

Aus dem Institut für Veterinär-Anatomie
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

**Etablierung eines isoliert druckkonstant perfundierten Ex-vivo-Modells des equinen
Larynx**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Sven Otto, geb. Kleier
aus Rendsburg

Leipzig, 2018

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Walther Brehm

Betreuer: Prof. Dr. Christoph K.W. Mülling

Gutachter: Prof. Dr. Christoph K.W. Mülling, Veterinär-Anatomisches Institut,
Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig

Prof. Dr. Stefan Dhein, Fachdienst Gesundheit
Landratsamt Altenburger Land

Tag der Verteidigung: 27.02.2018

Inhaltsverzeichnis

Inhalt	Seite
1 Einleitung	1
2 Literaturübersicht	3
2.1 Anatomie des equinen Larynx	3
2.1.1 Lage.....	3
2.1.2 Aufbau.....	3
2.1.3 Knorpel	4
2.1.4 Muskeln.....	4
2.1.5 Innervation	6
2.1.6 Blutversorgung.....	7
2.1.7 Funktion	8
2.2 Isolierte Organperfusion	9
2.2.1 Ex-vivo-Organmodelle	9
2.2.2 Perfusionslösungen	11
2.2.3 Ex-vivo-Modelle des Larynx	12
2.2.4 Vitalitätsparameter	13
3 Tiere, Material und Methoden.....	16
3.1 Tiere	16
3.2 Material	17
3.2.1.1 Chemikalien, Lösungen	17
3.2.1.2 Zubehör für die Perfusion.....	19
3.3 Methoden	21
3.3.1 Entnahme des Kehlkopfes.....	21
3.3.2 Versuchsaufbau	22
3.3.3 Organperfusion im Labor.....	23
3.3.4 Vorversuche	24
3.3.4.1 Vorversuche Phase 1.....	24
3.3.4.2 Vorversuche Phase 2.....	25
3.3.5 Hauptversuch	27
3.3.6 Vitalitätstests.....	28

Inhaltsverzeichnis

3.3.6.1	Test der Kontraktilität des CAD.....	28
3.3.6.2	Test der myogenen Autoregulation	30
3.3.6.3	Perfusion unter Noradrenalinzugabe	30
3.3.6.4	Perfusion unter Nitroprussidgabe	30
3.3.6.5	Perfusion unter Papaverinzugabe	31
3.3.6.6	Bestimmung von Laktat und Laktat-Dehydrogenase.....	31
3.3.6.7	Test der Funktionalität des CAD.....	31
3.3.6.8	Feucht-/Trockengewicht.....	32
3.4	Statistik.....	32
4	Ergebnisse.....	33
4.1	Ergebnisse der Vorversuche Phase 1.....	33
4.2	Ergebnisse der Vorversuche Phase 2.....	34
4.2.1	Ergebnisse der Vorversuche Phase 2 Gruppe 1	34
4.2.2	Ergebnisse der Vorversuche Phase 2 Gruppe 2.....	36
4.2.3	Ergebnisse der Vorversuche Phase 2 Gruppe 3.....	38
4.3	Ergebnisse des Hauptversuchs	44
4.3.1	Test der Kontraktilität des CAD.....	45
4.3.2	Test der myogenen Autoregulation	46
4.3.3	Perfusion unter Zugabe von Noradrenalin / Nitroprussid / Papaverin	47
4.3.4	Laktat und Laktat-Dehydrogenase	49
4.3.5	Test der Funktionalität des CAD.....	51
4.3.6	Feucht- / Trockengewicht.....	52
4.3.7	Zeitdauer.....	53
5	Diskussion.....	55
5.1	Etablierung des Perfusionskreislaufs.....	55
5.2	Vitalitätsparameter	56
5.2.1	Kontraktilität des CAD.....	57
5.2.2	Myogene Autoregulation.....	57
5.2.3	Noradrenalin	60
5.2.4	Nitroprussid	60

Inhaltsverzeichnis

5.2.5	Papaverin.....	62
5.2.6	Laktat und Laktat-Dehydrogenase	64
5.2.7	Funktionalität des CAD	65
5.2.8	Feucht- / Trockengewicht	68
5.3	Fazit	69
5.4	Ausblick	70
6	Zusammenfassung.....	72
7	Summary	74
8	Literaturverzeichnis.....	76

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen

A.	Arteria
Art.	Articulatio
Abb.	Abbildung
Appl	Applikationsart
Bol	Bolus
bzw.	beziehungsweise
CAD	Musculus cricoarytaenoideus dorsalis
cm	Zentimeter
et al.	et alii
EV	Euthanasievariante
evtl.	eventuell
F	French
FM	Flüssigkeitsmenge
g	Gramm
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde
Hz	Hertz
IE	Internationale Einheiten
IMP	Intramuskulärer Druck
i. v.	intravenös
KCl	Kaliumchlorid
Kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
kont	kontinuierlich
Konz	Konzentration
kPa	Kilopascal
KR	konstante Rate
l	Liter
m	Meter
M.	Musculus
mA	Milliampere
mH ₂ O	Meter Wassersäule
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule

Abkürzungsverzeichnis

mmol	Millimol
N.	Nervus
NA	Noradrenalin
NO	Nitroprussid
PF	Perfusionsfluss
Proc.	Processus
R.	Ramus
RLN	<i>Recurrent laryngeal neuropathy</i>
s	Sekunde
SD	Standardabweichung
Stim	Stimulation
Tab.	Tabelle
U	Unit
u. a.	unter anderem
v. a.	vor allem
VE	vollentsalzt
z. B.	zum Beispiel

1 Einleitung

Das Kehlkopfpfeifen ist eine typische Erkrankung der oberen Atemwege des Pferdes. Im englischen Sprachgebrauch wird heute der Begriff *recurrent laryngeal neuropathy* (RLN) verwendet. Er beschreibt die meist einseitige Parese bis hin zur Paralyse der intrinsischen Muskulatur des Kehlkopfes (BOYKO et al. 2014). Ursächlich dafür ist eine distale Axonopathie des Nervus (N.) laryngeus recurrens, der am Kehlkopf in den N. laryngeus caudalis übergeht (DUNCAN et al. 1974). Die Pathogenese ist bis heute nicht aufgeklärt, obwohl es zahlreiche Hypothesen und intensive Untersuchungen dazu gibt (CAHILL und GOULDEN 1987). Diese distale Axonopathie führt zu einer neurogenen Atrophie der betroffenen Muskulatur (DUNCAN et al. 1974). Dadurch kann die Abduktorfunktion des Musculus (M.) cricoarytaenoideus dorsalis (CAD) nicht mehr aufrechterhalten werden (HARRISON et al. 1992), was zu einem allmählichen Vorfall des Gießkannenknorpels in das Lumen des Kehlkopfes führt. Dies führt zur Ausbildung eines inspiratorischen Atemgeräusches und einer Leistungsintoleranz betroffener Pferde (DAVENPORT-GOODALL und PARENTE 2003).

In der Literatur werden sehr unterschiedliche Zahlen für die Prävalenz der RLN angegeben. Wie von DUCHARME et al. (2010) zusammengefasst, reicht die Spannweite bei Zugpferden von 17 bis 42 %, bei Warmblutpferden von 1,2 bis 41 % und bei Vollblutpferden von 3 bis 8,6 %. Zahlreiche chirurgische Behandlungsoptionen wie Arytaenoidektomie, Ventrikulektomie, Reinnervation des Larynx oder Laryngoplastik werden in der Literatur beschrieben (ROBERTZ 2008). Die bevorzugte Methode bei Sport- und Rennpferden ist die Laryngoplastik (ROSSIGNOL et al. 2015). Moderne Therapieansätze zielen nicht darauf ab, die Symptome der RLN zu behandeln, sondern setzen an ihrer Entstehung an. Dazu wird die sogenannte Funktionelle Elektrostimulation (FES) verwendet, bei der entweder der betreffende Nerv selbst oder der von diesem Nerv versorgte Muskel elektrisch stimuliert werden. Diese Methode wird bereits erfolgreich beim Pferd eingesetzt (CHEETHAM et al. 2011, CHEETHAM et al. 2015). Um solche Behandlungsmethoden zu optimieren, können Ex-vivo-Modelle eingesetzt werden. Hierzu existiert eine Studie von MARTINI et al. (2012), die ein flusskonstant perfundiertes Ex-vivo-Modell des equinen Larynx verwendet, um die elektrische Feldverteilung im CAD während der Stimulation durch zwei vierpolige Stimulationselektroden zu messen. Solche Messungen können helfen, die Stimationsparameter der FES zu optimieren und somit das Ergebnis dieser Behandlungsmethode zu verbessern. Allerdings wurde die Studie nur an zwei Pferden durchgeführt, und es kam zu einer deutlichen Ödembildung im perfundierten Larynx am Ende der Perfusion. Darüber hinaus sind für das Pferd bisher keine weiteren perfundierten Ex-vivo-Modelle beschrieben.

Einleitung

Ziel der hier vorliegenden Arbeit war daher die Etablierung eines druckkonstant perfundierten Ex-vivo-Modells des equinen Larynx. Es sollte ein relativ einfacher und kostengünstiger Perfusionskreislauf entwickelt werden, der eine Grundlage für weiterführende Untersuchungen im Bereich FES am equinen Larynx bildet. Die Vitalität des frisch entnommenen und dann perfundierten Kehlkopfes sollte durch verschiedene Vitalitätstests geprüft werden.

2 Literaturübersicht

2.1 Anatomie des equinen Larynx

2.1.1 Lage

Der Kehlkopf liegt in der kranioventralen Region des Halses. Er ist beim Pferd zwischen den Unterkieferästen im kaudalen Teil der Regio intermandibularis lokalisiert (GOODY und GOODY 2004) und stellt die Verbindung zwischen Pharynx und Trachea dar. Die Anbindung an den Schädel erfolgt indirekt über das Zungenbein. Dieses ist über die Articulatio (Art.) thyrohyoidea an den Kehlkopf und über die Art. temporohyoidea an das Os temporale gebunden.

2.1.2 Aufbau

Der Larynx setzt sich aus mehreren unterschiedlichen Komponenten zusammen. Er besteht aus Knorpeln und Muskeln, die über Bänder und Gelenke sowohl untereinander als auch mit dem Os hyoideum und der Trachea in Verbindung stehen.

Das Cavum laryngis wird in der Literatur mit einer Sanduhrform beschrieben (KÖLLE et al. 2013, WAIBL 2004). Es lässt sich von rostral nach kaudal in die Abschnitte Vestibulum laryngis (Kehlkopfvorhof), Glottis (Stimmapparat) und Cavum infraglotticum (Ausgangsraum) unterteilen. Den Eingang stellt der Aditus laryngis dar (DYCE et al. 2010). Im Vestibulum laryngis ist bei Pferd und Schwein ventral der Recessus laryngis medianus lokalisiert (WAIBL 2004). An seinem Kaudalende befindet sich als Besonderheit bei Pferd, Hund und Schwein beidseitig seitlich der Zugang zum Ventriculus laryngis (SALOMON 2008), dessen Eingang an den Seiten durch die Plica vestibularis und die Plica vocalis begrenzt wird (KÖNIG und LIEBICH 2012). Hier befindet sich die Glottis, deren charakteristisches Merkmal die Rima glottidis (Stimmritze) mit ihrer Pars intermembranacea und Pars intercartilaginea ist. Das sich daran anschließende weite Cavum infraglotticum bildet den Übergang vom Kehlkopf in die Luftröhre.

Der Kehlkopf ist von innen mit zwei verschiedenen Arten von Schleimhaut ausgekleidet. An Stellen, die stark mechanisch beansprucht werden (Vestibulum laryngis und Rima glottidis) zeigt sich ein mehrschichtiges Plattenepithel (WAIBL 2004). Die übrigen Kehlkopfanteile sind ebenso wie die Ventriculi laryngei mit respiratorischer Schleimhaut ausgekleidet, die durch mehrreihiges Flimmerepithel mit darin enthaltenen Becherzellen charakterisiert ist (KÖLLE et al. 2013).

2.1.3 Knorpel

Drei unpaare und ein paariger Knorpel bilden das knorpelige Skelett des Kehlkopfes. Die aus elastischem Knorpel bestehende *Cartilago epiglottica* (Kehldeckelknorpel) kippt beim Schluckakt nach kaudal und verschließt nahezu vollständig den Eingang zum Kehlkopf. Sie besteht aus einem *Petiolus* und einer Platte. Als Besonderheit trägt sie beim Pferd beidseitig einen *Processus cuneiformis* an ihrem *Petiolus epiglotticus* (WAIBL 2004). Die *Cartilago thyroidea* (Schildknorpel) besteht aus hyalinem Knorpel. Über die *Art. thyrohyoidea* ist sie gelenkig mit dem *Thyrohyoideum* des *Os hyoideum* verbunden. Sie formt die seitliche Begrenzung und den Boden des Kehlkopfes. Die *Cartilago thyroidea* besteht aus zwei seitlichen *Laminae*, die am Boden miteinander zu einem Korpus verschmolzen sind. Als Besonderheit weist der Korpus beim Pferd eine sehr deutlich ausgeprägte *Incisura thyroidea caudalis* auf (KÖNIG und LIEBICH 2012), die mit dem *Ligamentum cricothyroideum* verschlossen ist (SALOMON 2008). Weiterhin besitzt die *Cartilago thyroidea* jeweils ein *Cornu rostrale* und ein *Cornu caudale*. Zwischen der *Lamina* und dem *Cornu rostrale* zeigt sich die *Fissura thyroidea*, die bei Pferd und Wiederkäuer durch Anteile der *Membrana thyrohyoidea* zum *Foramen thyroideum* verschlossen wird (SALOMON 2008). Die *Cartilago thyroidea* ist zusätzlich über die *Art. cricothyroidea* mit der ebenfalls aus hyalinem Knorpel bestehenden *Cartilago cricoidea* (Ringknorpel) verbunden. Diese hat die Form eines Siegelringes und besteht aus einer *Lamina cartilaginosa cricoidea* und einem *Arcus cartilaginosa cricoidea*. Die *Lamina* trägt median eine Leiste, die *Crista mediana*. Die beidseitig gelegene *Facies articularis thyroidea* artikuliert mit der *Facies articularis cricoidea* der *Cartilago thyroidea*. Im Gegensatz zu den drei zuvor genannten Knorpeln sind die *Cartilaginae arytaenoideae* (Gießkannenknorpel) paarig angelegt. Sie bestehen gleichfalls aus hyalinem Knorpel und weisen lateral den *Processus (Proc.) muscularis* auf, der den Ansatz für den einzigen Stimmritzenweiterer des Kehlkopfes, den *M. cricoarytaenoideus dorsalis*, bietet. Ventral befindet sich der *Proc. vocalis*, der im Gegensatz zum restlichen Gießkannenknorpel aus elastischem Knorpel besteht (WAIBL 2004). Rostral gelegen und nach dorsal weisend ist der *Proc. corniculatus* lokalisiert. Die Gießkannenknorpel können durch die an ihnen ansetzenden Muskeln bei der Atmung und Stimmbildung in ihrer Position verändert werden.

2.1.4 Muskeln

Als Kehlkopfeigenmuskeln werden solche Muskeln am Kehlkopf bezeichnet, welche die Position der Kehlkopfknorpel zueinander verändern können (SALOMON 2008). Dabei handelt es sich um quergestreifte Muskulatur (WAIBL 2004). Auf die weiteren Muskeln, die den Kehlkopf mit dem Pharynx, dem *Os hyoideum* und dem Sternum verbinden, wird an dieser Stelle nicht weiter eingegangen. Die Muskelgruppe der Kehlkopfeigenmuskeln kann

ihrer Funktion nach in Stimmritzenverenger und Stimmritzenweiterer unterteilt werden (WAIBL 2004). Zu den Stimmritzenverengern gehören der *M. cricoarytaenoideus lateralis*, der *M. arytaenoideus transversus*, der *M. cricothyroideus* und der *M. thyroarytaenoideus*, der bei Hund und Pferd als Besonderheit noch einmal in zwei separate Muskeln unterteilt ist (DYCE et al. 2010, WAIBL 2004). Dies sind der rostral gelegene *M. ventricularis*, der in der *Plica vestibularis* verläuft, und der weiter kaudal gelegene *M. vocalis*, der in der *Plica vocalis* verläuft. Beim Pferd wird in der Literatur zusätzlich noch der *M. thyroarytaenoideus accessorius* beschrieben, der bei der Stimmritzenverengung unterstützend wirkt (SALOMON 2008). Der *M. cricothyroideus* hat seinen Ursprung an der *Cartilago cricoidea* und zieht zur *Cartilago thyroidea*. Seine Innervation weist eine Besonderheit auf. Er wird im Gegensatz zu den restlichen Stimmritzenverengern nicht durch den *N. laryngeus caudalis*, sondern durch den *N. laryngeus cranialis* innerviert. Der *M. cricoarytaenoideus lateralis* zieht kraniallateral von der *Cartilago cricoidea* zum *Proc. muscularis* der *Cartilago arytaenoidea*. Der *M. arytaenoideus transversus* hat seinen Ursprung am *Proc. muscularis* der *Cartilago arytaenoidea* und zieht nach medial, wo er sich mit seinem kontralateralen Muskel vereinigt. All diesen Stimmritzenverengern steht lediglich ein einziger Stimmritzenweiterer gegenüber, der *M. cricoarytaenoideus dorsalis*. Dieser besteht beim Hund aus drei verschiedenen Anteilen: einem horizontalen, einem vertikalen und einem schrägen (SANDERS et al. 1993). In der Humanmedizin wird der CAD als *M. cricoarytaenoideus posterior* bezeichnet (PAULSEN und WASCHKE 2010) und besteht aus zwei funktionalen Anteilen (SANDERS et al. 1994). Beim Pferd hingegen konnten CHEETHAM et al. (2008) zeigen, dass er aus einem lateralen und einem medialen Anteil besteht. Der CAD liegt der *Lamina cartilaginosa cricoidea* dorsal auf und inseriert am *Proc. muscularis* der *Cartilago arytaenoidea* (DYCE et al. 2010). Bei seiner Kontraktion verlagert er den *Proc. vocalis* nach lateral, was eine Öffnung der Stimmritze zur Folge hat. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass der laterale Anteil des CAD hauptverantwortlich für die Abduktion des Gießkannenknorpels ist (PERKINS et al. 2010).

