch konnte die Einlegedauer von zehn Tagen bis zum Scanvorgang nicht eingehalten werden. Nichtsdestotrotz konnte der Versuch durch die Konservierung mit Formalin und das Belassen der Proben im

Kontrastmedium wie geplant durchgeführt werden. Bei weiteren Studien, die dieses Protokoll verwenden, sollte kritisch hinterfragt werden, ob die angegebene Einlegedauer von zehn Tagen für eine optimale Kontrastmittelanreicherung ausreicht. Im Falle der unzureichenden Kontrastierung könnten die Proben erneut in das Kontrastmittel zur weiteren Anreicherung gegeben werden.

Mit Hilfe dieser Technik konnte das Volumen und infolgedessen die arithmetischen Mittel folgender Muskelpaare ermittelt werden. Dies ergibt der Größe nach geordnet für den PCA ein Volumen von $1,05 \text{ cm}^3$ (SD: $\pm 0,12 \text{ cm}^3$), für den TA $1,05 \text{ cm}^3$ (SD: $\pm 0,12 \text{ cm}^3$) und für den M. vocalis $0,52 \text{ cm}^3$ (SD: $\pm 0,05 \text{ cm}^3$). Aufgrund der Größendifferenz der Mittelwerte mit einer Dominanz der linken gegenüber der rechten Seite, wurde eine statistische Analyse durchgeführt, um zu klären, ob es sich bei dieser Beobachtung um einen Zufall handelt. Diese ergibt für sämtliche Muskelgruppen kein signifikantes Ergebnis, also ist davon auszugehen, dass die linke und die rechte Seite in etwa die gleiche Größe besitzen. Zu beachten ist jedoch, dass bei einer Fallzahl von sechs Proben kein verlässlicher Rückschluss auf die Verteilung zu treffen ist. Um eine Seitendifferenz der einzelnen intrinsischen Kehlkopfmuskeln am Schwein festzustellen, wäre eine Studie mit einer größeren Anzahl von Proben notwendig.

Die Muskelvolumina, die in dieser Studie berechnet wurden, sollen darauf hinweisen, dass diese Methode eine Möglichkeit bietet, bei einem genau vorgegebenen Studienprotokoll Fragestellungen in Bezug auf die quantitative Bestimmung der Muskulatur zu beantworten. Wie groß die interindividuellen Unterschiede der Muskelvolumina innerhalb der Gattung Schwein tatsächlich sind, ist durch diese Studie nicht zu beantworten. Für diese Aussage ist eine Stichprobengröße von sechs Larynges, die jeweils einer unterschiedlichen Vorbereitung unterzogen wurden, zu gering. Überdies ist der Bezug der Proben vom Schlachthof zu ungenau. Einflussgrößen wie das Alter, das Gewicht und das Geschlecht der einzelnen Proben können nicht bestimmt werden. Bereits in der makroskopischen Begutachtung zeigte sich ein Unterschied der einzelnen Proben vor allem in Hinsicht auf deren Größe. Aufgrund der genannten Gründe ist durch die gegebenen Daten kein statistisch signifikantes Ergebnis möglich.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden weitere Erkenntnisse in Bezug auf den Effekt der Muskelschrumpfung durch das Kontrastmittel gewonnen. Im Vergleich der Konzentrationen 3,75 % und 7,5 % I₂KI zeigte sich kein wesentlicher Unterschied im durchschnittlichen Volumen. Bei genauer Betrachtung der Einzelergebnisse sind die Muskelvolumina der Probe „Larynx-4F-7,5“ kleiner als das arithmetische Mittel mit 0,44 cm³ bzw. 0,43 cm³ vs. 0,53cm³ bzw. 0,52 cm³ am Beispiel des M. vocalis, aber die Probe „Larynx-10F-7,5“ liegt mit 0,57 cm³ bzw. 0,59 cm³ bei diesem Muskel über dem arithmetischen Mittel. Dies würde den Effekt nicht bestätigen, andererseits lässt sich bei dieser Stückzahl kein signifikanter Gegenbeweis erbringen. Diese Ergebnisse könnten auch durch den interindividuellen Unterschied innerhalb der Gattung Schwein entstehen.

Ein weiterer Faktor, der sehr wohl für die Verminderung des Muskelvolumens durch die Erhöhung der Kontrastmittelkonzentration sprechen würde, ist die Beobachtung, dass die Septierung innerhalb der Muskulatur bei den Proben mit 7,5%igen Kontrastmittel stärker ausgeprägt wirkt. Dies könnte durch eine Schrumpfung der Muskulatur mit Zerreißen der bindegewebigen Hülle innerhalb des Kompartiments hervorgerufen werden (26). Die äußere Fixierung der stärkeren Muskelfaszie im umliegenden Gewebe könnte dabei verhindern, dass sich der Durchmesser der Muskulatur verändert. Da bei der Muskelsegmentation jedoch nur die äußeren Grenzen erfasst werden, fällt die Schrumpfung innerhalb der Muskulatur nicht ins Gewicht. Um diese Theorie zu bestätigen wären weitere Versuche notwendig.

