

Kommunikationsstörungen

Berichte aus Phoniatrie und Pädaudiologie

Herausgeber : M. Döllinger

Begründet 1996 von U. Eysholdt

Gregor Peters

**Development of synthetic mucus
with physiological viscoelasticity
and its impact on phonation**

**SHAKER
VERLAG**

Development of synthetic mucus
with physiological viscoelasticity
and its impact on phonation

Entwicklung von synthetischem
Mucus mit physiologischer Viskoelastizität
und dessen Einfluss auf die Phonation

Der Technischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

zur
Erlangung des Doktorgrades
DOKTOR-INGENIEUR

vorgelegt von
Gregor Peters

Als Dissertation genehmigt
von der Technischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

Tag der mündlichen Prüfung: 30.11.2022

Gutachter: Prof. Dr.-Ing. Michael Döllinger
apl. Prof. Dr.-Ing. habil. Stefan Becker

Kommunikationsstörungen - Berichte aus Phoniatrie und
Pädaudiologie

Band 31

Gregor Peters

**Development of synthetic mucus with physiological
viscoelasticity and its impact on phonation**

D 29 (Diss. Universität Erlangen-Nürnberg)

Shaker Verlag
Düren 2023

Bibliographic information published by the Deutsche Nationalbibliothek

The Deutsche Nationalbibliothek lists this publication in the Deutsche Nationalbibliografie; detailed bibliographic data are available in the Internet at <http://dnb.d-nb.de>.

Zugl.: Erlangen-Nürnberg, Univ., Diss., 2022

Copyright Shaker Verlag 2023

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording or otherwise, without the prior permission of the publishers.

Printed in Germany.

ISBN 978-3-8440-8994-3

ISSN 1436-1175

Shaker Verlag GmbH • Am Langen Graben 15a • 52353 Düren

Phone: 0049/2421/99011-0 • Telefax: 0049/2421/99011-9

Internet: www.shaker.de • e-mail: info@shaker.de

Danksagung

Der Zusammenhalt und die Unterstützung, die ich während meiner Promotion an der Phoniatrie des Universitätsklinikums Erlangen in Zeiten der Covid-Pandemie erfuhr, sind für mich von großer Bedeutung. Denn trotz dieser von Einschränkungen geprägten Zeit, blicke ich auf eine sehr schöne und lehrreiche Promotion zurück. An dieser Stelle möchte ich denjenigen Menschen danken, die mich in diesem Lebensabschnitt unterstützten und die Zeit für mich so besonders gemacht haben.

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater und Betreuer Prof. Michael Döllinger bedanken. Besonders geschätzt habe ich seine loyale Einstellung gegenüber seinen Doktoranden. Er hat mich in jeder Hinsicht unterstützt und seine Tür stand mir immer offen, seien es fachliche Fragen, Rat, Feedback oder andere Anlässe gewesen. Zudem ließ er mir viel Spielraum, meine Ideen zu verwirklichen, hat aber auch darauf geachtet, dass ich nicht den Fokus verlor. In den mehr als drei Jahren an der Phoniatrie, habe ich daher von ihm nicht nur fachlich dazugelernt, sondern auch viel Menschliches mit auf den Weg bekommen.

Ein großer Dank gilt all meinen ehemaligen Kollegen an der Phoniatrie. In erster Linie Dr. Marion Semmler und Dr. Stefan Kniesburgs für ihre Expertise und Ratschläge. Aufgrund ihrer langjährigen Erfahrung in der Stimmforschung und an der Phoniatrie waren diese Gold wert. Zudem hat die Zusammenarbeit mit ihnen in zusätzlichen Projekten neben meiner Doktorarbeit, von *Fluoreszenz-* bis *Sängerstudie*, viel Spaß gemacht. Bedanken möchte ich mich bei Marion außerdem, dass sie immer wieder Teamevents initiierte. Auch dadurch wurden aus Kollegen Freunde. Besonderer Dank gilt Bernhard Jakubaš, der zeitgleich mit mir an der Phoniatrie zu promovieren begann. Er half mir nicht nur praktisch bei meinen Versuchen, sondern hatte auch immer ein offenes Ohr für mich. Danken möchte ich ebenfalls Reinhard Veltrup für seine Hilfe, nicht zuletzt für seine Lötkünste. Auch allen anderen Promovierenden und Postdocs möchte ich Danke sagen. Für ihre Hilfe, die gemeinsamen, unterhaltsamen Mittagspausen, Diskussionen und geselligen Abende. Großer Dank gilt auch dem perfekt eingespielten Team aus dem Biolabor: Dr. Olaf Wendler und Renate Schäfer. Sie standen mir mit Rat und Tat immer zur Seite. Auch den Ärzten der HNO-Klinik möchte ich für ihre fachliche und praktische Unterstützung danken, allen voran der Leiterin der Phoniatrie Prof. Anne Schützenberger. Für das Meistern der organisatorischen Angelegenheiten und die netten Pläuschchen zwischendurch, möchte ich mich bei Elisabeth Rentsch und Ute Katz bedanken. Und nicht zu vergessen, ein großes Dankeschön an Fani, die beste Putzfrau der Welt, für die vielen Aufmunterungen, Köstlichkeiten und für ihre stets gute Laune, der ich mich nicht entziehen konnte.