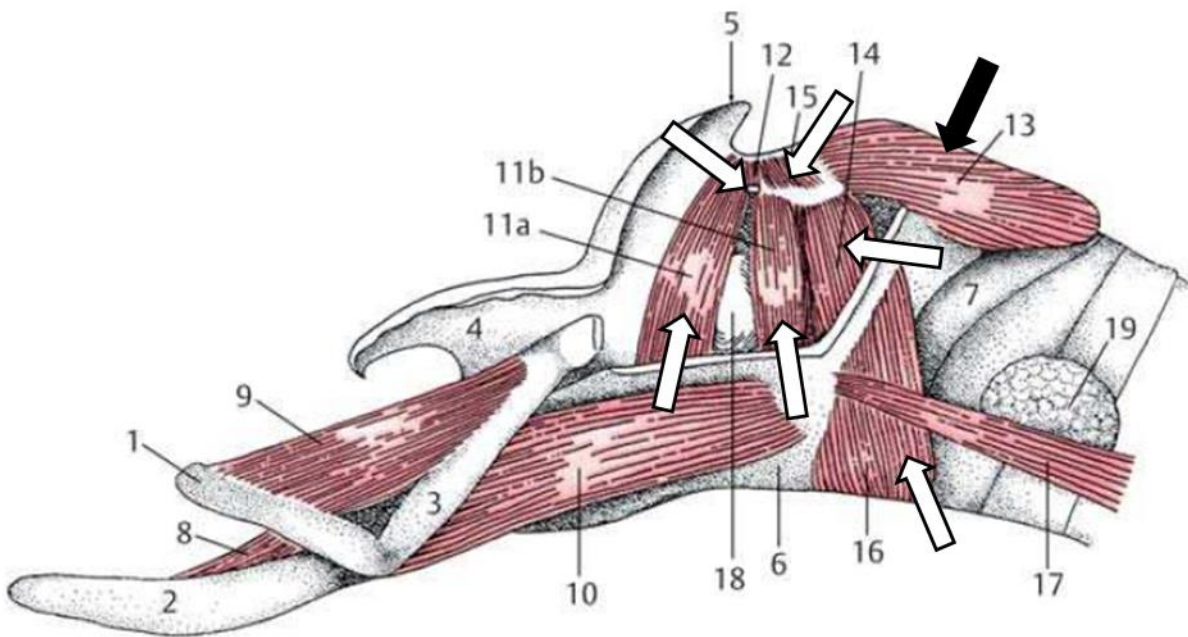


Abb. 2-1 Schematische Ansicht des equinen Larynx von lateral.

Dargestellt sind die Muskeln des equinen Larynx. Die Stimmritzenverenger sind mit einem weißen Pfeil gekennzeichnet. Der einzige Stimmritzenverenger ist mit einem schwarzen Pfeil markiert. 1. Ceratohyoideum, 2. Proc. lingualis, 3. Thyrohyoideum, 4. Epiglottis, 5. Proc. corniculatus, 6. Cartilago thyroidea (teilweise abpräpariert), 7. Cartilago cricoidea, 8. M. hyoepiglotticus, 9. M. ceratohyoideus, 10. M. thyrohyoideus, 11. M. thyroarytaenoideus, 11a. M. ventricularis, 11b. M. vocalis, 12. M. thyroarytaenoideus accessorius, 13. M. cricoarytaenoideus dorsalis, 14. M. cricoarytaenoideus lateralis, 15. M. arytaenoideus transversus, 16. M. cricothyroideus, 17. M. sternothyroideus, 18. Ventriculus laryngis, 19. Glandula thyroidea. Abb. modifiziert nach SALOMON (2008).

2.1.5 Innervation

Die Innervation des equinen Kehlkopfes erfolgt über Äste, die dem N. vagus, dem X. Gehirnnerven, entspringen. Von kranial tritt der N. laryngeus cranialis an den Kehlkopf heran, während der N. laryngeus recurrens als N. laryngeus caudalis von kaudal an den Kehlkopf zieht. Der N. laryngeus cranialis spaltet sich in einen Ramus (R.) internus und einen R. externus auf. Der R. internus tritt durch das Foramen thyroideum und innerviert die Kehlkopfschleimhaut kranial bis zur Rima glottis. Der R. externus innerviert hingegen den M. cricothyroideus (QUINLAN et al. 1982). Zusätzlich entlässt der R. internus des N. laryngeus cranialis noch einen R. communicans. Dieser vereinigt sich mit dem N. laryngeus recurrens (QUINLAN et al. 1982). Die Kehlkopfschleimhaut kaudal der Rima glottis und die restlichen Kehlkopfeigenmuskeln werden vom N. laryngeus caudalis innerviert (KÖLLE et al. 2013),

der das Ende des N. laryngeus recurrens darstellt. Der rechte N. laryngeus recurrens zweigt etwa in Höhe des ersten Interkostalraumes vom N. vagus ab und schlingt sich dann um die rechte Arteria (A.) subclavia, bevor er mit der Trachea Richtung Kehlkopf zurückzieht (QUINLAN et al. 1982). Der linke N. laryngeus recurrens spaltet sich etwa auf Herzhöhe vom N. vagus ab und schlägt sich um die Aorta und das Ligamentum arteriosum, bevor er analog zum rechten N. laryngeus recurrens zum Larynx zurückkehrt. CHEETHAM et al. (2008) zeigten in ihrer Arbeit mit Hilfe der Sihler Färbung, dass der N. laryngeus caudalis zwei Äste in den CAD abgibt, die etwa in der Mitte der Längsachse von ventral in die beiden Anteile des Muskels eintreten.

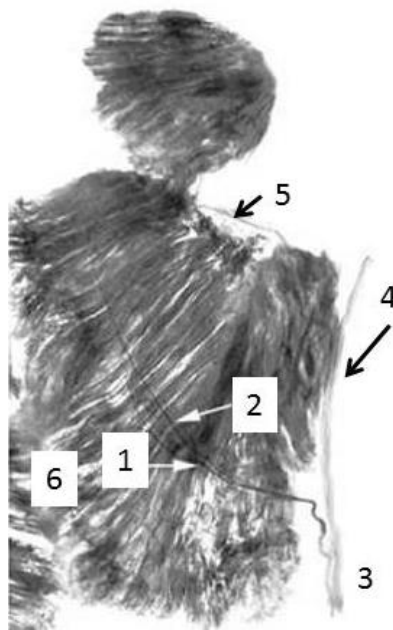


Abb. 2-2 Sihler Färbung des rechten CAD.

In einer dorsalen Ansicht ist die Aufzweigung des rechten N. laryngeus caudalis (3) dargestellt. Er gibt zwei Hauptäste in den CAD ab (1, 2), bevor er weitere Äste zum M. cricoarytaenoideus lateralis (4) und M. arytaenoideus transversus (5) abgibt. Der CAD hat seinen Ursprung an der Crista mediana (6) der Lamina cartilaginosa cricoideae und zieht zum Proc. muscularis der Cartilago arytaenoidea (nicht dargestellt). Abb. modifiziert nach CHEETHAM et al. (2008).

2.1.6 Blutversorgung

Der Kehlkopf des Pferdes wird über kraniale und kaudale Gefäße mit arteriellem Blut versorgt. Die A. laryngea cranialis zweigt von der A. carotis communis ab und tritt durch das Foramen thyroideum der Cartilago thyroidea an den Kehlkopf heran. Die kaudale Blutversorgung des Kehlkopfes erfolgt im kaudodorsalen Bereich über Äste der A. pharyngea ascendens und im kaudoventralen Bereich über den R. laryngeus der A. thyroidea cranialis

(KÖLLE et al. 2013). Der venöse Abfluss des Blutes aus dem Larynx erfolgt über kaudal gelegene Venen, jedoch nicht über kraniale Venen (KÖLLE et al. 2013).

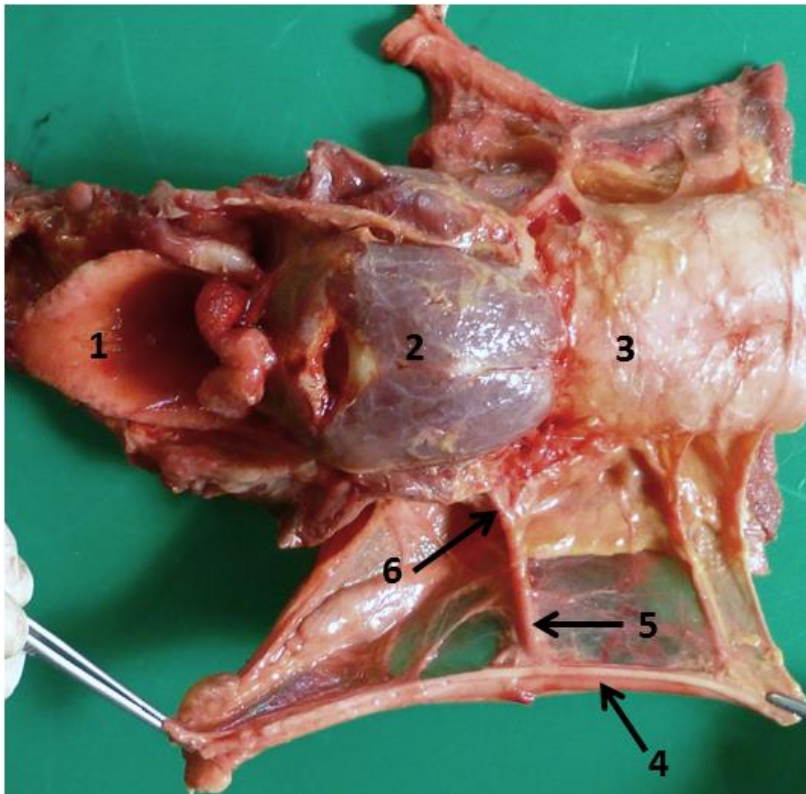


Abb. 2-3 Gefäßversorgung des Larynx.

In der Dorsalansicht eines frisch entnommenen und präparierten equinen Larynx ist die Gefäßversorgung des Larynx dargestellt. (1) Epiglottis, (2) M. cricoarytaenoideus dorsalis, (3) Trachea, (4) A. carotis communis (5) A. thyroidea cranialis, (6) R. laryngeus. Nicht dargestellt ist die A. laryngea cranialis.

2.1.7 Funktion

Der Kehlkopf erfüllt zwei Hauptfunktionen. Zum einen dient er der Phonation (DYCE et al. 2010). Dies geschieht während der Expiration, wobei der M. cricothyroideus und der M. vocalis die Spannung der Stimmfalten regulieren. Außerdem wird die Tonhöhe zusätzlich über die Dicke und Länge der Stimmfalten beeinflusst (DYCE et al. 2010). Die weitaus wichtigere Funktion aber ist der Schutz der unteren Atemwege vor dem Eindringen von Nahrung, Flüssigkeiten und Fremdkörpern (BRADLEY 1923) und damit verbunden die Beteiligung des Larynx am Schluckakt. Beim Schluckakt wird der Kehlkopf durch Muskelzug nach rostral gegen den angespannten Zungengrund bewegt, wodurch die Epiglottis nach kaudal kippt und sich dadurch vor den Eingang des Kehlkopfes legt. Parallel dazu erfolgt durch Kontraktion der Stimmritzenverenger ein Verschluss der Rima glottidis.

2.2 Isolierte Organperfusion

2.2.1 Ex-vivo-Organmodelle

In Ex-vivo-Modellen werden einzelne Organe oder Anteile von Organen aus dem Tier isoliert und für spezifische Untersuchungen genutzt. Der Einsatz von Ex-vivo-Modellen bringt eine ganze Reihe von Vorteilen mit sich. Schon Ende der 1950er Jahre wurde das sogenannte 3R-Konzept (*Reduce, Refine, Replace*) definiert und veröffentlicht, um damit die Anzahl von Tierversuchen aber auch die Belastung der einzelnen Versuchstiere zu reduzieren (RUSSELL und BURCH 1959). Auch Ex-vivo-Modelle können maßgeblich dazu beitragen, dieses Konzept umzusetzen, indem z. B. Tierversuche komplett durch ein Ex-vivo-Modell ersetzt werden. BARKER et al. (2005) sprechen bei der Verwendung von Ex-vivo-Reperusionsmodellen von einer Reduktion der Versuchstiere um 50 %. Weiterhin ist bei Ex-vivo-Modellen von Vorteil, dass die Organe vom Gesamtorganismus isoliert werden und somit frei von systemischen Einflüssen sind (NELSON et al. 2014). Dadurch können spezifische Vorgänge oder Fragestellungen präziser erforscht werden, gerade solche, die am lebendem Tier sonst nicht bearbeitet werden können (WRIGHT et al. 2013). Darüber hinaus lassen sich die Versuchsbedingungen besser kontrollieren und die Variabilität der Ergebnisse reduzieren (BARKER et al. 2005, WÜSTENBERG 2006). Der fehlende Einfluss durch den Gesamtorganismus kann in manchen Fragestellungen aber auch ein Nachteil sein. Da Tier und Mensch teilweise einen sehr ähnlichen bis gleichen anatomischen Bauplan und physiologische Parameter aufweisen, können ex vivo gewonnene Informationen nach kritischer Evaluierung direkt in einen klinischen Versuch translatiert werden (NELSON et al. 2014). Ein weiterer Vorteil von Ex-vivo-Modellen ist, dass sie je nach Studiendesign einfacher zu realisieren und kostengünstiger sind als Tierversuche (BARKER et al. 2005, DROUTSAS et al. 2014). Dies ist allerdings davon abhängig, ob ein Kleintier- oder Großtiermodell verwendet wird, da Großtiermodelle meist um ein Vielfaches teurer sind (NELSON et al. 2014). Die benötigten Organe oder Gewebe sind oft leicht zugänglich und in großen Stückzahlen verfügbar (PESCINA et al. 2015), wenn sie z. B. im Rahmen des Schlachtungsprozesses von Nutztieren anfallen. Ex-vivo-Modelle können außerdem zur Aus- und Weiterbildung von Ärzten und Tierärzten verwendet werden (PHAM et al. 2014).

Für Ex-vivo-Modelle kommen die verschiedensten Organe und Spezies zum Einsatz. Eines der bekanntesten Ex-vivo-Modelle ist das isolierte Herz, das Oskar Langendorff 1895 erstmalig beschrieb (LANGENDORFF 1895). Einen weiteren Meilenstein stellt die isoliert perfundierte Lunge dar (SANCHEZ et al. 2012). Andere Organe, die für Ex-vivo-Untersuchungen verwendet werden, sind beispielsweise Niere (KRÖSSIN 2007), Leber (NASSAR et al. 2015, STADLER et al. 2005), Euter, Haut (GROSSE-SIESTRUP et al. 2002), Darm (ESCHE 2007) oder distale Gliedmaßen (WÜSTENBERG 2006).

Für bestimmte Fragestellungen ist es wichtig, das isolierte Organ mit Hilfe einer speziellen Perfusionslösung zu perfundieren und ihm damit Sauerstoff und Nährstoffe zuzuführen. Dadurch können physiologische und auch pharmakologische Vorgänge am isolierten Organ betrachtet werden. Diese Technik der isolierten Organperfusion findet heutzutage eine Vielzahl von Anwendungsmöglichkeiten (ESCHE 2007, GROSSE-SIESTRUP et al. 2002, STADLER et al. 2005, WÜSTENBERG 2006). Die beiden Stellgrößen Perfusionsdruck und Perfusionsfluss spielen hierbei eine wichtige Rolle. Wendet man das Ohm'sche Gesetz an, so kann man den Strömungswiderstand R in den perfundierten Gefäßen durch folgende Formel bestimmen: $R = \Delta P / I$ (ΔP = Druckdifferenz, I = Perfusionsfluss). Nimmt man nun das Gesetz von Hagen-Poiseuille zur Hilfe, so kann der Strömungswiderstand mit der Formel: $R = 8\eta l / \pi r^4$ berechnet werden (η = Viskosität der Perfusionsflüssigkeit, l = Länge des Gefäßes, r = Innenradius des Gefäßes) (BUSSE 2007). Daraus ist ersichtlich, dass jede Änderung des Gefäßradius, z. B. eine Vasokonstriktion erzeugt durch Applikation einer vasoaktiven Substanz, einen direkten Einfluss auf den Gefäßwiderstand hat, da der Gefäßwiderstand direkt proportional zur 4. Potenz des Gefäßinnenradius ist.

Isolierte Organe können ex vivo sowohl druckkonstant als auch flusskonstant perfundiert werden. Bei einer druckkonstanten Perfusion wird der Perfusionsdruck durch den hydrostatischen Druck bestimmt, dem er entspricht. Der Perfusionsdruck kann entweder über die Länge des Perfusionsgefäßes festgelegt werden oder aber flexibel eingestellt werden, was z. B. über ein Ventil geschehen kann (DHEIN 2005). Alternativ kann die Höhe des Perfusionsgefäßes und somit die Höhe des hydrostatischen Druckes verändert werden. Bei einer flusskonstanten Perfusion können unterschiedliche Pumpensysteme genutzt werden. Hier wird zwischen pulsatil und nicht-pulsatil unterschieden (KRÖSSIN 2007). Diese Pumpensysteme werden hauptsächlich im Rahmen der Kardiochirurgie bei Herz-Lungen-Maschinen verwendet, jedoch werden die unterschiedlichen Vor- und Nachteile der einzelnen Systeme kontrovers diskutiert (O'NEIL et al. 2012, VOSS et al. 2010). Bei flusskonstanten Ex-vivo-Modellen kommen häufig sogenannte Rollerpumpen zum Einsatz. Sowohl ein zu hoher Perfusionsdruck als auch ein zu hoher Perfusionsfluss können zu einer Überperfusion des isolierten Organs führen, wodurch es zu Schädigungen und zur Ödembildung kommen kann. Wendet man die oben genannten Gesetze auf flusskonstante bzw. druckkonstante Perfusionen an, so ergibt sich daraus, dass eine Vasokonstriktion bei einer flusskonstanten Perfusion zu einem Druckanstieg führt und bei einer druckkonstanten Perfusion zu einer Abnahme des Flusses führt.

2.2.2 Perfusionslösungen

Wie bereits im vorherigen Abschnitt erwähnt, spielt die Perfusionslösung eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Vitalparameter des isolierten Organs. Die einzelnen Inhaltsstoffe dieser Lösung sollten entsprechend der verwendeten Spezies und des Organs ausgewählt und angepasst werden (KRÖSSIN 2007). Die Zusammensetzung kann für unterschiedliche Fragestellungen aber auch variiert werden. So kann z. B. die Kalziumkonzentration in der Perfusionslösung variiert werden, um so den Einfluss des Kalziums auf die Wirksamkeit bestimmter Stoffe auf Gefäße oder glatte Muskulatur untersuchen zu können (MITSUI und KARAKI 1990). Es können mehrere Arten von Perfusionslösungen verwendet werden. Die Einteilung der Lösungen in verschiedene Gruppen variiert von Autor zu Autor. WÜSTENBERG (2006) teilt die Perfusionsmedien in einfache Salzlösungen (z. B. Tyrode-Lösung oder Krebs-Henseleit Bikarbonatpuffer), halbsynthetische Medien (z. B. physiologische Puffer mit Albumin), verdünntes Vollblut mit Puffer und Vollblut ein. ESCHE (2007) hingegen teilt die Perfusionsmedien in die drei Gruppen zellfreie Elektrolytlösungen, modifizierte Pufferlösungen und Vollblut ein. Der Einsatz von zellfreien Medien bietet den Vorteil, dass sie relativ simpel und auch in größeren Mengen herzustellen sind und die Inhaltsstoffe standardisierbar sind. Typische Inhaltsstoffe sind Elektrolyte wie Natrium, Kalium, Magnesium und Kalzium und als Energieträger Glukose. Als Puffersubstanzen kommen Natriumhydrogencarbonat und Natriumdihydrogenphosphat zum Einsatz. DHEIN (2005) weist daraufhin, dass kristalline Lösungen eine geringere Viskosität besitzen, was bei gleichem Perfusionsdruck zu einem höheren Perfusionsfluss führt. Um Gewebeödeme zu verhindern, kann Vollblut als Perfusionsmedium verwendet oder auch Albumin zum Perfusionsmedium dazugeben werden (DHEIN 2005). Andere Autoren verwenden dafür Mannitol (BERKE et al. 2007) oder Natrium-Carboxymethylcellulose (FRIEBE et al. 2013). Der Einsatz von Vollblut hat den Vorteil, dass eine deutlich höhere Sauerstoffkapazität durch die enthaltenen Erythrozyten vorliegt. Allerdings hat der Einsatz von Vollblut auch Nachteile. Laut KRÖSSIN (2007) kann die Interaktion von Blut mit den künstlichen Oberflächen des verwendeten Perfusionssystems zur Koagulation und Hämolyse des Blutes führen. Außerdem müssen das Vollblut bzw. die zugesetzten Blutbestandteile erst gewonnen und dann ggf. aufbereitet werden, was den Einsatz von Spendertieren nötig machen kann.