In der Literatur der Kehlkopfanatomie wird der M. vocalis häufig zum TA gezählt, da die Differenzierung der beiden Muskelanteile eine Schwierigkeit darstellt. In dieser Arbeit wurden diese separat voneinander segmentiert und abgebildet, da in den Mikro-CT Bildern eine Abgrenzung der beiden Muskeln vor allem an deren Ursprüngen an der Cart. arytaenoidea möglich war. Im mittleren Anteil des Muskelverlaufs kommt zu einer Vereinigung dieser, wodurch die Trennlinie ungenau und im Verlauf erahnt wurde. Aufgrund dieser Ungenauigkeit wurden der TA und der M. vocalis bei der Berechnung der Muskelvolumina sowohl getrennt als auch zusammen betrachtet.

Bei der Segmentierung des M. vocalis fällt zusätzlich auf, dass am Insertionspunkt der Stimmlippen am Schildknorpel die Absorptionseigenschaften des Knorpels vom

übrigen Knorpel abweichen. Die Dichtewerte verändern sich kontinuierlich von der Muskulatur bis zum Knorpel. In der Publikation von Kutta et al. (15) wird ein Übergang der Gewebe zur Anpassung der Elastizitätsmodule beschrieben. Diese Annäherung der Elastizitätsmodule könnte die Veränderungen der knorpeligen Struktur in diesem Bereich erklären. Um diese Frage eindeutig klären zu können, bedarf es weiterer Untersuchungen.

Abschließend wäre noch zu erwähnen, dass diese Methode ebenfalls ex vivo für muskelspezifische Fragestellungen am Menschen nützlich sein könnte. Durch die Auswaschmethode (7,27) ist es möglich mit nur einem Kehlkopf, die optimale Konzentration des Kontrastmittels zu ermitteln und die Scanprotokolle zu optimieren. Eine anschließende histologische Verifizierung ist nach Auswaschung des I₂KI ebenfalls zulässig. Auf diese Weise könnten neben der Generierung der Modelle zur Veranschaulichung der komplexen anatomischen Verhältnisse innerhalb des Kehlkopfs, die Volumina und auch die Faserorientierung der Muskulatur erforscht werden, ohne dass diese dabei durch histologische oder anatomische Präparation zerstört werden. In weiterer Folge könnten diese Segmentationen auch für morphometrische Analysen herangezogen werden. Dies könnte helfen, die komplexen Abläufe innerhalb des Kehlkopfs noch besser zu verstehen.

Literaturverzeichnis

- (1) Metscher BD. X-ray microtomographic imaging of intact vertebrate embryos. *Cold Spring Harb Protoc* 2011 Dec 1;2011(12):1462-1471.
- (2) Stephenson RS, Boyett MR, Hart G, Nikolaidou T, Cai X, Corno AF, et al. Contrast enhanced micro-computed tomography resolves the 3-dimensional morphology of the cardiac conduction system in mammalian hearts. *PLoS One* 2012;7(4):e35299.
- (3) Aslanidi OV, Nikolaidou T, Zhao J, Smaill BH, Gilbert SH, Holden AV, et al. Application of micro-computed tomography with iodine staining to cardiac imaging, segmentation, and computational model development. *IEEE Trans Med Imaging* 2013 Jan;32(1):8-17.
- (4) Degenhardt K, Wright AC, Horng D, Padmanabhan A, Epstein JA. Rapid 3D phenotyping of cardiovascular development in mouse embryos by micro-CT with iodine staining. *Circ Cardiovasc Imaging* 2010 May;3(3):314-322.
- (5) Moses RL, Flint PW, Paik CH, Zinreich SJ, Cummings CW. Three-dimensional reconstruction of the feline larynx with serial histologic sections. *Laryngoscope* 1995 Feb;105(2):164-168.
- (6) Cox PG, Jeffery N. Reviewing the morphology of the jaw-closing musculature in squirrels, rats, and guinea pigs with contrast-enhanced microCT. *Anat Rec (Hoboken)* 2011 Jun;294(6):915-928.
- (7) Jeffery NS, Stephenson RS, Gallagher JA, Jarvis JC, Cox PG. Micro-computed tomography with iodine staining resolves the arrangement of muscle fibres. *J Biomech* 2011 Jan 4;44(1):189-192.
- (8) Chen T, Chodara AM, Sprecher AJ, Fang F, Song W, Tao C, et al. A new method of reconstructing the human laryngeal architecture using micro-MRI. *J Voice* 2012 Sep;26(5):555-562.
- (9) Boyde A. Staining plastic blocks with triiodide to image cells and soft tissues in backscattered electron SEM of skeletal and dental tissues. *Eur Cell Mater* 2012 Jul 24;24:154-60; discussion 160-1.
- (10) Lecker DN, Kumari S, Khan A. Iodine binding capacity and iodine binding energy of glycogen. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 1997;35(8):1409-1412.
- (11) Saenger W. The structure of the blue starch-iodine complex. *Naturwissenschaften* 1984;71(1):31-36.
- (12) Dikeman KJ, Rubin JS, Sataloff RT. *Diagnosis and Treatment of Voice Disorders*. 2nd ed.: Singular Publishing Group Inc.; 2002. p. 27-68.