Des Weiteren möchte ich Prof. Ben Fabry und dem Lehrstuhl für Biophysik, insbesondere David Böhringer, für das Bereitstellen des Messaufbaus der Mikrorheologie und ihre Expertise danken. Dank gilt auch Prof. Wolfgang Peukert und dem Lehrstuhl für Feststoff- und Grenzflächenverfahrenstechnik, insbesondere Dr. Herbert Canziani und Nicolas Hesse für die Nutzung der Scherrheometer und den fachlichen Austausch. Ebenfalls möchte ich David A. Berry von der UCLA für seine Unterstützung danken.

Eine Promotion bringt natürlich auch Tiefen mit sich. Meine Frau Moni hat schlechte Laune und Zweifel immer unbeschönigt abbekommen, war aber immer für mich da und hat mich mental unterstützt sowie motiviert, mehr denn je in der Schlussphase. Ich bin überglücklich, sie an meiner Seite zu wissen, vielen Dank für alles. Besonderer Dank gilt auch meinen Eltern Gertraud und Valeriu. Sie stehen mir in allen Belangen bei und haben mir viel Bedeutendes mit auf meinen Weg gegeben. Unter anderem Durchhaltevermögen, die Naturverbundenheit und die Lust am Reisen. Letztere erleichterten mir, über kurz oder lang den Kopf abzuschalten, mich zu sammeln und zu entspannen. Bedanken möchte ich mich auch bei meiner Schwester Silvia und meinem Schwager Thorsten, die eine Schlüsselrolle in meiner bisherigen Laufbahn spielten. Ohne sie, hätte ich wohl nicht den Weg zum Studieren nach Erlangen gefunden und damit auch nicht an die Phoniatrie. Und zu guter Letzt möchte ich noch meinen Freunden danken, fürs Zuhören, den Austausch von Erfahrungen während der Promotion und das Mietfiebern am Ende.

Abstract

Speech is a crucial element of human interaction and presupposes a healthy voice. An impairment of the voice leads to profound limitations in the daily life of affected people. Despite its undeniable relevance, phonation has not yet been fully understood. Research on factors influencing the voice will help to understand the complexity of the phonatory process and will enhance the purposive treatment of voice disorders to improve the quality of life of concerned individuals.

Although laryngeal mucus serves the important tasks to hydrate and lubricate the oscillating vocal folds as boundary layer between the airflow from the lungs and the vocal fold tissue, there is a gap of knowledge regarding the effects of mucus composition and consistency on the phonatory process. The need of research on this topic is emphasized by several diseases, that alter mucus consistency and affect voice negatively. The work in this thesis contributes to fill this knowledge gap with regard to mucus consistency. For the first time, human laryngeal mucus of the vocal folds surface was investigated rheologically, which provides a data basis for the creation of laryngeal mucus substitutes within the range of physiological rheology. Using this data, synthetic mucus was created for *ex vivo* oscillation experiments. This enabled for the first time the systematic quantification of the influence of altered rheological properties of mucus on phonation.

For rheological characterization, human laryngeal mucus samples were collected in the clinical routine by experienced laryngologists from patients under general anesthesia. Adapting to the small amount of the samples, particle tracking microrheology was applied and revealed a large viscoelastic variety from predominantly liquid-like to gel-like mucus among the 19 investigated samples. This led to subdivision of the laryngeal mucus samples into three groups. A rheological analysis of five additional samples with sufficient volume, that was suitable for oscillatory shear rheometry, confirmed the viscoelastic character of laryngeal mucus.