Für die Oxygenierung des Perfusionsmediums können verschiedene Systeme genutzt werden. Der einfachste Weg ist die Verwendung eines in der Aquaristik gebräuchlichen Sprudelsteins, der über ein Druckreduzierungsventil an eine Gasflasche angeschlossen wird. Dieser hat den Nachteil, dass es bei der Verwendung einer proteinhaltigen Perfusionslösung zu einer deutlichen Schaumbildung kommt (DHEIN 2005). In einem solchen Fall kann als Alternative ein Oxygenator verwendet werden, wie er in Herz-Lungen-Maschinen zum Einsatz kommt.

Dieser ist jedoch im Vergleich um ein Vielfaches teurer. Einigen Autoren verwenden als Gas 100 % O₂ (BERKE et al. 2007). Sehr viel häufiger wird jedoch Carbogen verwendet (FRIEBE et al. 2013). Dies ist ein Gasgemisch, das zu 95 % aus O₂ und 5 % CO₂ besteht. Da in den meisten verwendeten Perfusionsmedien Natriumhydrogencarbonat und ein Phosphatpuffer zugesetzt sind, kann über dieses Gasgemisch dann der pH-Wert zuverlässig auf 7,4 eingestellt werden.

2.2.3 Ex-vivo-Modelle des Larynx

In der Literatur werden sowohl perfundierte als auch unperfundierte Ex-vivo-Modelle des Larynx beschrieben. Unperfundierte Ex-vivo-Modelle sind für verschiedene Spezies beschrieben wie z. B. Mensch (BERKE et al. 2013, ROHLFS et al. 2013), Hund (BERKE et al. 2007, GUILLEMOT et al. 2015), Schwein (BAKHSHAEI et al. 2013, LIU et al. 2011), Kaninchen (MAYTAG et al. 2013), Kalb (KOO et al. 2012), Frettchen (HERRERA et al. 2009), Schaf (FRANCO et al. 2011) und Affe (GARRETT et al. 2000). Auch am Pferd wurden diverse Ex-vivo-Untersuchungen am Larynx durchgeführt (MARKWELL und MUELLER 2016, MARTINI et al. 2012, REICHEL und MARTINEK 2014). Diese beschäftigten sich v. a. mit verschiedenen Operationstechniken zur Behandlung der RLN (LECHARTIER et al. 2014, MARKWELL und MUELLER 2016, MCCLELLAN et al. 2014, WITTE et al. 2010). REESINK et al. (2012) bewiesen in ihrer Studie, dass der M. cricothyroideus des Pferdes aus drei neuromuskulären Anteilen besteht. Bei der Ex-vivo-Stimulation des Muskels zeigte sich, dass die für jeden Anteil separat erzeugte Muskelkontraktion zu einer Ventralverschiebung der Cartilago thyroidea im Verhältnis zur Cartilago cricoidea führt. Perfundierte Ex-vivo-Modelle des Larynx sind in der Literatur kaum beschrieben. In der Arbeit von MARTINI et al. (2012) wurde ein perfundiertes Ex-vivo-Modell des equinen Larynx (n = 2) für die Messung der elektrischen Feldverteilung von implantierten Stimulationselektroden im CAD verwendet (MARTINI et al. 2012). Dabei traten perfusionsbedingt während der Messungen Schwellungen im Bereich des Muskels auf. Die Autoren wählten ein flusskonstantes Setup, allerdings ohne Angaben zur genauen Zusammensetzung der Perfusionslösung oder dem Perfusionsfluss zu machen. BERKE et al. (2007) entwickelten ein Ex-vivo-Modell zur Phonation kaniner Kehlköpfe. Hier wurde ebenfalls ein flusskonstantes Modell verwendet, bei dem eine modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung zum Einsatz kam, die mit 100 % O₂ begast wurde. Die Autoren bestimmten die Menge des venösen Abflusses aus dem isolierten Organ. Sie stellten die Flussrate über die Regulation der Höhe des Perfusatbeutels so ein, dass der Zufluss in das Organ gleich dem zuvor bestimmten venösen Abfluss war. Auch hier traten während des ersten Experiments Gewebeswellungen auf, so dass die Autoren bei den letzten zwei Versuchen Mannitol in einer Konzentration von 1,25 % zum Perfusionsmedium hinzufügten. Das gewonnene Wissen

aus dieser Studie nutzten die Autoren dann für die Entwicklung eines perfundierten Ex-vivo-Modells des humanen Larynx (BERKE et al. 2013). Bei dieser Studie verwendeten die Autoren verdünntes Vollblut mit einer speziellen Dialyse-Lösung. Das Perfusionsmedium wurde pulsatil über eine Pumpe mit den folgenden Parametern intraarteriell infundiert: Pumpenrate 60 Pulse/min, Puls-Druck ≈ 25 mmHg, systolischer Druck ≈ 90 mmHg. Dadurch konnte eine Stimmbildung von jeweils etwa einer Minute im Abstand von 10 bis 15 Minuten am perfundierten Ex-vivo-Larynx für eine Gesamtdauer von ca. 90 Minuten erreicht werden. Für den Larynx des Pferdes sind aus der Literatur zum aktuellen Zeitpunkt keine Daten über die Menge des arteriellen Blutflusses oder den vorherrschenden Blutdruck in den Blutgefäßen, die den Kehlkopf versorgen, bekannt.

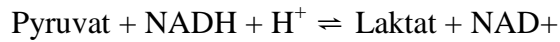
2.2.4 Vitalitätsparameter

Nachdem das Organ entnommen und an das Perfusionssystem angeschlossen wurde, ist es wichtig, die Vitalität des isolierten Organs zu testen. Erst wenn sichergestellt ist, dass das Organ bei der Entnahme keinen die Funktion einschränkenden Schaden genommen hat, kann mit den eigentlichen Untersuchungen begonnen werden. Dadurch wird die Vergleichbarkeit der nachfolgenden Untersuchungen sichergestellt. Die Ursachen für eine Schädigung sind vielfältig. Bei der Präparation kann es zur Verletzung wichtiger Gewebe des Organs oder der Ab- bzw. Durchtrennung wichtiger anatomischer Strukturen wie den arteriellen Gefäßen kommen. Ebenso spielt der Zeitraum zwischen Euthanasie des Versuchstieres und Anschluss des entnommenen Organs an das Perfusionssystem eine entscheidende Rolle.

WÜSTENBERG (2006) gibt in ihrer Arbeit einen Überblick über eine Vielzahl an möglichen Vitalitätsparametern. So nennt sie z. B. den Glukoseverbrauch, das Laktat-Glukose-Verhältnis oder die lichtmikroskopische und elektronenmikroskopische Untersuchung. Im Folgenden wird auf diejenigen Vitalitätsparameter eingegangen, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden.

Bei vielen Ex-vivo-Modellen werden die Konzentration von Laktat und die Aktivität der Laktat-Dehydrogenase gemessen. Die Glykolyse ist einer der wichtigsten Stoffwechselfvorgänge des Organismus zur Energiegewinnung. Dabei werden durch verschiedene Prozesse aus einem Molekül Glukose unter Bildung von zwei energiereichen Molekülen Adenosintriphosphat zwei Moleküle Pyruvat gebildet. Das gebildete Pyruvat kann unter aeroben Bedingungen zu CO_2 und H_2O oxidiert werden. Unter anaeroben Bedingungen, z. B. wenn im Skelettmuskel durch hohe Beanspruchung mehr Sauerstoff verbraucht wird als

zur Verfügung steht, wird Pyruvat jedoch mit Hilfe des Enzyms Laktat-Dehydrogenase (LDH) nach folgender Formel zu Laktat reduziert:



Durch diese sogenannte Milchsäuregärung kann die Glykolyse und damit die Energiegewinnung auch unter anaeroben Bedingungen aufrechterhalten werden. Kommt es zu einem Anstieg der Laktatkonzentration, so gibt dies einen Hinweis auf eine Hypoxie (WÜSTENBERG 2006). Daher wird Laktat auch regelmäßig als Hypoxiemarker verwendet (FARÍAS et al. 2016, KARAGIANNIS et al. 2006). LDH ist ein ubiquitär vorkommendes Enzym (DANESE und MONTAGNANA 2016). Für die LDH werden fünf Isoenzyme unterschieden (GUY und SNOW 1977), wobei in der Skelettmuskulatur vor allem die LDH₅ vorherrscht (ANDERSON 1976). Bei einer Schädigung der Zellmembran wird dieses Enzym aus der Zelle freigesetzt (CHAN et al. 2013). Als Biomarker wird die LDH z. B. für den Nachweis eines akuten Myokardinfarktes (DANESE und MONTAGNANA 2016) oder als Marker für anaeroben Stoffwechsel verwendet (KOUKOURAKIS et al. 2016).

Die Bestimmung des Organgewichts vor und nach der Perfusion liefert eine Information darüber, wie stark das Gewebe ödematisiert ist. DHEIN (2005) nennt als Ursachen für die Ödembildung den nicht vorhandenen kolloidosmotischen Druck bei der Verwendung von rein kristallinen Perfusionslösungen sowie einen zu hohen Perfusionsfluss bzw. -druck. WÜSTENBERG (2006) führt als weitere Ursachen noch ein falsches Perfusionsmedium, eine zu kurze Adaptationsphase und einen Ausfall der Natrium-Kalium-Pumpen an.

Die Gefäßreaktion der Koronargefäße kann laut DHEIN (2005) getestet werden, indem vasoaktive Substanzen wie Endothelin als Vasokonstriktor oder Nifedipin als Vasodilatator perfundiert werden. Diese Gefäßreaktion kann verwendet werden, um die Vitalität eines Ex-vivo-Organs auf der Gefäßebene zu überprüfen. Um neben der Vitalität der glatten Gefäßmuskulatur zusätzlich die Funktionalität des Gefäßendothels zu testen, kann Carbachol verwendet werden (DHEIN 2005, DHEIN et al. 2002). Außerdem schlägt DHEIN (2005) vor, die myogene Autoregulation zu testen. Dieser Effekt wurde 1902 erstmalig von William Maddock Bayliss entdeckt (BAYLISS 1902). Dieser sogenannte Bayliss-Effekt beschreibt die Vasokonstriktion von terminalen Arterien und Arteriolen auf eine Erhöhung des intravasalen Druckes. Durch die Erhöhung des Perfusionsdruckes kommt es zunächst zu einer passiven Dehnung des Gefäßes (DHEIN 2005). Auf diese Vasodilatation folgt dann eine Vasokonstriktion, die durch eine Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur in der Tunica muscularis erzeugt wird. Diese Kontraktion kann sowohl kalziumabhängig wie auch kalziumunabhängig reguliert werden und beruht auf der Mechanosensitivität der glatten Muskelzellen (SCHNEIDER 2013). Als Antwort auf Blutdruckveränderungen soll durch diesen Mechanismus die Blutversorgung zahlreicher Organe weitgehend konstant gehalten

werden (BUSSE 2007, SCHNEIDER 2013). Die myogene Autoregulation kann durch den Einsatz von Kalziumkanalblockern gehemmt werden (DHEIN 2005, SCHNEIDER 2013). SCHUBERT (2005) sieht bei Experimenten mit kanülierten Gefäßen den spontanen myogenen Tonus, also die Vasokonstriktion als Antwort auf eine Erhöhung des intravaskulären Druckes, als ersten Hinweis für eine Vitalität des Gefäßes. Zusätzlich schlägt er als Vitalitätstest die Reaktion des Gefäßes auf vasokonstriktorisch und –dilatatorisch wirkende Stoffe vor (SCHUBERT 2005). Als Vasokonstriktoren werden häufig Kaliumchlorid (KCl) (DHEIN et al. 1995) oder Noradrenalin (WÜSTENBERG 2006) verwendet. KCl führt in hohen Konzentrationen über eine Depolarisation der Zellmembran glatter Gefäßmuskelzellen zur Öffnung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle, wodurch es zur Kontraktion glatter Muskelzellen kommt (KARAKI et al. 1984). Noradrenalin hingegen bewirkt am α_1 -Adrenozeptor über die Aktivierung eines G_q -Proteins eine Kontraktion glatter Gefäßmuskelzellen (STARKE 2013). Als Vasodilatoren werden z. B. Acetylcholin (ANGUS et al. 1983), Carbachol (BOLTON und CLAPP 1986), Nitroprussid (LOBSIEN 2009) oder Papaverin (MATERA et al. 2011) verwendet. Carbachol vermittelt seine vasodilatatorische Wirkung vor allem über den M_3 muskarinergen Acetylcholinrezeptor (GERICKE et al. 2014). Das Papaverin erzeugt eine Vasodilatation über die Hemmung von Phosphodiesterasen (PÖCH und KUKOVETZ 1971). Nitroprussid setzt bei Kontakt mit glatter Gefäßmuskulatur Stickstoffmonoxid frei (NO), was zur Bildung von cGMP führt, das die Relaxation der glatten Gefäßmuskelzelle auslöst (LOBSIEN 2009).

Funktionstests können dazu verwendet werden, das für das entnommene Organ typischen Stoffwechselverhalten zu überprüfen. So werden für die Niere die Kreatinin-Clearance (KRÖSSIN 2007) und für die Leber die leberspezifischen Enzyme wie Aspartat-Aminotransferase oder Alanin-Aminotransferase (NASSAR et al. 2015) bestimmt. Um einen Muskel während oder nach einem Ischämiegeschehen auf Vitalität zu überprüfen, kann dessen Kontraktionsfähigkeit durch direkte Stimulation getestet werden (TOPALOV und DASKALOV 2004). Um die Vitalität von isolierten Gefäßen bzw. ihres Endothels und ihrer glatten Gefäßmuskulatur zu kontrollieren, werden häufig vasoaktive Substanzen wie KCl, Noradrenalin oder Carbachol eingesetzt (DHEIN et al. 2002, HARRISON et al. 2001).

3 Tiere, Material und Methoden

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Entwicklung und Validierung eines neu entwickelten Ex-vivo-Perfusionsmodells des equinen Larynx. Die Versuche wurden daher in die Vorversuche Phase 1 und Phase 2 sowie Hauptversuche unterteilt. Während der Entwicklung wurden sowohl im Versuchsaufbau als auch im Versuchsablauf einige Punkte und Parameter des Setups verändert und fortlaufend basierend auf Erkenntnissen der vorangegangenen Versuche optimiert. Die folgenden Abschnitte beschreiben allgemein die Organentnahme, den Versuchsaufbau und die Organperfusion im Labor. Relevante Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsphasen sind in den entsprechenden Kapiteln der Vorversuche und Hauptversuche dargestellt.

3.1 Tiere

Die vier Pferde aus den Vorversuchen der Phase 1 (drei Stuten, ein Hengst, Alter 4 bis 15 Jahre) waren zur Schlachtung vorgesehen. Vor Beginn der Vorversuche wurden die geplanten Euthanasien der zuständigen Behörde angezeigt und von dieser genehmigt (Tiertötungsanzeige T66/13, Landesdirektion Sachsen, Chemnitz, 30.01.13). Die für die Vorversuche Phase 2 (drei Stuten, vier Hengste, Alter 1 bis 21 Jahre) benötigten Kehlköpfe stammten von Pferden aus unterschiedlichen Quellen. Fünf Pferde wurden über denselben Pferdehändler bezogen wie bei den Vorversuchen der Phase 1 (Tiertötungsanzeige T96/13, Landesdirektion Sachsen, Chemnitz, 10.12.13). Ein Kehlkopf stammte von einem Pferd, das zu Lehr- und Forschungszwecken am Veterinär-Anatomischen Institut der Universität Leipzig euthanasiert wurde (Tiertötungsanzeige T15/14, Landesdirektion Sachsen, Chemnitz, 17.01.14). Ein Kehlkopf wurde von einem Pferd entnommen, das in der Chirurgischen Tierklinik der Universität Leipzig auf Grund von orthopädischen Erkrankungen euthanasiert wurde. Für die Hauptversuche wurden die Kehlköpfe von insgesamt fünf Stuten (Alter 4 bis 14 Jahre) verwendet. Drei Kehlköpfe wurden von Pferden entnommen, die im Rahmen eines anderen Forschungsprojektes euthanasiert wurden (Tierversuchsvorhaben TVV34/13, Landesdirektion Sachsen, Chemnitz). Ein Kehlkopf stammte von einem Pferd, das zu Lehr- und Forschungszwecken am Veterinär-Anatomischen Institut der Universität Leipzig euthanasiert wurde (Tiertötungsanzeige W09/14, Landesdirektion Sachsen, Chemnitz, 21.10.14). Außerdem wurde noch ein Kehlkopf von einem Pferd entnommen, das in der Chirurgischen Tierklinik der Universität Leipzig auf Grund von orthopädischen Erkrankungen euthanasiert wurde. Eine detaillierte Übersicht über die Versuchstiere gibt Tabelle (Tab.) 3-1.

Tab. 3-1 Versuchstiere

Versuchstier- Nummer	Alter in Jahren	Rasse	Geschlecht	Farbe
1	4	Araber	Stute	Schimmel
2	14	Deutsches Reitpferd	Stute	Fuchs
3	4	Araber	Hengst	Schimmel
4	15	Traber	Stute	Fuchs
5	2	Deutsches Sportpferd	Hengst	Braun
6	21	Araber	Stute	Braun
7	ca. 15-20	Deutsches Reitpony	Stute	Fuchs
8	20	Pony u. Kleinpferd	Stute	Fuchs
9	2	Warmblut	Hengst	Braun
10	1	Schweres Warmblut	Hengst	Rappe
11	1	Edelbluthaflinger	Hengst	Hellfuchs
12	12	Tschechisches Warmblut	Stute	Schimmel
13	4	Traber	Stute	Braun
14	4	Traber	Stute	Fuchs
15	6	Traber	Stute	Braun
16	14	Warmblut	Stute	Braunschecke

3.2 Material

3.2.1.1 Chemikalien, Lösungen

Für die Perfusion des entnommenen Kehlkopfes wurde eine modifizierte Tyrode-Lösung verwendet, die unmittelbar vor jedem Versuch frisch angesetzt wurde. Die Rezeptur stammt von der Cornell University, Ithaca, New York, USA (persönliche Kommunikation mit Jon Cheetham und Norm G. Ducharme, Juni 2013). Insgesamt wurden für die Vorversuche der Phase 1 jeweils 8,0 l Perfusionslösung pro Versuch und für die übrigen Versuche jeweils 16,0 l Perfusionslösung pro Versuch benötigt. Die Herstellung der Lösung erfolgte nach einer festgelegten Arbeitsanweisung für jeweils 8 l Perfusionsmedium. Zuerst wurden 64,1 g Natriumchlorid, 2,4 g Kaliumchlorid, 0,99 g Natriumhydrogenphosphat und 1,625 g Magnesiumchlorid in 1000 ml vollentsalztem Wasser gelöst. Dann wurden 7,96 g Glukose, 16,16 g Natriumhydrogencarbonat und 1,765 g Natriumpyruvat hinzugegeben. Anschließend wurde die Lösung mit 6,5 l vollentsalztem Wasser weiter verdünnt. Im Anschluss wurden 2,36 g Calciumchlorid separat in 500 ml vollentsalztem Wasser gelöst, um Ausflockungen zu verhindern, und anschließend zur vorgefertigten Lösung hinzugegeben. Zum Abschluss

wurden pro Liter Perfusionslösung je 1 IE Insulin hinzugefügt. Alle verwendeten Chemikalien waren von Analysequalität und wurden mit einer Feinwaage abgewogen. Die Zusammensetzung der modifizierten Tyrode-Lösung ist in Tab. 3-2 dargestellt. Für die Vorversuche der Phase 1 enthielt die Perfusionslösung jedoch kein Natriumpyruvat und kein Insulin. Die Tab. 3-3 gibt eine Übersicht über alle in den Versuchen verwendeten Chemikalien und Medikamente.