- (13) Anderhuber F, Pera F, Streicher J. Waldeyer - Anatomie des Menschen: Lehrbuch und Atlas in einem Band. . 19th ed. Berlin/Boston: De Gruyter; 2009. p. 844-855.
- (14) Standring S. Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practise. . 40th Edition ed. London: Elsevier Churchill Livingstone; 2008. p. 586-604.
- (15) Kutta H, Knipping S, Claassen H, Paulsen F. Functional anatomy of the larynx from clinical viewpoints. Part I: development, laryngeal skeleton, joints, insertion structures, musculature. HNO 2007 Jul;55(7):583-598.
- (16) Chhetri DK, Neubauer J. Differential roles for the thyroarytenoid and lateral cricoarytenoid muscles in phonation. Laryngoscope 2015 Jul 21.
- (17) Sanders I, Jacobs I, Wu BL, Biller HF. The three bellies of the canine posterior cricoarytenoid muscle: implications for understanding laryngeal function. Laryngoscope 1993 Feb;103(2):171-177.
- (18) Cox KA, Alipour F, Titze IR. Geometric structure of the human and canine cricothyroid and thyroarytenoid muscles for biomechanical applications. Ann Otol Rhinol Laryngol 1999 Dec;108(12):1151-1158.
- (19) Nasser Kotby M, Wahba HA, Kamal E, El-Makhzangy AM, Bahaa N. Animal model for training and improvement of the surgical skills in endolaryngeal microsurgery. J Voice 2012 May;26(3):351-357.
- (20) Alipour F, Jaiswal S. Phonatory characteristics of excised pig, sheep, and cow larynges. J Acoust Soc Am 2008 Jun;123(6):4572-4581.
- (21) Alipour F, Jaiswal S, Vigmostad S. Vocal fold elasticity in the pig, sheep, and cow larynges. J Voice 2011 Mar;25(2):130-136.
- (22) Jiang JJ, Raviv JR, Hanson DG. Comparison of the phonation-related structures among pig, dog, white-tailed deer, and human larynges. Ann Otol Rhinol Laryngol 2001 Dec;110(12):1120-1125.
- (23) Stevens KA, Thomson SL, Jette ME, Thibeault SL. Quantification of Porcine Vocal Fold Geometry. J Voice 2015 Aug 17.
- (24) Gorti GK, Birchall MA, Haverson K, Macchiarini P, Bailey M. A preclinical model for laryngeal transplantation: anatomy and mucosal immunology of the porcine larynx. Transplantation 1999 Dec 15;68(11):1638-1642.
- (25) Knight MJ, McDonald SE, Birchall MA. Intrinsic muscles and distribution of the recurrent laryngeal nerve in the pig larynx. Eur Arch Otorhinolaryngol 2005 Apr;262(4):281-285.
- (26) Vickerton P, Jarvis J, Jeffery N. Concentration-dependent specimen shrinkage in iodine-enhanced microCT. J Anat 2013 Aug;223(2):185-193.

- (27) Baverstock H, Jeffery NS, Cobb SN. The morphology of the mouse masticatory musculature. *J Anat* 2013 Jul;223(1):46-60.
- (28) Cox PG, Fagan MJ, Rayfield EJ, Jeffery N. Finite element modelling of squirrel, guinea pig and rat skulls: using geometric morphometrics to assess sensitivity. *J Anat* 2011 Dec;219(6):696-709.
- (29) Hautier L, Lebrun R, Cox PG. Patterns of covariation in the masticatory apparatus of hystricognathous rodents: implications for evolution and diversification. *J Morphol* 2012 Dec;273(12):1319-1337.
- (30) Wu J, Yin N. Detailed Anatomy of the Nasolabial Muscle in Human Fetuses as Determined by Micro-CT Combined With Iodine Staining. *Ann Plast Surg* 2016 Jan;76(1):111-116.
- (31) Kupczik K, Stark H, Mundry R, Neininger FT, Heidlauf T, Rohrle O. Reconstruction of muscle fascicle architecture from iodine-enhanced microCT images: A combined texture mapping and streamline approach. *J Theor Biol* 2015 Oct 7;382:34-43.
- (32) Li Z, Clarke JA, Ketcham RA, Colbert MW, Yan F. An investigation of the efficacy and mechanism of contrast-enhanced X-ray computed tomography utilizing iodine for large specimens through experimental and simulation approaches. *BMC Physiol* 2015 Dec 21;15:5-015-0019-3.
- (33) Bakhshae H, Moro C, Kost K, Mongeau L. Three-dimensional reconstruction of human vocal folds and standard laryngeal cartilages using computed tomography scan data. *J Voice* 2013 Nov;27(6):769-777.
- (34) Loth A, Corny J, Santini L, Dahan L, Dessi P, Adalian P, et al. Analysis of Hyoid-Larynx Complex Using 3D Geometric Morphometrics. *Dysphagia* 2015 Jun;30(3):357-364.