The synthetic mucus samples were created with focus on the mean viscoelastic properties of the subdivided laryngeal mucus samples. In comparison to carbomer and hydroxyethyl cellulose, xanthan was chosen due to its highly adaptive viscoelastic properties and stability against salt and mucin. This preserves the laryngeal tissue properties by a physiological salt concentration and enables additional investigations on the impact of mucin on phonation, which is the most important ingredient of natural mucus. The mean viscoelasticities of the subdivided laryngeal mucus samples could be replicated by 0.1 %, 0.25 % and 0.75 % xanthan solutions very well. To investigate the impact of mucin in the synthetic mucus on phonation, an additional synthetic mucus

sample consisting of 0.25 % xanthan and 0.5% mucin was created.

For reproducible and controllable synthetic mucus application on the vocal folds, a paint spray gun was modified and integrated into an established experimental setup for *ex vivo* voice research. The method was successfully validated by measures of fluorescence and checking the impact of the spraying process on the rheology of the synthetic mucus samples.

The *ex vivo* oscillation experiments were performed on 24 porcine larynges, six for each synthetic mucus sample. Measurements were conducted first with saline solution as reference and then repeated with synthetic mucus. To investigate compensatory effects of the synthetic mucus on glottal closure insufficiency, a pre-phonatory gap was induced. Moreover, vocal fold adduction was varied to cause symmetric and asymmetric configurations. Overall, this resulted in 96 measurement runs on each larynx and 2304 datasets in total.

The comprehensive visual and statistical analyses of aerodynamic, glottal dynamic, subglottal pressure and acoustic parameters revealed no clear influence of the viscoelasticity of the synthetic mucus samples on the phonatory process. The only consistent trend was found for the sound pressure level and the fundamental frequencies of the vocal folds' oscillation, the subglottal pressure and acoustic signal, which decreased with increasing rigidity of the synthetic mucus samples of pure xanthan solutions. Clustering of the measurement data into complete and partially closed glottis, which was mainly associated with the measurements with induced pre-phonatory gap, did not reveal any compensatory effects of the synthetic mucus samples, with respect to parameters that were affected by glottis closure insufficiency. Overall, the oscillation experiments let assume that phonation is robust against the physiological viscoelastic range of mucus applied herein.

This thesis enhanced the realism of *ex vivo* experiments for voice research by integrating the influencing factor of laryngeal mucus in the experimental procedures. The findings contribute fundamentally to a comprehensive understanding on the role of mucus on phonation. Ultimately, the work performed laid the foundation for further research on pathological mucus conditions that will enable the exploration of therapeutic options.

Zusammenfassung

Die gesprochene Sprache ist das wichtigste Element menschlicher Interaktion und setzt eine gesunde Stimme voraus. Eine Beeinträchtigung der Stimme führt zu tiefgreifenden Einschränkungen im täglichen Leben der betroffenen Menschen. Trotz der unbestrittenen Relevanz einer gesunden Stimme, ist der Phonationsprozess noch nicht vollständig erforscht. Untersuchungen zu Einflussfaktoren auf die Stimme werden dazu beitragen, die Komplexität der Phonation besser zu verstehen und die gezielte Behandlung von Stimmstörungen weiterzuentwickeln. Dies wird sich letztendlich positiv auf die Lebensqualität von Menschen mit Stimmstörungen auswirken.

Trotz der wichtigen Aufgaben des laryngealen Mukus, der als Grenzschicht zwischen dem Luftstrom aus der Lunge und den schwingenden Stimmlippen agiert und das Stimmlippengewebe befeuchtet sowie schmiert, fehlen Kenntnisse über den Effekt seiner Zusammensetzung und Konsistenz auf die Phonation. Der Forschungsbedarf wird durch Erkrankungen bestärkt, die die Konsistenz des Mukus verändern und negative Auswirkungen auf die Stimme haben. Diese Dissertation wird dazu beitragen, die Wissenslücke über den Einfluss der Konsistenz von Mukus auf die Phonation zu schließen. Erstmals wurde menschlicher, laryngealer Mukus der Stimmlippenoberfläche rheologisch untersucht und eine Datengrundlage für die Herstellung von synthetischen Ersatzstoffen mit physiologischer Rheologie geschaffen. Die Daten ermöglichten die Herstellung von synthetischem Mukus für *ex vivo* Schwingungsversuche. Dies ermöglichte zum ersten Mal die systematische Quantifizierung des Einflusses der rheologischen Eigenschaften von Mukus auf die Phonation.