Tab. 3-2 Zusammensetzung der modifizierten Tyrode-Lösung

Chemikalie	Menge für 8 l Perfusionslösung in g	Konzentration in mmol/l
NaCl	64,10	137,1
KCl	2,40	4,02
NaH ₂ PO ₄ x 1 H ₂ O	0,99	0,79
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	1,625	1,0
D-Glukose	7,96	5,53
NaHCO ₃	16,16	24,04
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	2,36	2,66
Natriumpyruvat	1,765	2,0

Tab. 3-3 Übersicht über alle verwendeten Chemikalien und Medikamente

Chemikalie / Medikament	Hersteller
Arterenol (\pm Norepinephrin Hydrochlorid)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Butorphanol (Alvegesic®, 10 mg/ml)	CP-Pharma GmbH, Burgdorf, Deutschland
Calciumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Carbachol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Carbogen Lab	Linde AG, Pullach, Deutschland
Detomidin (Sedivet®, 10 mg/ml)	Boehringer Ingelheim Pharma GmbH Co. KG, Ingelheim am Rhein, Deutschland
D-Glukose, Cellpure®	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Diazepam (Diazepam-®Lipuro)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Heparin (Heparin-Natrium Braun, 25.000 IE/5 ml)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Insulin (Insuman® Rapid, 40 IE/ml)	Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt, Deutschland
Kaliumchlorid AnalaR Normapur	VWR International, Leuven, Belgien
Ketamin (Ursotamin®, 100 mg/ml)	Serum Bernburg AG, Bernburg, Deutschland
Magnesiumchlorid Hexahydrat AnalaR Normapur	VWR International, Leuven, Belgien
Natriumchlorid AnalaR Normapur	VWR International, Leuven, Belgien
Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat AnalaR Normapur	VWR International, Leuven, Belgien
Natriumnitroprussiat Dihydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Papaverinhydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Pentobarbital (Euthadorm®, 400 mg/ml)	CP-Pharma GmbH, Burgdorf, Deutschland
T61	Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland
Wasserbad-Schutzmittel (Aqua Stabil)	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, Deutschland
Xylazin (Xylavet®, 20 mg/ml)	CP-Pharma GmbH, Burgdorf, Deutschland

3.2.1.2 Zubehör für die Perfusion

Der Vorratsbehälter 1 (siehe Abbildung 3-1 und Abb. 3-2), die Perfusionswanne und der Kehlkopfhalter wurden nach Maß extra für diese Arbeit angefertigt. Außerdem wurden eine Adapter-Box und ein galvanisch getrennter Spannungs-Stromwandler verwendet, die beide von der Fachhochschule Trier im Eigenbau realisiert wurden. Alle anderen Bauteile sind kommerziell erhältlich.

Die Abb. 3-1 und 3-2 wurden beide mit Microsoft Office Visio 2007® erstellt. Die Aufzeichnung der Daten der Muskelstimulation und der intramuskulären Druckmessung erfolgte durch die Software LabChart 8 (ADInstruments, Bella Vista, Australien). Die Daten

der Messung des Perfusionsflusses wurden mit Hilfe der Software SONOFLOW Monitor (SONOTEC Ultraschallsensorik Halle GmbH, Halle, Deutschland) aufgezeichnet.

Tab. 3-4 Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien

Zubehör	Hersteller
Adapter-Box (Eigenbau)	Fachhochschule Trier (Fachbereich Elektrotechnik), Trier, Deutschland
Analysewaage AG 2004 Delta Range	Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland
Analysewaage AR 2140	OHAUS Corp, Pine Brook, NJ, USA
Sprudelstein	HAGEN Deutschland GmbH & Co. KG, Holm, Deutschland
Dreiweghahn Discofix® 3	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Druckmesskatheter (Mikro-Tip® Catheter Transducer Model SPR-524)	Millar Instruments, Inc., Houston, Texas, USA
Einhängethermostat E 100 mit Badgefäß 011	Lauda Dr. R. Wobber GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Galvanisch getrennter Spannungs-Stromwandler (Eigenbau)	Fachhochschule Trier (Fachbereich Elektrotechnik), Trier, Deutschland
Glasgefäß, doppelwandig (nach Maß)	Glasbläserei Kind, Leipzig, Deutschland
Hahnbank Discofix® 3SM	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Heidelberger Verlängerung, 30 cm	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Insertion Tool (PlexoLong NanoLine Facette mit Stilet, gerade, an Splitkanüle 5F)	PAJUNK® GmbH, Geisingen, Deutschland
Kehlkopfhalter (nach Maß)	Fachhochschule Trier (Fachbereich Elektrotechnik), Trier, Deutschland
Laborglasperlen 5 mm	A. Hartenstein Laborbedarf GmbH, Würzburg, Deutschland
Mehrweghahn Discofix® 3SC	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Nahtmaterial (ETHILON® II, UPS 3-0)	Johnson&Johnson, St-Stevens Woluwe, Belgien

Perfusionswanne, doppelwandig, aus Plexiglas (nach Maß)	Gebr. Rettberg GmbH, Göttingen, Deutschland
Peristaltikpumpe Masterflex© Modell 170100A	Radnoti LLC, California, USA
pH-Meter, WTW Multi 350i SET	WTW wissenschaftlich-technische Werkstätten, Weilheim, Deutschland
PowerLab 4/25	ADInstruments, Dunedin, New Zealand
Schinkenkordel weiß, 2-fach, 3,5 WI	Zentralgenossenschaft des europäischen Fleischergewerbes eG, Frankfurt/Main, Deutschland
Schlauchventile Rotilabo® 2-Wege PE/3-Wege PE	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Silikonschlauch Rotilabo®	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Stimulationselektrode K5-P4 Lead, 5F, 4 polar, 30 cm	OSYPKA AG, Rheinfeldern, Deutschland
Thermometer GTH 175 PT-T	GHM Messtechnik GmbH, Regenstauf, Deutschland
Ultraschall-Durchfluss-Sensor (SONOFLOW CO55/080)	SONOTEC Ultraschallsensorik Halle GmbH, Halle, Deutschland
Umwälzthermostat Modell 1140S	VWR International LLC, Radnor, Pennsylvania, USA
Venenverweilkatheter (I.V. Katheter mit Einspritzkanüle, 18G)	Van Oostveen Medical B.V. - Romed Holland, Wilnis, Holland
Verstärker (Bridge Amp, FE221)	ADInstruments, Dunedin, New Zealand
Rotilabo®-Y-Stücke, natur, mit geraden Enden	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

3.3 Methoden

3.3.1 Entnahme des Kehlkopfes

Die Tiere wurden entweder in der Aufwachbox der Chirurgischen Tierklinik der Universität Leipzig oder im Situs-Raum des Veterinär-Anatomischen Instituts der Universität Leipzig vom diensthabenden Anästhesisten der Chirurgischen Tierklinik euthanasiert. Zuerst wurde ein Venenverweilkatheter in die linke Vena jugularis eingelegt. Danach erfolgte die Euthanasie der Versuchstiere entweder mit der Euthanasievariante 1 (EV 1) oder der Euthanasievariante 2 (EV 2). Bei der EV 1 wurden die Pferde mit Xylazin (0,6 mg/kg KGW)

sediert. Die Narkoseeinleitung erfolgte durch intravenöse (i. v.) Applikation von Ketamin (3 mg/kg KGW) und Diazepam (0,08 mg/kg KGW). Nach dem Niederlegen des Tieres wurden die Tiere schließlich durch Gabe von Pentobarbital (40 mg/kg KGW) euthanasiert. Bei der EV 2 hingegen wurden die Tiere durch i. v.-Gabe von Detomidin (0,06 mg/kg KGW) und Butorphanol (0,03 mg/kg KGW) sediert. Das Ablegen erfolgte durch die i. v. Applikation von Ketamin (2,2 mg/kg KGW) und Diazepam (0,08 mg/kg KGW) und die Euthanasie durch die i. v. Verabreichung von T61 (6 ml/50 kg KGW). Direkt im Anschluss an die Pentobarbital- bzw. T61-Gabe wurden den Tieren 100 IE/kg KGW Heparin-Natrium i. v. zur Hemmung der Blutgerinnung verabreicht. Nachdem der Anästhesist den Tod des Tieres durch Auskultation des Herzens bestätigt hatte, wurde das Tier in Rückenlage gebracht. Als nächstes erfolgte der Hautschnitt in der Medianen von der Mitte des Unterkieferastes bis etwa zur Höhe der sechsten oder siebten Trachealspange. Nach Darstellung der rechten und linken Vena jugularis wurden diese jeweils möglichst weit proximal und distal doppelt mit einer Schinkenkordel ligiert und das Gefäß zwischen beiden Ligaturen durchtrennt. Daran schloss sich jeweils links und rechts die weitere Präparation in die Tiefe bis auf die Trachea mit Darstellung der Glandula thyroidea und der A. carotis communis an. Diese wurde proximal der Glandula thyroidea und auf der Höhe des Os hyoideum mit einer Schinkenkordel jeweils zweimal ligiert und nahe der jeweiligen Ligatur durchtrennt. Anschließend wurde die Trachea auf Höhe der vierten bis sechsten Trachealspange quer durchgeschnitten. Das Os hyoideum wurde durch beidseitige Inzision in der Art. thyrohyoidea vom Kehlkopf separiert. Danach wurde der Kehlkopf auf beiden Seiten lateral von den umliegenden Strukturen unter Schonung des Stumpfes der A. carotis communis abpräpariert. Rostral wurde die Zunge vom Kehlkopf abgetrennt und ventral der Oesophagus am Kehlkopf belassen. Der Kehlkopf wurde für den Transport in das Labor in eine mit Tyrode-Lösung gefüllte Transportbox gelegt, wobei seine Oberfläche vollständig mit Lösung bedeckt war.

3.3.2 Versuchsaufbau

Der verwendete Versuchsaufbau (Abb. 3-1 und 3-2) beinhaltet zwei unterschiedlichen Kreisläufe: einem Wärmekreislauf und einem Organkreislauf.

Der **Wärmekreislauf** ist in Abb. 3-1 und 3-2 jeweils rot dargestellt. Über einen Umwälzthermostat gelangte das angewärmte Wasser zuerst in die doppelwandige Perfusionswanne, um dort die Perfusionsflüssigkeit, in welcher der Kehlkopf gelagert wurde, auf die gewünschte Temperatur von 36°C bis 37°C anzuwärmen. Von dort floss das Wasser in den doppelwandigen Vorratsbehälter 1, wo die Perfusionslösung auf eine Temperatur von 37° bis 38°C angewärmt wurde. Vom Vorratsbehälter 1 gelangte das Wasser zurück zum Umwälzthermostat. Der Wärmekreislauf war mit entmineralisiertem Wasser gefüllt, welchem

ein Wasserbad-Schutzmittel (Aqua-Stabil) hinzugesetzt worden war, um eine Vermehrung von Mikroorganismen, Bakterien und Algen zu verhindern. Das Wasser im Wärmekreislauf sowie das Wasserbad-Schutzmittel wurden regelmäßig nach Hersteller-Angaben gewechselt.

Der **Organkreislauf** ist in Abb. 3-1 und 3-2 blau markiert. Die modifizierte Tyrode-Lösung gelangte aus dem Vorratsbehälter über einen Schlauch zum Katheter in der linken bzw. rechten A. thyroidea cranialis des Kehlkopfes. Das Perfusionsmedium floss über venöse Gefäße ab und gelangte in die Perfusionswanne. Dort wurde mit einer Peristaltikpumpe überschüssige Flüssigkeit abgesaugt und in den Vorratsbehälter 2 gepumpt, so dass ein konstanter Flüssigkeitsspiegel in der Perfusionswanne vorlag. Aus dem Vorratsbehälter 2 wurde die Perfusionsflüssigkeit dann in den Ausgangsvorratsbehälter zurück gepumpt. Um einen konstanten Flüssigkeitsspiegel und somit einen konstanten hydrostatischen Druck zu erhalten, wurde der Pumpenfluss größer als der Organfluss zum Kehlkopf hin gewählt. Der hydrostatische Druck ergab sich aus der Strecke zwischen der Höhe des Flüssigkeitsspiegels im Vorratsbehälter 1 und dem Untergrund, auf welchem das Perfusionssystem stand. Der hydrostatische Druck entsprach dem Eingangsdruck für das Perfusionssystem. Der Ausgangsdruck hingegen setzte sich aus der Differenz zwischen der Höhe des Flüssigkeitsspiegels in der Perfusionswanne und dem Boden der Perfusionswanne zusammen. Der eigentliche Perfusionsdruck errechnete sich damit nach der Formel:

$$\text{Perfusionsdruck} = \text{Eingangsdruck} - \text{Ausgangsdruck}.$$

Der Perfusionsdruck konnte also durch die Veränderung von Eingangs- bzw. Ausgangsdruck reguliert werden. Die Höhe des Flüssigkeitsspiegels wurde über einen eingelassenen Glasstab reguliert, der als Überlaufschutz fungierte. Überschüssiges Perfusionsmedium floss über diesen Glasstab in den Vorratsbehälter 2 ab. Die Perfusionslösung wurde im Vorratsbehälter 1 und in der Perfusionswanne kontinuierlich mit Carbogen (95 % O₂ und 5 % CO₂) begast, damit sich ein pH-Wert von 7,35 bis 7,45 einstellte. Dazu wurden zwei handelsübliche Sprudelsteine aus der Aquaristik verwendet.

3.3.3 Organperfusion im Labor

Das Organ wurde im Labor von der Transportbox in die mit modifizierter Tyrode-Lösung (37°C) gefüllte Perfusionswanne verbracht. Es wurde jeweils rechts und links der Abgang der A. thyroidea cranialis von der A. carotis communis frei präpariert und ein Venenverweilkatheter in dieses Gefäß eingelegt. Der Venenverweilkatheter wurde mit chirurgischem Nahtmaterial fixiert, um ein Herausrutschen desselben zu verhindern. Dann wurde das Organ an den Perfusionskreislauf angeschlossen und die Perfusion gestartet. Es wurde die Zeitspanne vom Tod des Tieres bis zum Anschluss des entnommenen Kehlkopfes

an die Perfusion bestimmt. Im nächsten Schritt erfolgte die Darstellung des CAD durch eine mediane Längsinzision des Oesophagus und des M. cricopharyngeus, der anschließend zur Seite geklappt wurde. Im Anschluss wurde die Vitalität des Organs durch verschiedene Tests überprüft (siehe 3.3.6). Im Rahmen eines weiteren Projekts, das nicht Bestandteil dieser Arbeit ist, für das dieses Ex-vivo-Modell aber die Basis darstellen sollte, wurde dann die elektrische Feldverteilung im CAD gemessen. Nach Beendigung dieser Untersuchungen wurden erneut die Vitalitätstests aus Abschnitt 3.3.6 durchgeführt und die Perfusion beendet. Die Gesamtdauer der Perfusion (Zeitpunkt vom Anschluss des Organs an die Perfusion bis zum Ende der Perfusion) wurde dokumentiert.

3.3.4 Vorversuche

Die Vorversuche teilen sich in zwei Abschnitte auf: Phase 1 und Phase 2. Der jeweilige Versuchsaufbau und die Unterschiede im Versuchsablauf in den beiden Phasen sind in den jeweiligen Kapiteln (3.3.4.1 bzw. 3.3.4.2) erläutert.

3.3.4.1 Vorversuche Phase 1

Der für die Vorversuche der Phase 1 verwendete Versuchsaufbau ist in Abb. 3-1 dargestellt.

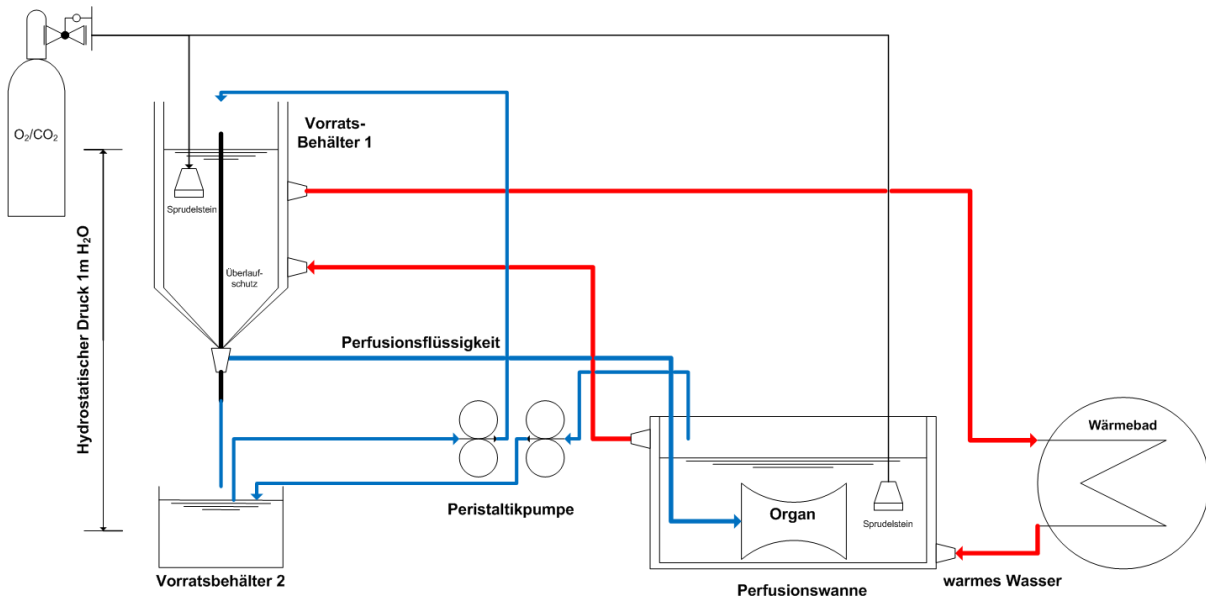


Abb. 3-1 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus in den Vorversuchen der Phase 1

Der Larynx wurde bei den Vorversuchen der Phase 1 nach seiner Entnahme in ein mit 4°C kalter modifizierter Tyrode-Lösung gefülltes Transportgefäß gelegt und dann ins Labor transportiert. Dort wurden nach der beidseitigen Katheterisierung der A. thyroidea cranialis beide Gefäße jeweils mit 250 ml modifizierter Tyrode-Lösung (4°C) über einen Zeitraum von fünf Minuten per Hand vorperfundiert. Beim letzten Vorversuch hatte die Perfusionslösung der Vorperfusion Raumtemperatur (21°C). Die Vorperfusion erfolgte manuell mit einer 20 ml Spritze. Danach wurde der Ösophagus komplett abpräpariert und der CAD dargestellt. Das Perfusionssystem wurde dann angeschlossen, und das Organ in die eigentliche Perfusionswanne verbracht. Der Kehlkopf wurde durch mit Laborglasperlen gefüllte Plastiksäcke in der Mitte der Perfusionswanne fixiert. Die Perfusionsflüssigkeit floss in dieser Vorversuchsreihe aus dem Vorratsbehälter 1 über einen Schlauch und ein Y-Stück in die beiden arteriellen Gefäße. Um das entnommene Organ auf Vitalität zu testen, erfolgte bei den Vorversuchen der Phase 1 der unter 3.3.6.2 beschriebene Test auf myogene Autoregulation. Dieser Test wurde hier nur einmalig zu Beginn der Perfusion durchgeführt. Danach erfolgte wie unter 3.3.3 erwähnt die Messung der elektrischen Feldverteilung im CAD. Nach Abschluss dieser Messungen wurde die Perfusion beendet.

In den Vorversuchen der Phase 1 wurde der Perfusionsfluss anders als in den nachfolgenden Versuchen gemessen. Der Flüssigkeitsspiegel im Vorratsbehälter 1 wurde über einen Glasstab, der als Überlaufschutz diente, so eingestellt, dass der Perfusionsdruck 1,0 mH₂O bzw. 9,81 kPa betrug. Mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe wurde Perfusionsflüssigkeit mit einer konstanten Rate (KR) aus dem Vorratsbehälter 2 in den Vorratsbehälter 1 gepumpt. Der Pumpenfluss wurde so eingestellt, dass der Zufluss aus dem Vorratsbehälter 2 in den Vorratsbehälter 1 größer war als der Abfluss aus dem Vorratsbehälter 1 zum Organ. Überschüssiges Perfusionsmedium lief dann über den Überlaufschutz ab. Der Perfusionsfluss bzw. Organfluss wurde bestimmt, indem die Flüssigkeitsmenge (FM), die über den Überlaufschutz abließ, mit einem Glasmesszylinder (Volumen 100 ml, Teilung 2 ml) über eine Minute aufgefangen wurde. Daraus konnte der Perfusionsfluss (PF) nach der Gleichung:

$$PF = KR - FM$$

berechnet werden.

3.3.4.2 Vorversuche Phase 2

Der für die Vorversuche der Phase 2 verwendete Versuchsaufbau ist in Abb. 3-2 dargestellt. Um den PF genauer messen zu können, wurde ein Ultraschall-Durchfluss-Sensor (Flowmeter) in den Organkreislauf eingebaut, dessen Daten mit der dazugehörigen Software (SONOFLOW Monitor) aufgezeichnet wurden. Außerdem wurde ein spezieller

Kehlkopfhalter aus Kunststoff angefertigt, um den entnommenen Larynx sicher in einer fixen Lage zu positionieren. Dadurch konnte auf den Einsatz der mit Glasperlen gefüllten Plastiksäcke verzichtet werden. Dazu musste allerdings eine neue Perfusionswanne angefertigt werden, die im Vergleich zu der Perfusionswanne aus den Vorversuchen der Phase 1 in X-, Y- und Z-Richtung vergrößert wurde.

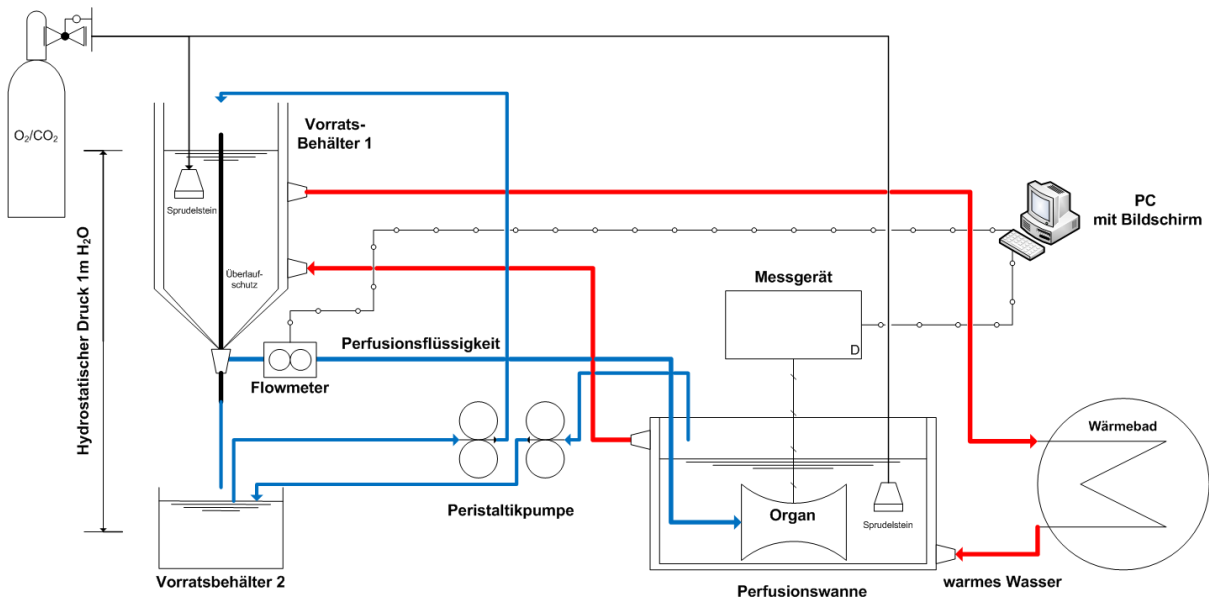


Abb. 3-2 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus in den Vorversuchen der Phase 2 und den Hauptversuchen

Bei den Vorversuchen der Phase 2 fand im Gegensatz zu Phase 1 keine Vorperfusion statt. Der entnommene Kehlkopf wurde hier direkt nach der Entnahme in das mit modifizierter Tyrode-Lösung (Raumtemperatur) gefüllte Transportgefäß gelegt und ins Labor verbracht. Dort erfolgte dann die Organperfusion wie unter 3.3.3 beschrieben. Hierbei gelangte die Perfusionsflüssigkeit vom Vorratsbehälter 1 über einen Schlauch und einen 3-Wege-Hahn vorbei zu einer Hahnbank und von dort zu den beiden arteriellen Gefäßen. Der 3-Wege-Hahn und die Hahnbank ersetzen das in den Vorversuchen der Phase 1 verwendete Y-Stück. Direkt nach Anschluss der Perfusion wurde der Kehlkopf auf einen Kehlkopfhalter montiert, indem der Kehlkopfhalter von kaudal in die Trachea eingeführt wurde. Der Kehlkopf wurde mit einer Kunststoffschraube, die zwischen zwei Trachealspangen eingebracht wurde, am Kehlkopfhalter fixiert. Die Fixierung des Kehlkopfhalters an der Perfusionswanne erfolgte ebenfalls durch eine Kunststoffschraube. Dadurch war der Kehlkopf gegen Rotation oder Verrutschen gesichert.

Der bereits in Phase 1 erwähnte und unter 3.3.6.2 beschriebene Test auf myogene Autoregulation wurde in Phase 2 sowohl zum Anfang der Versuche als auch am Ende

durchgeführt. Um den entnommenen Kehlkopf nicht nur auf Vitalität, sondern auch auf muskuläre Funktionalität zu untersuchen, wurde zusätzlich der unter 3.3.6.1 beschriebene Test auf Kontraktilität des CAD zu Versuchsbeginn und –ende durchgeführt. Außerdem wurde zusätzlich die Funktionalität des Gefäßsystems durch die Zugabe vasoaktiver Substanzen überprüft. Dazu wurden sowohl vasokonstriktorisch (Kaliumchlorid, Noradrenalin) als auch vasodilatativ (Carbachol, Nitroprussid, Papaverin) wirkende Substanzen verwendet. Diese wurden entweder kontinuierlich (kont) durch Einschwemmen in Vorratsbehälter 1 und 2 und in die Perfusionswanne oder direkt über den 3-Wege-Hahn als Bolus (Bol) in die arteriellen Gefäße verabreicht. Eine Übersicht über die verwendeten Substanzen, Konzentrationen (Konz) und Applikationsarten (Appl) liefert Tab. 3-5. Da bei diesen Tests unterschiedliche vasoaktive Substanzen in die Perfusionsflüssigkeit gegeben wurden, wurde die gesamte Perfusionsflüssigkeit nach Abschluss der genannten Vitalitätstests am Versuchsanfang gegen frische Tyrode-Lösung getauscht. Diese wurde zuvor auf 37°C erwärmt. Danach erfolgte die unter 3.3.3 erwähnte Messung der elektrischen Feldverteilung im CAD. Nach Abschluss dieser Messungen wurden erneut alle zuvor genannten Vitalitätstests durchgeführt. Zusätzlich wurde am Versuchsende noch der unter 3.3.6.5 beschriebene Test hinzugefügt. Schließlich wurde die Perfusion beendet und die Gesamtdauer der Perfusion notiert.

Tab. 3-5 Übersicht über die in den Vorversuchen der Phase 2 verwendeten vasoaktiven Substanzen

VT	Kaliumchlorid		Noradrenalin		Carbachol		Nitroprussid		Papaverin	
	Konz	Appl	Konz	Appl	Konz	Appl	Konz	Appl	Konz	Appl
5	30 mM	kont			10 µM	kont				
6	30 mM	kont			10 µM	kont				
7	30 mM	kont			10 µM	kont				
8	50 mM	kont			50 µM	kont			1 µM	kont
9	50 mM	kont			50 µM	kont			1 µM	kont
10			0,2 mg	Bol	0,18 mg	Bol			0,3 mg	Bol
11			0,2 mg	Bol		Bol	0,3 mg	Bol	0,3 mg	Bol

3.3.5 Hauptversuch

Bedingt durch die Optimierungen aus den Vorversuchen der Phase 1 und 2 wurde für den Hauptversuch derselbe Versuchsaufbau wie in den Vorversuchen der Phase 2 verwendet (siehe Abb. 3-2).

Um den Kehlkopf an das Perfusionssystem zu adaptieren, wurde im Hauptversuch nach Anschluss an den Perfusionssystem zuerst mit einem Perfusionsdruck von 7,85 kPa ($\approx 58,84$ mmHg bzw. $0,8$ mH₂O) über eine Zeitspanne von zehn Minuten perfundiert. Anschließend wurde der Perfusionsdruck auf 9,81 kPa ($\approx 73,55$ mmHg bzw. $1,0$ mH₂O) erhöht und die Organperfusion wie unter 3.3.3 beschrieben durchgeführt. Dabei wurden die Vitalitätstests (siehe 3.3.6.1 bis 3.3.6.6) durchgeführt. Der Versuchsablauf im Hauptversuch wurde zusätzlich um den Test auf Funktionalität des CAD erweitert. Dieser ist unter 3.3.6.7 beschrieben.

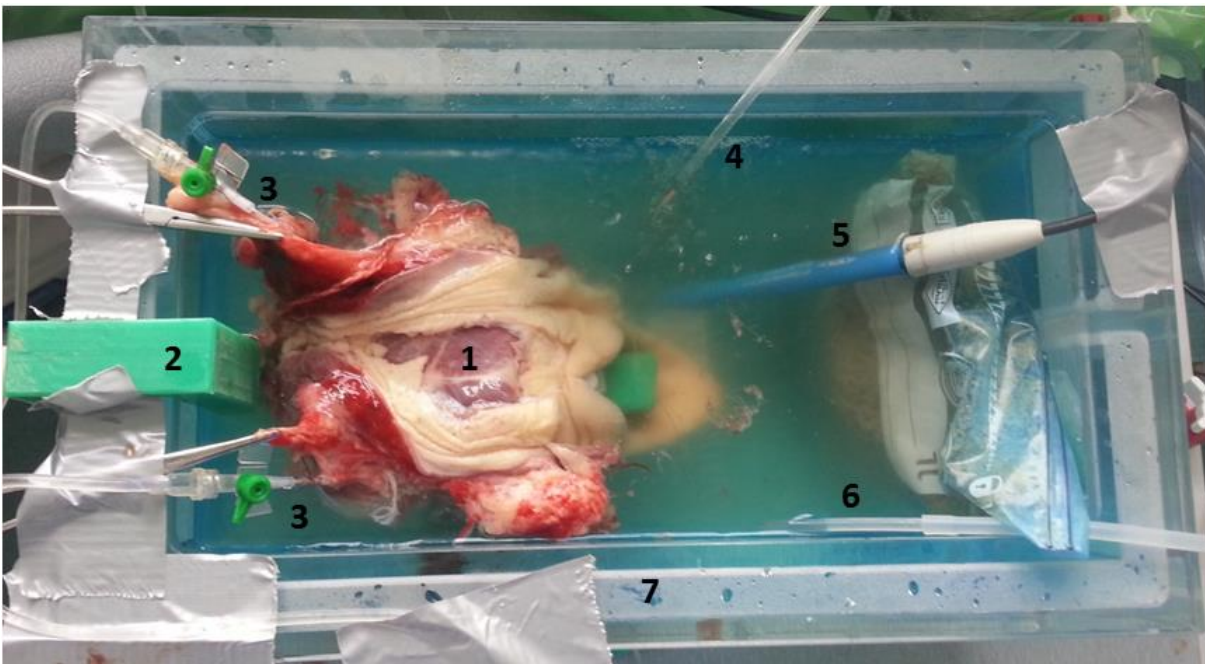


Abb. 3-3 Repräsentative Abbildung der Larynxperfusion.

Die Abbildung zeigt eine dorsale Ansicht des Larynx (1) in der Perfusionswanne (7). Der Larynx wurde mit einem speziellen Kehlkopfhalter (2) fixiert. Über die linke und rechte A. thyroidea cranialis (3) erfolgte die Zufuhr des Perfusionsmediums. Über einen Schlauch, an den ein Sprudelstein angeschlossen war, erfolgte die Sauerstoffzufuhr (4). Der pH-Wert wurde über eine pH-Elektrode (5) kontrolliert. Über einen Absaugeschlauch (6) wurde überschüssiges Perfusionsmedium wieder zurück in den Perfusionssystem gepumpt.

3.3.6 Vitalitätstests

3.3.6.1 Test der Kontraktilität des CAD

Zur Testung der Muskelkontraktilität wurde ein Druckmesskatheter in den medialen Anteil des rechten CAD, wie von WINTERS et al. 2009 beschrieben, in Verlaufsrichtung der

Muskelfasern implantiert. Da SEJERSTED et al. (1984) gezeigt haben, dass der gemessene intramuskuläre Druck (IMP) von der Tiefe des implantierten Druckmesskatheters abhängig ist, wurde bei allen Tieren der Druckmesskatheter im 45° Winkel so implantiert, dass die Spitze mit dem Druckaufnehmer etwa in der Mitte des medialen Muskelanteils zum Liegen kam. Der Druckmesskatheter wurde mit einem Verstärker verbunden, der mit einem PowerLab (in Abb. 3-2 als Messgerät bezeichnet) gekoppelt war. Das PowerLab wurde dann über ein USB-Kabel mit einem PC verbunden. An das PowerLab war zusätzlich ein galvanisch getrennter Spannungs-Stromwandler angeschlossen, an den ein Einbringinstrument (Insertion Tool), welches als Stimulationselektrode fungierte, angeschlossen war. Eine Gegenelektrode in Form eines kleinen Drahtgitters (Maße: 7 x 3 cm) wurde in die Perfusionswanne gelegt. Im Anschluss erfolgte die externe Stimulation des CAD über die zuvor genannte Stimulationselektrode mit den folgenden Parametern: biphasischer Puls, Frequenz 1 Hz, Pulsstärke 5 mA, Pulsweite 0,01 s, Pulsform rechteckig. Die Stimulationsimpulse und die Werte der intramuskulären Druckmessung wurden über die Software LabChart 8 aufgezeichnet. Der Test wurde als positiv gewertet, wenn auf jeden Stimulationsimpuls ein Anstieg des intramuskulären Drucks erfolgte. Nach Abschluss des Tests wurde der Druckmesskatheter explantiert und analog zur rechten Seite dann auf der linken Seite implantiert und der Test auf dieser Seite durchgeführt.

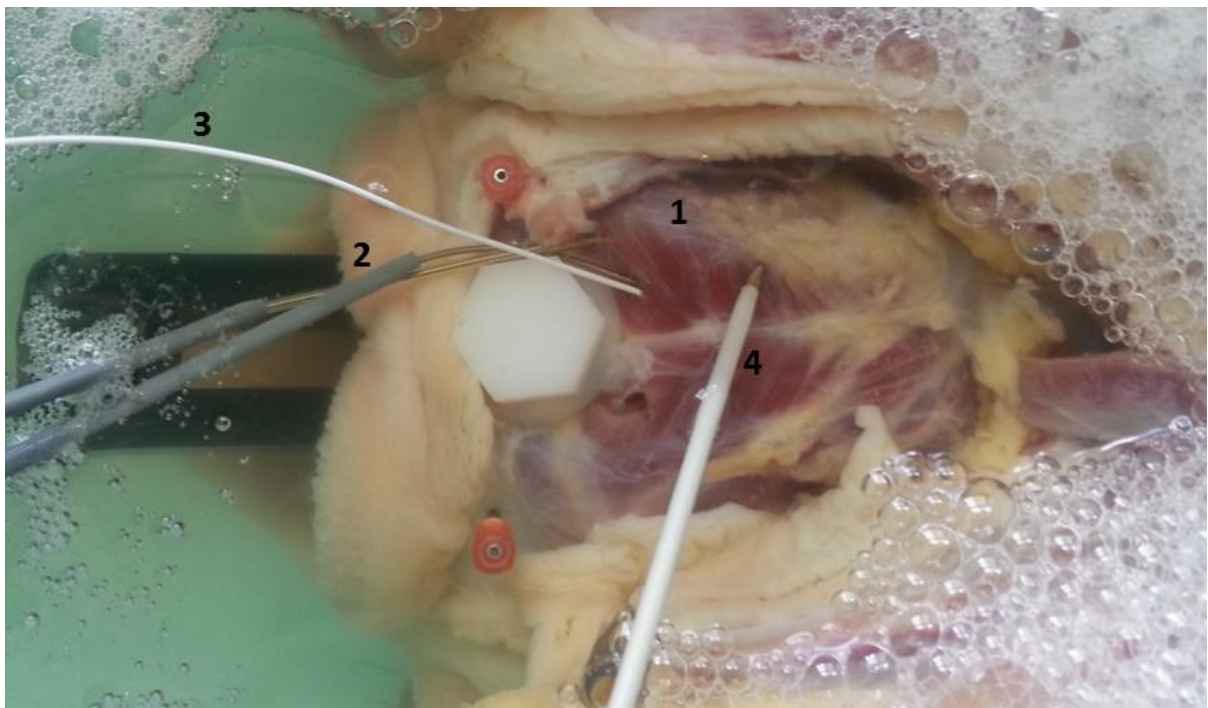


Abb. 3-4 Test auf Kontraktibilität des CAD.