Laryngealer Mukus wurde von erfahrenen Laryngologen im klinischen Alltag von Patienten unter Vollnarkose entnommen. Aufgrund der geringen Probenmengen wurde Particle Tracking Microrheology zur Bestimmung der Rheologie von 19 Mukusproben angewendet. Dabei wurde eine große viskoelastische Bandbreite von überwiegend flüssigem bis hin zu gelartigem Mukus festgestellt. Dies führte zu einer Unterteilung der Mukusproben in drei Gruppen. Eine rheologische Analyse von fünf weiteren Proben, deren Menge für oszillatorische Tests mittels Scherrheometrie ausreichte, bestätigte den viskoelastischen Charakter des Mukus.

Der synthetische Mukus für die *ex vivo* Oszillationsexperimente wurde mit Fokus auf die mittleren viskoelastischen Eigenschaften der Mukusgruppen hergestellt. Xanthan überzeugte im Vergleich zu Carbomer und Hydroxyethylcellulose durch seine hochadaptiven, viskoelastischen Eigenschaften und Stabilität gegenüber Salz und Muzin. Eine physiologische Salzkonzentration im Mukusersatz ist wichtig, um einer Degeneration des Kehlkopfgewebes entgegenzuwirken, und der Zusatz von Muzin, das der

wichtigste Inhaltsstoff des natürlichen Mukus ist, diente zusätzlichen Untersuchungen zu dessen Auswirkung auf die Phonation. Die mittleren Viskoelastizitäten der gruppierten Mukusproben konnten mit 0.1 %, 0.25 % und 0.75 % Xanthanlösungen sehr gut nachgebildet werden. Der Einfluss von Muzin im synthetischen Mukus wurde anhand einer zusätzlichen synthetischen Mukusprobe aus 0.25 % Xanthan und 0.5 % Muzin untersucht.

Um den synthetischen Mukus reproduzierbar und kontrolliert auf den Stimmlippen zu applizieren, wurde eine Farbsprühpistole modifiziert und in einen etablierten *ex vivo* Versuchsaufbau der Stimmforschung integriert. Die Applikation und Haftung wurde erfolgreich durch Fluoreszenzmethoden validiert und ein Einfluss des Sprühprozesses auf den synthetischen Mukus und dessen Rheologie wurde ausgeschlossen.

Für die *ex vivo* Oszillationsexperimente wurden 24 Schweinekehlköpfe verwendet, sechs für jede synthetische Mukusprobe. Die Messungen wurden zunächst mit Kochsalzlösung als Referenz durchgeführt und dann mit synthetischem Mukus wiederholt. Um kompensatorische Effekte des synthetischen Mukus auf eine Glottisschlussinsuffizienz zu untersuchen, wurde ein prä-phonatorischer Glottisspalt erzeugt. Des Weiteren wurde die Adduktion der Stimmlippen variiert, um symmetrische und asymmetrische Konfigurationen zu generieren. Insgesamt ergaben sich damit 96 Messungen pro Kehlkopf und 2304 Datensätze insgesamt.

Trotz der umfassenden visuellen und statistischen Analysen der aerodynamischen Parameter, der dynamischen Schwingungsparameter der Stimmlippen, des subglottalen Drucks und der Akustik, waren die Auswirkungen der Viskoelastizität des synthetischen Mukus gering. Der einzige konsistente Trend wurde für den Schalldruckpegel, die Grundfrequenzen der Stimmlippenschwingung, dem subglottalen Drucksignal und dem akustischen Signal festgestellt, die mit zunehmender Zähflüssigkeit des synthetischen Mukus aus purer Xanthanlösung abnahmen. Eine Gruppierung der Messdaten in vollständigen und teilweisen Glottisschluss, deren Einteilung überwiegend mit dem erzeugten prä-phonatorischen Glottisspalt übereinstimmte, ergab keine kompensatorischen Effekte des synthetischen Mukus auf Parameter, die durch die Glottisschlussinsuffizienz beeinflusst wurden. Insgesamt lassen die Schwingungsversuche vermuten, dass der Phonationsprozess gegenüber dem hier verwendeten physiologischen, viskoelastischen Bereich des laryngealen Mukus robust ist.