In den rechten CAD (1) wurde ein Druckmesskatheter (3) implantiert. Die Stimulation erfolgte über eine externe Stimulationselektrode (4). Zusätzlich sind bereits zwei quadripolare Stimulationselektroden (2) für weitere Vitalitätstests implantiert worden.

3.3.6.2 Test der myogenen Autoregulation

Um das Vorhandensein der myogenen Autoregulation zu testen, wurde zunächst der Basisfluss 1 (Baseline 1 = BL 1) bei einem Perfusionsdruck von 9,81 kPa über fünf Minuten gemessen und daraus der Mittelwert gebildet. Danach wurde der Perfusionsdruck auf 11,77 kPa erhöht, indem der Vorratsbehälter 1 um 20 cm angehoben wurde und damit der Eingangsdruck erhöht wurde, und erneut der Perfusionsfluss über fünf Minuten gemessen. Es wurde dann jeweils der Mittelwert der Messungen im Intervall der ersten (Myo 1) und zweiten Minute (Myo 2) bestimmt. Zum Abschluss des Tests wurde der Perfusionsdruck wieder auf den Ausgangswert von 9,81 kPa zurückgesetzt und der Basisfluss 2 (BL 2) analog zum Basisfluss 1 bestimmt.

3.3.6.3 Perfusion unter Noradrenalinzugabe

Als Vasokonstriktor wurde Noradrenalin zur Testung der Gefäßreaktivität verwendet. Dazu wurden nach Testung der myogenen Autoregulation und Testung der Kontraktilität bzw. Funktionalität des CAD 2 mg Noradrenalin zuerst in 1 ml VE-Wasser gelöst und dann mit 9 ml angewärmter Perfusionslösung verdünnt. Es wurde der Basisfluss (BL 5 am Versuchsbeginn, BL 6 am Versuchsende) bestimmt und das Noradrenalin als Bolus intraarteriell verabreicht. Danach wurde der Perfusionsfluss über einen Zeitraum von fünf Minuten gemessen und daraus der Mittelwert gebildet. Die Gabe erfolgte am Anfang und am Ende des Versuchs.

3.3.6.4 Perfusion unter Nitroprussidgabe

Nitroprussid (NP) wurde als Vasodilatator zur Testung der Gefäßreaktivität verwendet. Dazu wurden 3 mg Nitroprussid zuerst in 1 ml VE-Wasser gelöst und dann mit 9 ml angewärmter Perfusionslösung verdünnt. Das Nitroprussid wurde exakt fünf Minuten nach der Noradrenalingabe verabreicht. Der Perfusionsfluss wurde über einen Zeitraum von fünf Minuten gemessen und daraus der Mittelwert gebildet. Auch hier erfolgte die Gabe am Anfang und am Ende des Versuchs. Nach der Gabe am Anfang des Versuchs erfolgte ein kompletter Wechsel des Perfusionsmediums.

3.3.6.5 Perfusion unter Papaverinzugabe

Am Versuchsende wurde Papaverin in die Perfusionsflüssigkeit gegeben, um eine maximale Vasodilatation zu erzeugen. Dazu wurden 3 mg Papaverin zuerst in 1 ml entmineralisiertem Wasser gelöst und dann mit 9 ml angewärmter Perfusionslösung verdünnt. Die Zugabe erfolgte exakt fünf Minuten nach der Nitroprussidgabe ohne Wechsel des Perfusionsmediums. Auch hier wurde der Organfluss über fünf Minuten gemessen und daraus der Mittelwert gebildet.

3.3.6.6 Bestimmung von Laktat und Laktat-Dehydrogenase

Zur Bestimmung des Laktats und der Enzymaktivität der Laktat-Dehydrogenase wurden zu Beginn der Perfusion (Messzeitpunkt 1), direkt vor dem Wechsel der Perfusionslösung (Messzeitpunkt 2) und zum Ende der Perfusion (Messzeitpunkt 3) jeweils 1 bis 4 ml der Perfusionsflüssigkeit aus der Perfusionswanne in ein Lithium-Heparin Röhrchen gegeben. Diese Röhrchen wurden bis zur Analyse im Labor der Medizinischen Tierklinik der Universität Leipzig im Gefrierschrank bei -20°C aufbewahrt.

3.3.6.7 Test der Funktionalität des CAD

Dieses Ex-vivo-Modell stellt die Grundlage für weitere elektrophysiologische Untersuchungen am Larynx des Pferdes dar. Die Funktionalität des CAD wurde bei allen fünf Pferden im Hauptversuch durch Stimulation mit zwei implantierten Stimulationselektroden getestet. In der vorliegenden Arbeit wurde nur der linke CAD stimuliert. Zuerst wurde das Insertion Tool (siehe 3.3.6.1) von kranial nach kaudal in den linken CAD eingebracht, so dass die Spitze in der Mitte der Längsachse des Muskels ventral zum Liegen kam. Diese Position wurde gewählt, weil dort laut CHEETHAM et al. (2008) zwei Äste des N. laryngeus caudalis von ventral in den CAD eintreten. Das Insertion Tool war analog zu 3.3.6.1 angeschlossen. Dann wurde mit den folgenden Parametern stimuliert: biphasischer Puls, Frequenz 1 Hz, Pulsstärke 5 mA, Pulsweite 0,01 s, Pulsform rechteckig. Es wurde die Stelle im lateralen Anteil des Muskels gesucht, die rein optisch eine maximale Abduktion der linken Stimmlippe erzeugt. Der Plastiktubus wurde im Muskel belassen und das Insertion Tool zurückgezogen. Über den Tubus wurde eine 4-polige Stimulationselektrode samt Führungsdraht eingebracht und durch 2,5 fache Drehung im Uhrzeigersinn im Muskelgewebe verankert. Der Führungsdraht wurde dann entfernt. Als nächstes wurde das Insertion Tool ca. 1 cm weiter lateral eingebracht und der gesamte Vorgang analog wie bei der ersten Stimulationselektrode mit einer zweiten Stimulationselektrode wiederholt. Die beiden Stimulationselektroden wurden über eine Adapter-Box mit dem galvanisch getrennten Spannungs-Stromwandler

verbunden. Alle vier Pole der lateralen Stimulationselektrode wurden über die Adapter-Box als Anode und die vier Pole der medialen Stimulationselektrode als Kathode geschaltet. Im nächsten Schritt wurde wie unter 3.3.6.1 beschrieben ein Druckmesskatheter eingebracht und eine Nullkalibrierung durchgeführt. Dann erfolgte die initiale Stimulation (Messung 1) mit folgenden Parametern: biphasischer Puls, Frequenz 33 Hz, Pulsstärke 5 mA, Pulsweite 0,01 s, Pulsform rechteckig. Nach zehn Sekunden wurde die Stimulation mit den gleichen Parametern wiederholt (Messung 2). Der Stimulationsversuch wurde direkt vor (Stim 1) und direkt nach Gabe der vasoaktiven Substanzen Noradrenalin und Nitroprussid (Stim 2), eine Stunde nach Stim 2 (Stim 3), zwei Stunden nach Stim 2 (Stim 4) und drei Stunden nach Stim 2 (Stim 5) jeweils mit denselben Parametern wie bei Stim 1 durchgeführt. Die Daten der intramuskulären Druckmessung wurden über die Software LabChart 8 aufgezeichnet.

3.3.6.8 Feucht-/Trockengewicht

Um quantifizieren zu können, ob es während der Perfusion zu einer Ödematisierung des Kehlkopfes kam, wurde das Verhältnis von Feuchtgewicht zu Trockengewicht bestimmt. Dazu wurden aus dem rechten M. cricothyroideus direkt vor Anschluss des Organs an die Perfusion und direkt nach Beendigung der Perfusion jeweils ein ca. 0,5 x 0,5 x 0,5 cm großes Stück Muskel entnommen und in ein Eppendorf-Gefäß verbracht. Das Gewicht des Eppendorf-Gefäßes wurde zuvor bestimmt. Dann wurde das Gewicht des entnommen Muskelstückes mittels einer Analysewaage bestimmt (Feuchtgewicht). Anschließend wurde der Muskel im Eppendorf-Gefäß für 24 Stunden bei 70°C in einem Trockenschrank getrocknet und erneut das Gewicht bestimmt (Trockengewicht). Dann wurde für beide Muskelproben die Differenz Feuchtgewicht – Trockengewicht gebildet. Daraus konnte die prozentuale Gewichtszunahme über die gesamte Perfusion und ebenso die prozentuale Gewichtszunahme pro Stunde Perfusion bestimmt werden.

3.4 Statistik

Für die statistische Auswertung der gewonnenen Daten wurden Microsoft Excel® 2010 und SigmaPlot 11.0 (Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland) verwendet. Alle Daten wurden auf Normalverteilung überprüft. Um die Unterschiede der Mittelwerte von mehreren Stichproben zu untersuchen, wurden eine einfache ANOVA mit wiederholten Messungen sowie der Holm-Sidak-Test als Post-hoc-Test im Falle signifikanter Unterschiede verwendet. Dabei wurde eine Wahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ als statistisch signifikant angenommen.

4 Ergebnisse

Das folgende Kapitel ist in drei Unterkapitel gegliedert, die den jeweiligen Versuchsphasen (Vorversuche Phase 1, Vorversuche Phase 2 und Hauptversuch) entsprechen.

4.1 Ergebnisse der Vorversuche Phase 1

Für die Vorversuche der Phase 1 wurden insgesamt vier Kehlköpfe verwendet (Versuchstiere 1 – 4), die wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben entnommen und danach perfundiert wurden (siehe Kapitel 3.3.3).

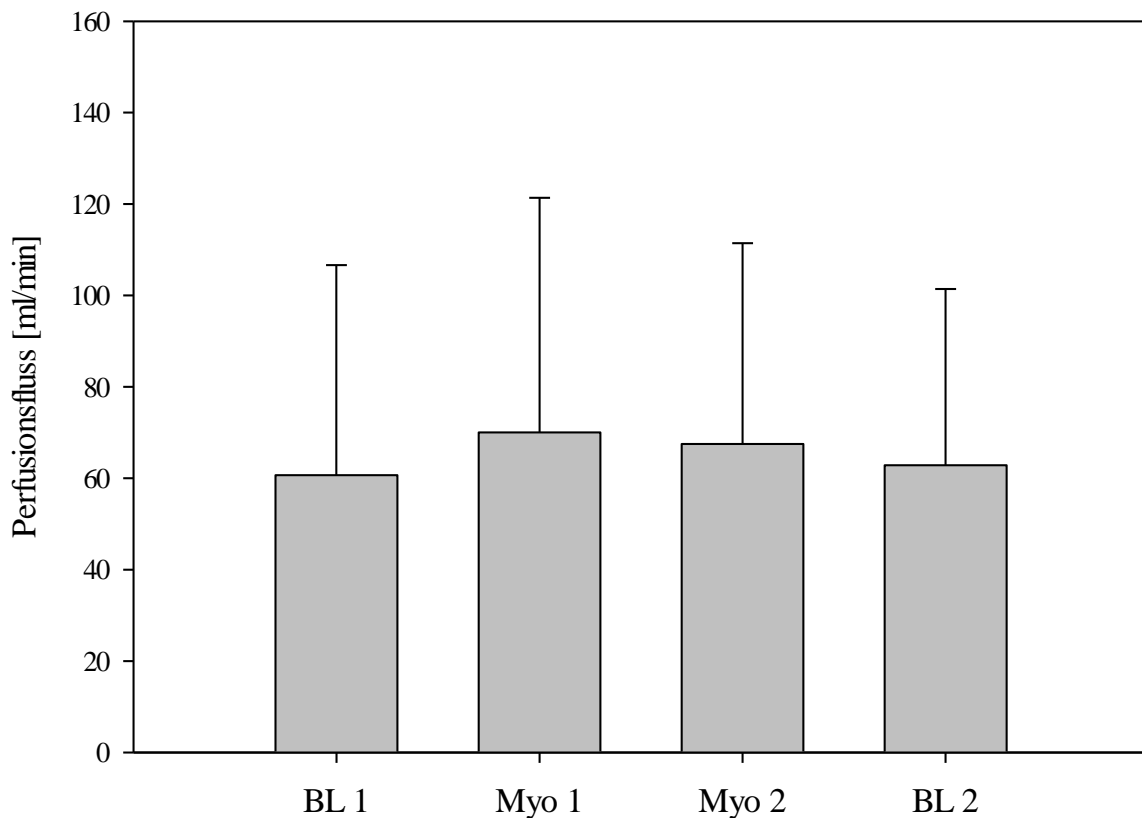


Abb. 4-1 Ergebnisse des Tests auf myogene Autoregulation der Vorversuche Phase 1. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD der Organflussmessungen ($n = 4$). Der Perfusionsdruck betrug bei BL 1 und BL 2 jeweils 9,81 kPa und bei Myo 1 und Myo 2 jeweils 11,77 kPa. Nach einer Erhöhung des Perfusionsdruckes kam es zu einem Anstieg des Perfusionsflusses (Myo 1). Nach kurzer Zeit kam es durch die myogene Autoregulation wieder zu einem leichten Absinken des Perfusionsflusses (Myo 2). Nachdem der Perfusionsdruck wieder auf den Ausgangswert zurückreguliert wurde, sank der Perfusionsfluss wieder fast auf den Anfangswert (BL 2).

Ergebnisse

Bei allen vier Versuchen wurde als Vitalitätstest der Test auf myogene Autoregulation zu Versuchsbeginn durchgeführt (siehe Kapitel 3.3.6.2). Dieser wurde als positiv gewertet, wenn folgende Bedingungen erfüllt waren: $BL\ 1 < Myo\ 1$, $Myo\ 1 > Myo\ 2$, $Myo\ 2 > BL\ 2$. Diese Bedingungen wurden bei zwei der vier Versuchstiere erfüllt. Die durchschnittliche Versuchsdauer (Zeitraum vom Tod des Tieres bis zum Ende der Perfusion) betrug $351,25 \pm 78,79$ min. Die Dauer der Perfusion betrug im Durchschnitt $289,50 \pm 68,34$ min.

4.2 Ergebnisse der Vorversuche Phase 2

Die Vorversuche der Phase 2 ($n = 7$) wurden nochmals in drei Untergruppen unterteilt (Gruppe 1: $n = 3$, Gruppe 2: $n = 2$, Gruppe 3: $n = 2$). Der Test auf myogene Autoregulation als Vitalitätstest aus Phase 1 wurde in Phase 2 erweitert. Er wurde hier zu Versuchsbeginn und zum Versuchsende hin durchgeführt. Außerdem wurden zusätzlich vasoaktive Substanzen am Versuchsbeginn und am Versuchsende jeweils nach dem Test auf myogene Autoregulation mit in das Perfusionsmedium eingeschwenkt, die eine Vasokonstriktion oder Vasodilatation erzeugten (siehe 3.3.4.2). Zur Erzeugung einer Vasokonstriktion wurde in Gruppe 1 Kaliumchlorid und zur Erzeugung einer Vasodilatation Carbachol verwendet. In Gruppe 2 wurde dann zusätzlich am Versuchsende als Vasodilatator noch Papaverin mit in das Perfusionsmedium eingeschwenkt. In Gruppe 3 hingegen wurden Noradrenalin als Vasokonstriktor und Carbachol, Nitroprussid und Papaverin als Vasodilatoren verwendet. Bei allen drei Versuchsgruppen der Phase 2 wurde der Test auf Kontraktilität des CAD (siehe 3.3.6.1) jeweils am Versuchsbeginn und am Versuchsende vor dem Test auf myogene Autoregulation durchgeführt.

4.2.1 Ergebnisse der Vorversuche Phase 2 Gruppe 1

Gruppe 1 der Vorversuche Phase 2 bestand insgesamt aus drei verwendeten Kehlköpfen (Versuchstiere 5 – 7). Die Ergebnisse des Tests auf myogene Autoregulation und der Applikation vasoaktiver Substanzen wurden jeweils in einer Abbildung zusammengefasst. Allerdings verging zwischen diesen beiden Tests eine Zeitspanne von etwa 10 bis 15 Minuten. Der Test auf myogene Autoregulation am Versuchsbeginn wurde als positiv gewertet, wenn dieselben Bedingungen wie unter 4.1 beschrieben erfüllt waren. Er wurde am Versuchsende als positiv dokumentiert, wenn Folgendes erfüllt war: $BL\ 3 < Myo\ 3$, $Myo\ 3 > Myo\ 4$, $Myo\ 4 > BL\ 4$. Eine Vasokonstriktion wurde als positiv vorhanden gewertet, wenn folgende Bedingung erfüllt war: $KCl < BL\ 2$ am Versuchsbeginn bzw. $KCl\ 2 < BL\ 4$ am Versuchsende. Die Vasodilatation wurde als positiv gewertet, wenn die Bedingung $Carba > KCl$ am Versuchsbeginn bzw. $Carba\ 2 > KCl\ 2$ am Versuchsende erfüllt war. Die

Ergebnisse

Kontraktilität des CAD konnte in allen Versuchen am Versuchsbeginn und Versuchsende erfolgreich nachgewiesen werden. Ein Beispiel für einen positiven Test ist in Abb. 4-14 dargestellt. Der Test auf myogene Autoregulation am Versuchsbeginn und am Versuchsende war bei zwei der drei Kehlköpfe positiv. Beim dritten Versuchstier versagte die myogene Autoregulation sowohl zu Beginn als auch zum Ende des Versuchs. Kaliumchlorid erzeugte sowohl am Versuchsbeginn als auch am Versuchsende bei allen drei Kehlköpfen eine Vasokonstriktion. Carbachol erzeugte am Versuchsbeginn und am Versuchsende bei einem Kehlkopf eine Vasodilatation. Die Versuchsdauer betrug im Durchschnitt $445,67 \pm 43,04$ min. Die Perfusionsdauer lag in dieser Versuchsgruppe durchschnittlich bei $390,33 \pm 37,73$ min.

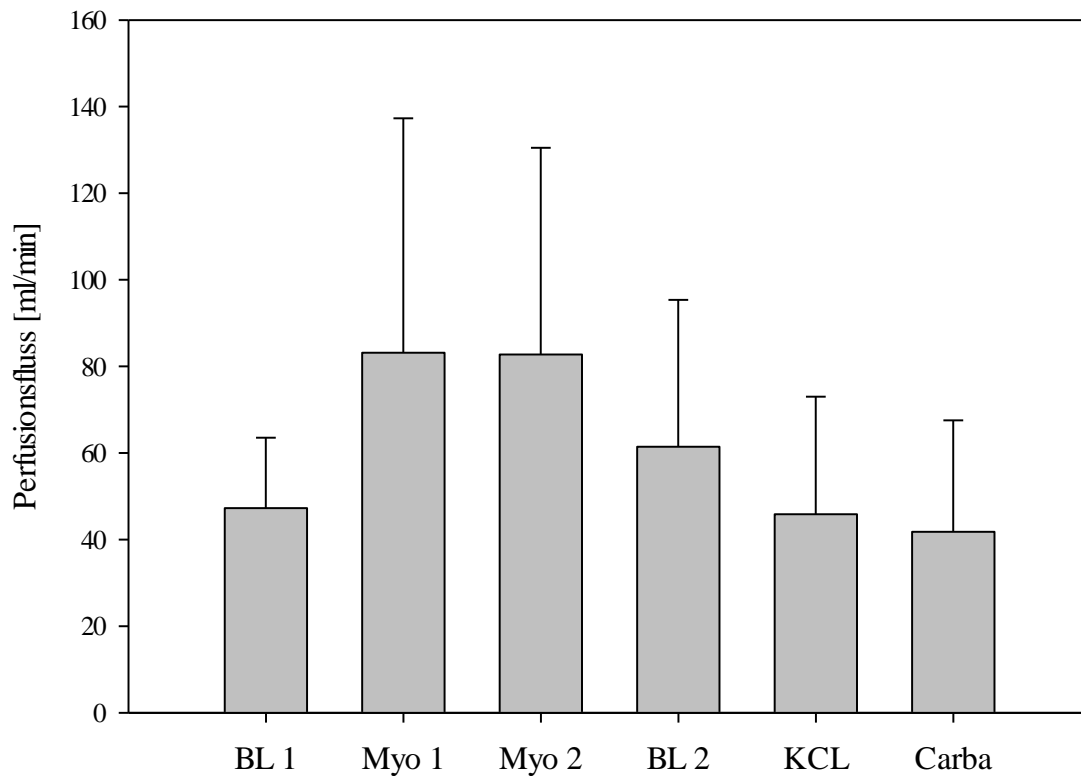


Abb. 4-2 Ergebnisse der Vitalitätstests aus den Vorversuchen Phase 2: Gruppe 1 Versuchsbeginn.

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD ($n = 3$). Für BL 1, BL 2, KCl und Carba betrug der Perfusionsdruck jeweils 9,81 kPa und für Myo 1 und Myo 2 jeweils 11,77 kPa. Nach dem Test auf myogene Autoregulation (BL 1 bis BL2) führte die anschließende Applikation von KCl über eine Vasokonstriktion zur Abnahme des Perfusionsflusses (KCL). Die anschließende Zugabe von Carbachol führte nicht wie erwartet zu einer Zunahme des Perfusionsflusses (Carba).

Ergebnisse

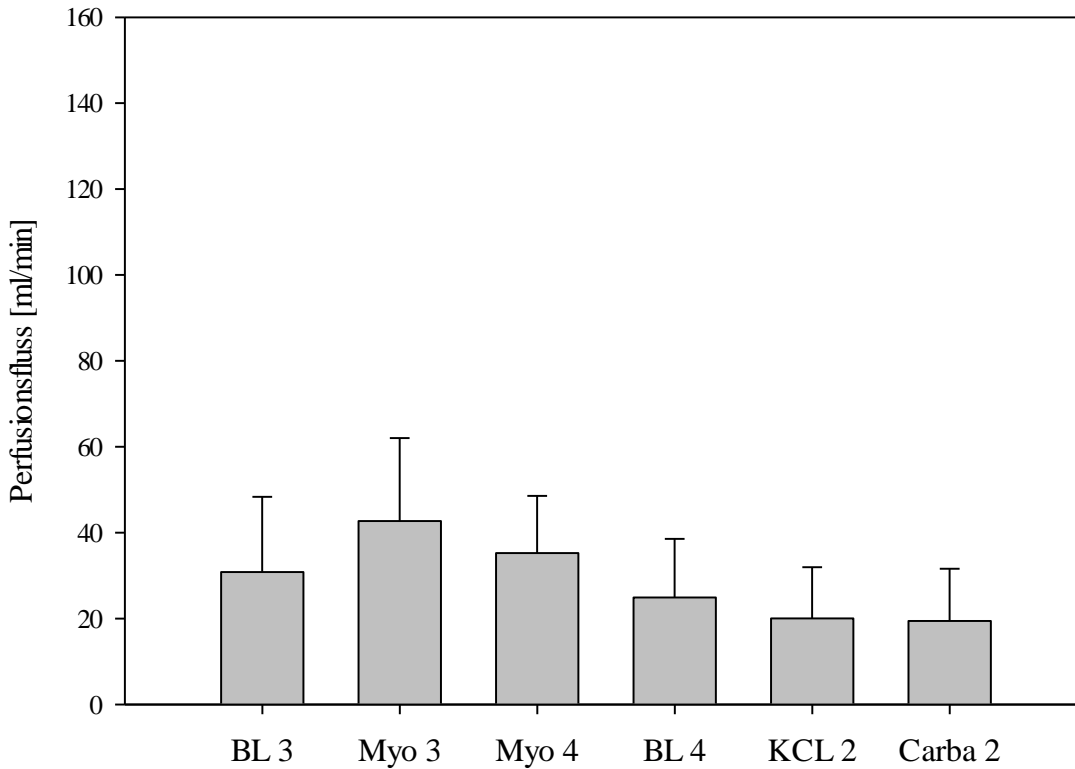


Abb. 4-3 Ergebnisse der Vitalitätstests aus den Vorversuchen Phase 2: Gruppe 1 Versuchsende.

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD ($n = 3$). Für BL 1, BL 2, KCl und Carba betrug der Perfusionsdruck jeweils 9,81 kPa und für Myo 1 und Myo 2 jeweils 11,77 kPa.

4.2.2 Ergebnisse der Vorversuche Phase 2 Gruppe 2

Für die Gruppe 2 der Vorversuche Phase 2 wurden die Kehlköpfe von zwei Pferden verwendet (Versuchstiere 8 und 9). Die Vasokonstriktion durch Kaliumchlorid und die Vasodilatation durch Carbachol wurden jeweils als positiv gewertet, wenn die unter 4.2.1 genannten Bedingungen erfüllt wurden. Eine durch Papaverin erzeugte Vasodilatation wurde als positiv interpretiert, wenn die Bedingung $Papa > Carba 2$ erfüllt wurde. Der Test auf myogene Autoregulation war bei beiden Versuchstieren am Versuchsbeginn positiv, am Versuchsende allerdings negativ. Eine Vasokonstriktion konnte bei allen Versuchen in dieser Gruppe durch KCl-Einschwemmung erfolgreich erzeugt werden. Eine Vasodilatation durch Carbachol konnte bei keinem der Versuche erreicht werden. Die Einschwemmung von Papaverin am Versuchsende führte bei beiden Versuchstieren zu einer Vasodilatation. Der Test auf Kontraktilität des CAD wurde in allen Versuchen positiv detektiert. Die Gesamtdauer der Versuche betrug im Durchschnitt $384 \pm 165,46$ min und die Perfusionsdauer $334,50 \pm 167,58$ min.

Ergebnisse

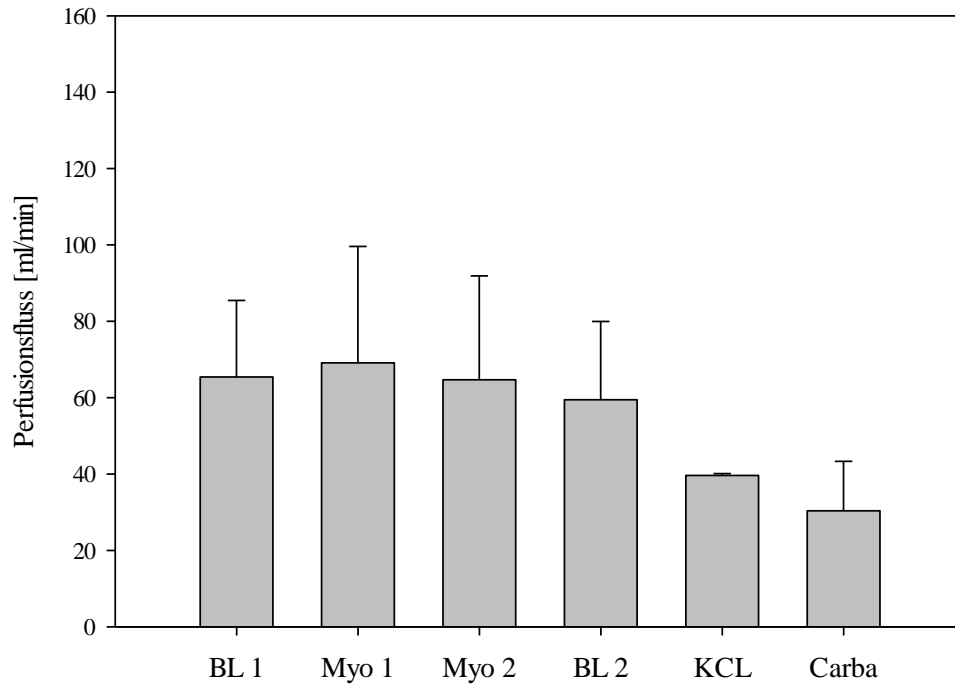


Abb. 4-4 Ergebnisse der Vitalitätstests aus den Vorversuchen Phase 2: Gruppe 2 Versuchsbeginn.

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD ($n = 2$). Für BL 1, BL 2, KCl und Carba betrug der Perfusionsdruck jeweils 9,81 kPa und für Myo 1 und Myo 2 jeweils 11,77 kPa.

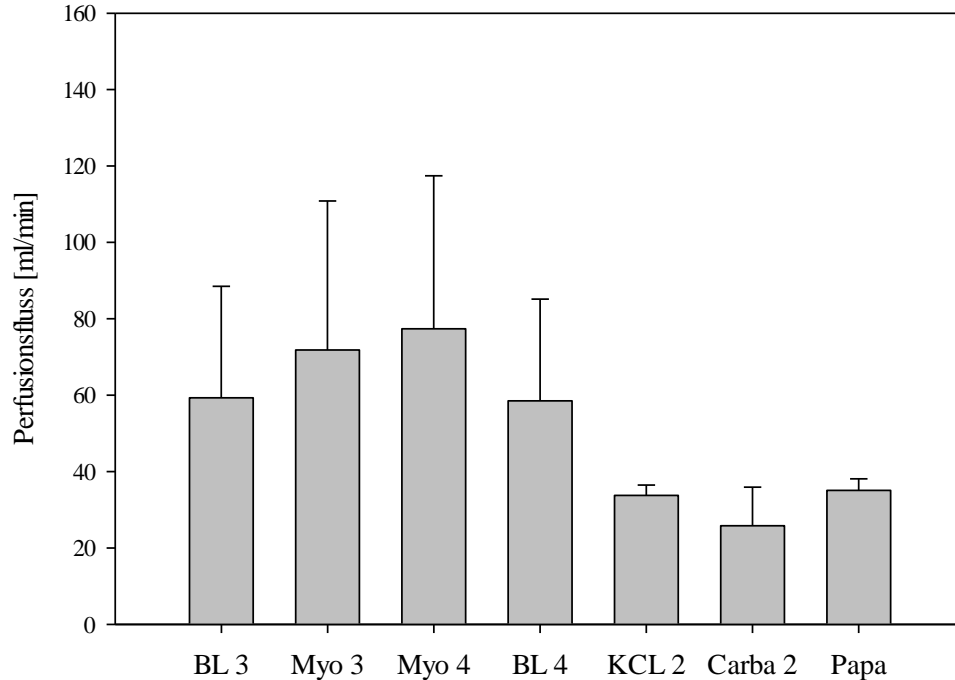


Abb. 4-5 Ergebnisse der Vitalitätstests aus den Vorversuchen Phase 2: Gruppe 2 Versuchsende.

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD ($n = 2$). Für BL 3, BL 4, KCl 2, Carba 2 und Papa betrug der Perfusionsdruck jeweils 9,81 kPa und für Myo 1 und Myo 2 jeweils 11,77 kPa.

4.2.3 Ergebnisse der Vorversuche Phase 2 Gruppe 3

Gruppe 3 der Vorversuche der Phase 2 bestand aus zwei verwendeten Kehlköpfen (Versuchstiere 10 und 11). Im Gegensatz zu den Gruppen 1 und 2 wurde hier Noradrenalin als Vasokonstriktor verwendet. Bei Versuchstier 10 wurden Carbachol und Papaverin als Vasodilatoren beibehalten. Bei Versuchstier 11 hingegen wurden Nitroprussid und Papaverin als Vasodilatoren eingesetzt. Da in dieser Versuchsgruppe alle vasoaktiven Substanzen direkt in die A. thyroidea cranialis appliziert und nicht wie in den beiden Versuchsgruppen zuvor in die Perfusionsflüssigkeit eingeschwemmt wurden, wurden diese zwei Versuchstiere zu einer Versuchsgruppe zusammengefasst. Der Test auf Kontraktilität des CAD fiel bei allen Versuchen jeweils positiv aus. In dieser Gruppe sind die Ergebnisse des Test auf myogene Autoregulation und der Perfusion unter Zugabe von vasoaktiven Substanzen in getrennten Abbildungen dargestellt, da eine zusätzliche Baseline (BL 5 bei Testung am Versuchsbeginn bzw. BL 6 bei Testung am Versuchsende) gemessen wurde (siehe 3.3.6.3), auf die sich dann die Ergebnisse der Noradrenalin-, Carbachol-, Nitroprussid- und Papaverin-Zugabe beziehen. Der Test auf myogene Autoregulation wurde bei beiden Versuchstieren am Versuchsbeginn als negativ und am Versuchsende bei einem der zwei Tiere als negativ gewertet. Noradrenalin erzeugte bei jeder Gabe eine Vasokonstriktion. Während die Applikation von Carbachol zu keiner Vasodilatation führte, erzeugten Nitroprussid und Papaverin bei jeder Gabe eine Vasodilatation. In dieser Gruppe lag die durchschnittliche Versuchsdauer bei $470,50 \pm 64,35$ min. Die Perfusionsdauer betrug im Durchschnitt $415 \pm 56,57$ min.

Ergebnisse

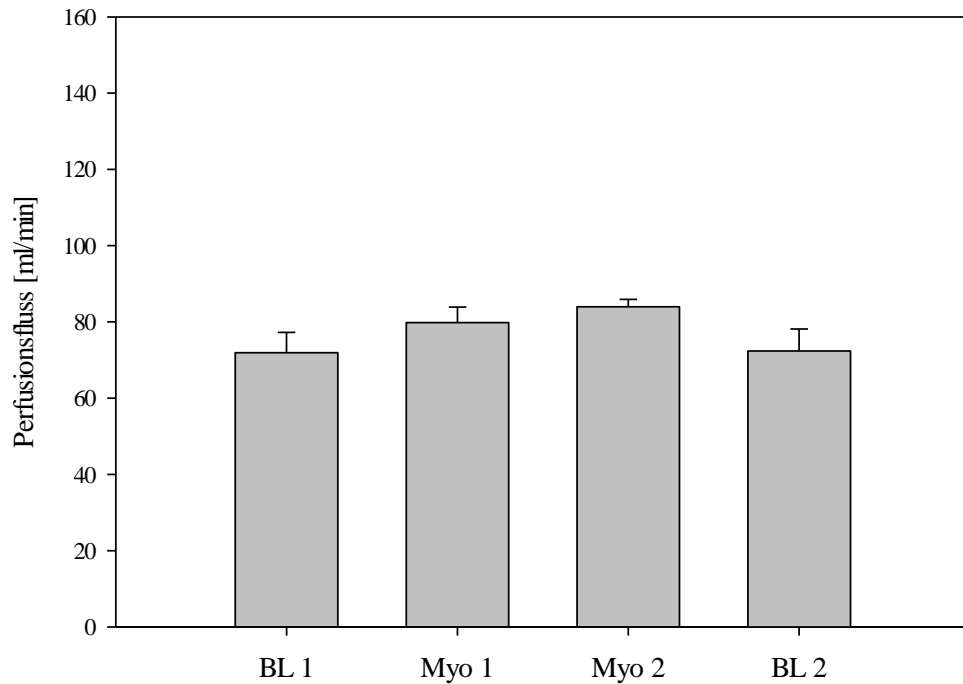


Abb. 4-6 Ergebnisse des Tests auf myogene Autoregulation, Versuchstier 10, Versuchsbeginn.

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD ($n = 1$). Für BL 1 und BL 2, betrug der Perfusionsdruck jeweils 9,81 kPa und für Myo 1 und Myo 2 jeweils 11,77 kPa.

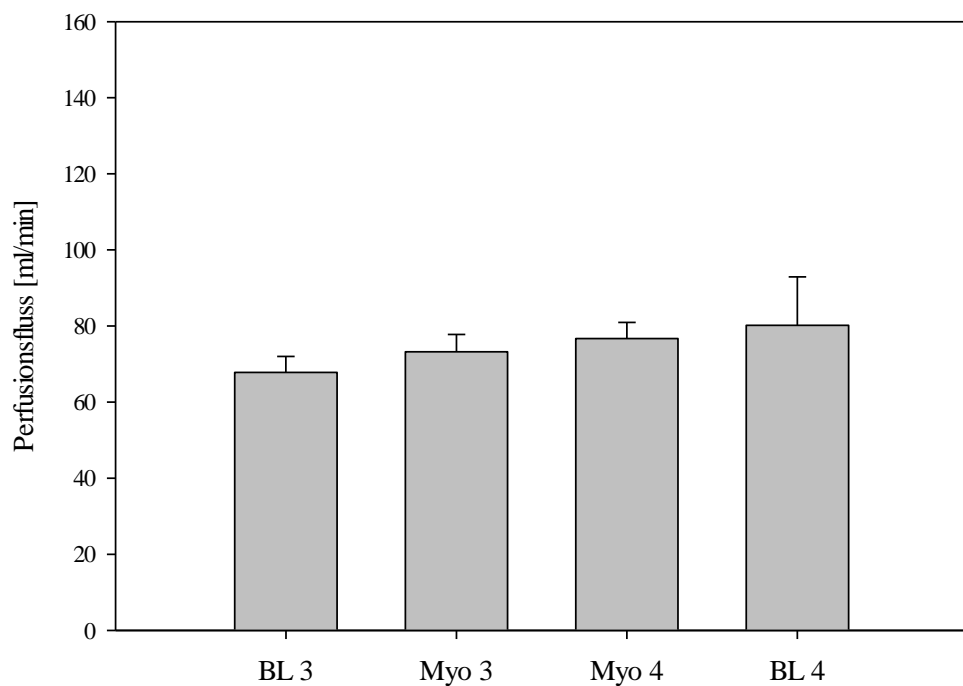


Abb. 4-7 Ergebnisse des Tests auf myogene Autoregulation, Versuchstier 10, Versuchsende.

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD ($n = 1$). Für BL 3 und BL 4, betrug der Perfusionsdruck jeweils 9,81 kPa und für Myo 3 und Myo 4 jeweils 11,77 kPa.