Diese Arbeit verbesserte den Realitätsgrad der Phonationsexperimente in der *ex vivo* Stimmforschung, indem der Einflussfaktor Mukus in die experimentellen Methoden einbezogen wurde. Die Ergebnisse tragen grundlegend zu einem umfassenden Verständnis der Rolle des Mukus auf die Phonation bei. Schließlich wurde mit dieser Arbeit der Grundstein für weitere Untersuchungen zu pathologischem Mukus gelegt, die zur

Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten von Stimmproblemen bei einer veränderten Mukuskonsistenz beitragen werden.

Contents

Nomenclature	xvii
1 Introduction	1
2 Fundamentals	5
2.1 Larynx anatomy and human voice production	5
2.1.1 Laryngeal structures involved in the phonatory process	5
2.1.2 Morphology of the vocal folds	6
2.1.3 Principle of human phonation	8
2.2 Human mucus	8
2.2.1 Role of mucus in the body and larynx	8
2.2.2 Composition and chemical structure of mucus	9
2.3 Basics of rheometry and rheology	9
2.3.1 Shear rheometry and rheology	10
2.3.2 Particle tracking microrheology	17
3 Rheology of human laryngeal mucus	23
3.1 Research on the rheology of human mucus	23
3.2 Mucus samples	25
3.2.1 Collection of laryngeal mucus samples	25
3.2.2 Quality and properties of the mucus samples	26
3.3 Measurement procedures	29
3.3.1 Particle tracking microrheology	29
3.3.2 Oscillatory shear rheometry	31
3.4 Viscoelasticity of human laryngeal mucus	31
3.4.1 Viscoelasticity determined by PTM	31
3.4.2 Viscoelasticity determined by OSR	41
3.5 Summary of the rheological properties of mucus	43

4	Creation of synthetic mucus with physiological viscoelasticity	45
4.1	Mucus substitutes in current research	45
4.2	Rheology of synthetic mucus candidates	46
4.2.1	Carbomer	47
4.2.2	Hydroxyethyl cellulose	48
4.2.3	Xanthan	49
4.3	Summary of the creation of synthetic mucus	54
5	<i>Ex vivo</i> phonation experiments	55
5.1	Experimental setup for porcine larynges	55
5.1.1	Preparation of the porcine cadaver larynges	56
5.1.2	Automated measurement setup	57
5.1.3	Mucus application	59
5.2	Measurement procedure	61
5.3	Data analysis	63
5.3.1	Aerodynamic parameters	63
5.3.2	Glottal dynamic parameters	65
5.3.3	Subglottal pressure and acoustic parameters	66
5.3.4	Data exclusion	66
6	Impact of mucus rheology and mucins on phonation	69
6.1	Research on the phonatory process	70
6.2	Study design	70
6.3	General phonation parameters	71
6.4	Impact of rheology on phonatory parameters	72
6.4.1	Aerodynamic parameters	73
6.4.2	Glottal dynamic parameters	75
6.4.3	Subglottal pressure parameters	80
6.4.4	Acoustic parameters	83
6.5	Impact of mucins on phonatory parameters	85
6.6	Summary of the impact of rheology and mucins	87
7	Clustering and pairwise analysis of the measurement data	89
7.1	Clustering of the measurement data	89
7.2	Graphic analysis of the phonatory parameters	90
7.2.1	Aerodynamic parameters	90
7.2.2	Glottal dynamic parameters	93
7.2.3	Subglottal pressure parameters	97

7.2.4	Acoustic parameters	100
7.3	Statistical analysis by pairwise tests	103
7.3.1	Impact of glottis closure	103
7.3.2	Glottis closure dependent influence of rheology	106
7.4	Summary of the clustered data analysis	109
8	Conclusion and Outlook	111
8.1	Project status	111
8.2	Project limitations and outlook	114
8.2.1	Investigations on human laryngeal mucus	114
8.2.2	Experimental advances	115
8.2.3	Therapeutical options	116
8.3	Impact of the project	116
	Bibliography	117
	A Further information on particle tracking microrheology	133
	B Further information on GAT and the GAW	135
	C Additional data	141
	List of Figures	142
	List of Tables	154