Ergebnisse

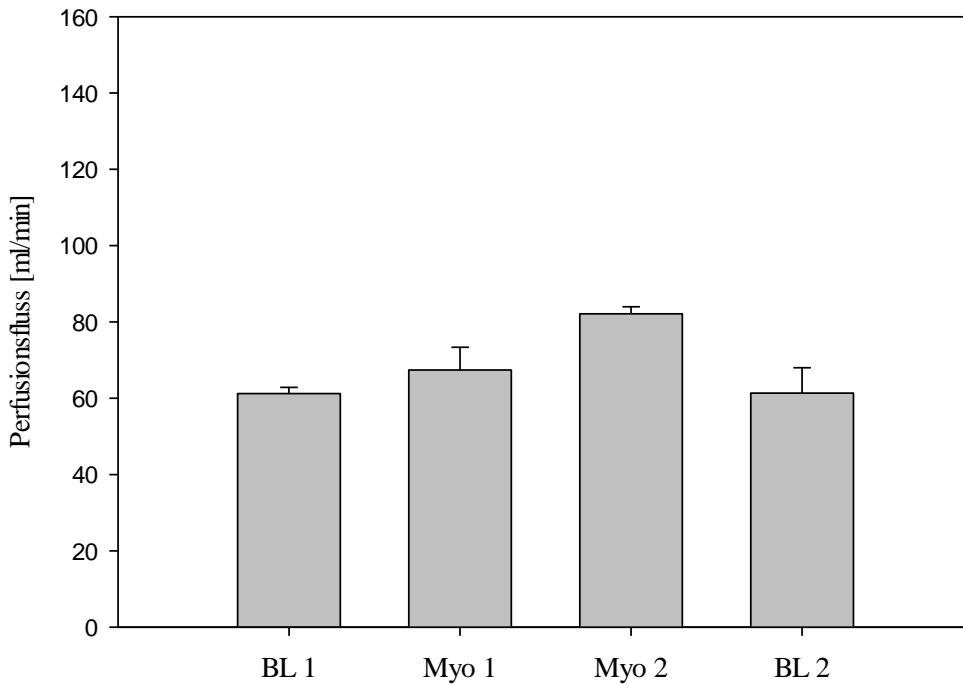


Abb. 4-8 Ergebnisse des Tests auf myogene Autoregulation, Versuchstier 11, Versuchsbeginn.

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD ($n = 1$). Für BL 1 und BL 2, betrug der Perfusionsdruck jeweils 9,81 kPa und für Myo 1 und Myo 2 jeweils 11,77 kPa.

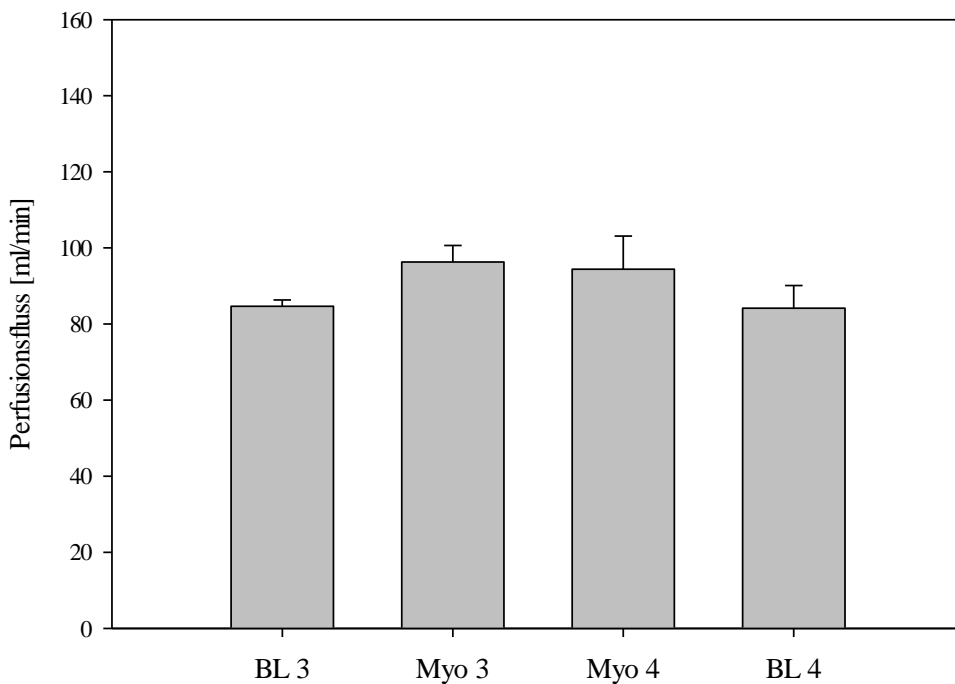


Abb. 4-9 Ergebnisse des Tests auf myogene Autoregulation, Versuchstier 11, Versuchsende.

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD ($n = 1$). Für BL 3 und BL 4, betrug der Perfusionsdruck jeweils 9,81 kPa und für Myo 3 und Myo 4 jeweils 11,77 kPa.

Ergebnisse

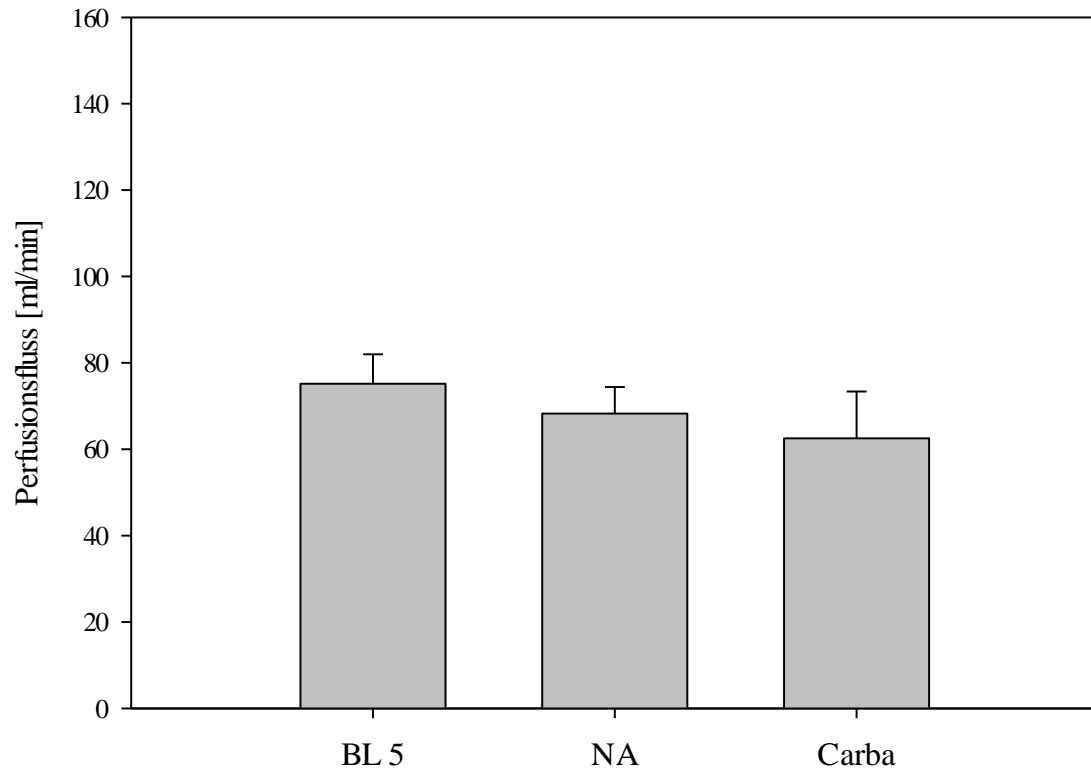


Abb. 4-10 Versuchstier 10: Perfusionsfluss unter Zugabe von Noradrenalin und Carbachol am Versuchsbeginn.

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD ($n = 1$). Die Zugabe von Noradrenalin (NA) erzeugte in Bezug auf den Basisfluss (BL 5) über eine Vasokonstriktion einen Abfall des Perfusionsflusses. Carbachol (Carba) hingegen erzeugte in Bezug auf NA nicht die erwünschte Vasodilatation und somit eine Zunahme des Perfusionsflusses.

Ergebnisse

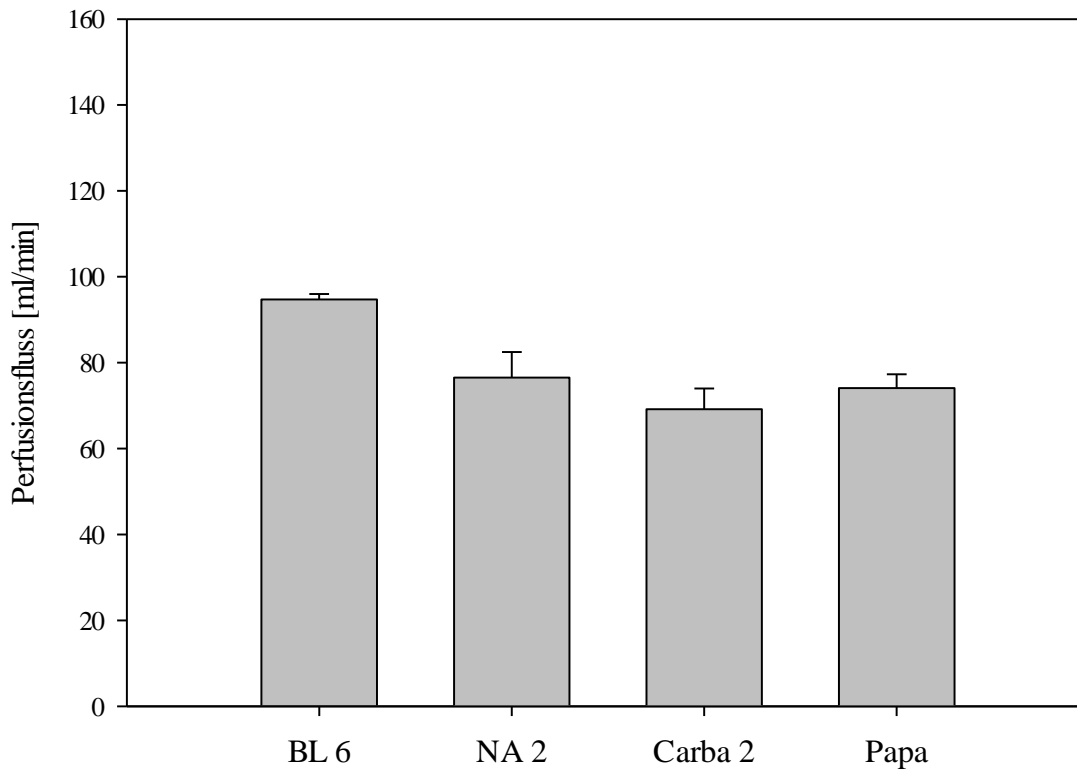


Abb. 4-11 Versuchstier 10: Perfusionsfluss unter Zugabe von Noradrenalin, Carbachol und Papaverin am Versuchsende.

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD ($n = 1$). Noradrenalin (NA 2) erzeugte nach seiner Zugabe in Bezug auf den Basisfluss (BL 6) eine Vasokonstriktion mit daraus resultierender Abnahme des Perfusionsflusses. Carbachol (Carba 2) hingegen erzeugte in Bezug auf NA nicht die erwünschte Vasodilatation mit Zunahme des Perfusionsflusses. Das anschließend verwendete Papaverin (Papa) erzeugte nur in Bezug auf Carba 2 eine Zunahme des Perfusionsflusses.

Ergebnisse

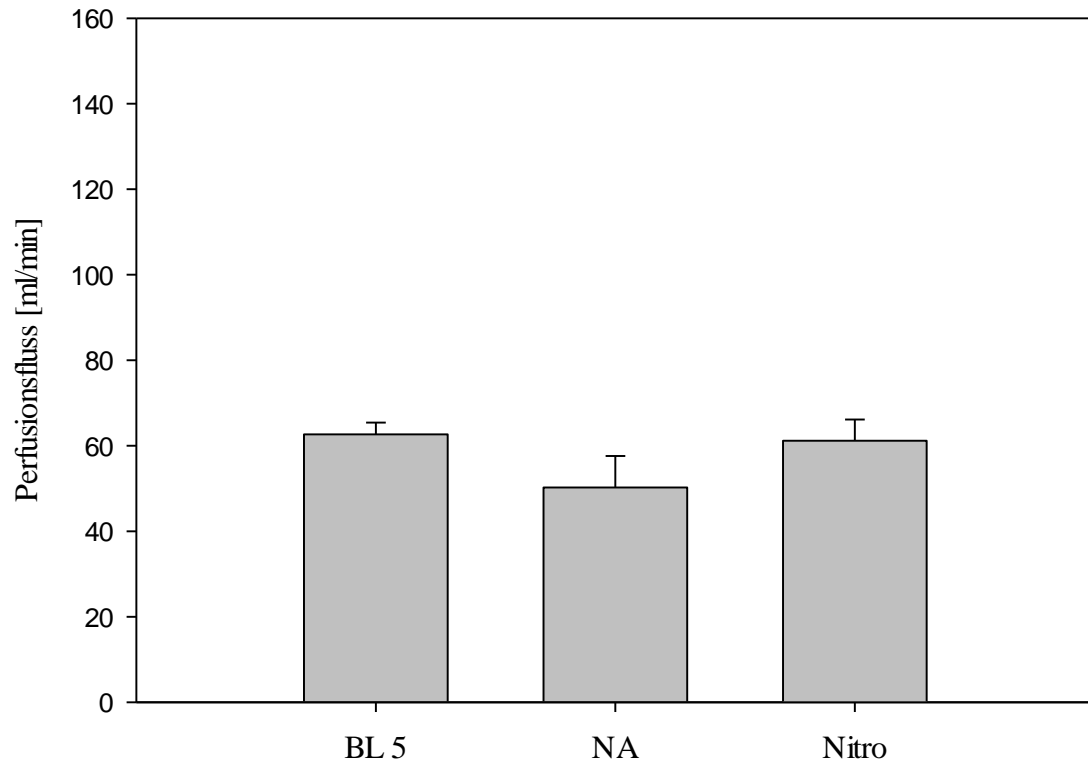


Abb. 4-12 Versuchstier 11: Perfusionsfluss unter Zugabe von Noradrenalin und Nitroprussid am Versuchsbeginn.

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD ($n = 1$). Die Zugabe von Noradrenalin (NA) führte in Bezug auf den Basisfluss (BL 5) zu einer Abnahme des Perfusionsflusses. Die darauffolgende Applikation von Nitroprussid (Nitro) führte in Bezug auf NA dann zu einer Vasodilatation mit deutlicher Steigerung des Perfusionsflusses.

Ergebnisse

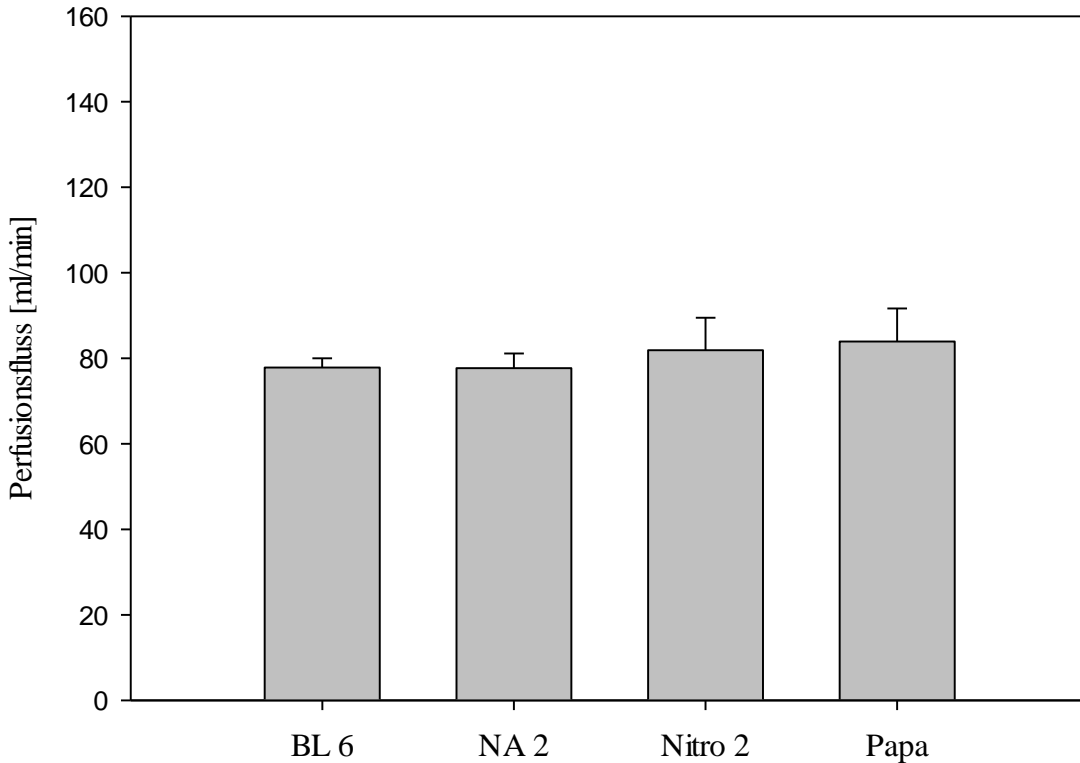


Abb. 4-13 Versuchstier 11: Perfusionsfluss unter Zugabe von Noradrenalin, Nitroprussid und Papaverin am Versuchsende.

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD ($n = 1$). Die Applikation von Noradrenalin (NA 2) am Versuchsende führte in Bezug auf den Basisfluss (BL 6) nur zu einer minimalen Vasokonstriktion mit Abnahme des Perfusionsflusses. Das anschließend zugegebene Nitroprussid (Nitro 2) führte sowohl in Bezug auf BL 6 als auch NA 2 über eine Vasodilatation zu einer Steigerung des Perfusionsflusses. Das zum Abschluss verwendete Papaverin (Papa) führte in Bezug auf alle drei vorherigen Messungen zu einer Zunahme des Perfusionsflusses.

4.3 Ergebnisse des Hauptversuchs

Im Rahmen des Hauptversuchs wurden Kehlköpfe von insgesamt fünf Pferden (Versuchstiere 12 – 16) verwendet. Um die Vitalität der entnommenen Organe zu testen, wurde die Kontraktilität des CAD zu Versuchsbeginn und am Versuchsende getestet. Weiterhin wurde der Test auf myogene Autoregulation zu Versuchsbeginn und -ende durchgeführt. Nach diesem Vitalitätstest wurden Noradrenalin und Nitroprussid am Versuchsbeginn und Noradrenalin, Nitroprussid und Papaverin am Versuchsende direkt in den Perfusionskreislauf gegeben. Außerdem wurden Laktat und die Enzymaktivität der Laktat-Dehydrogenase im Perfusionsmedium in der Perfusionswanne an drei verschiedenen Zeitpunkten bestimmt (siehe 3.3.6.6). Als zusätzlicher Vitalitätstest wurde die Funktionalität des CAD mittels Elektrodenstimulation überprüft (siehe 3.3.6.7). Die Ergebnisse der einzelnen Vitalitätstests sind in den folgenden Kapiteln 4.3.1 bis 4.3.5 dargestellt. Bei den Versuchstieren des

Ergebnisse

Hauptversuchs lag die Versuchsdauer im Durchschnitt bei $400,60 \pm 27,73$ min. Die Perfusionsdauer betrug durchschnittlich $352 \pm 20,78$ min.

4.3.1 Test der Kontraktilität des CAD

Der Test auf Kontraktilität des CAD fiel bei allen Versuchen der Hauptversuche am Versuchsbeginn und am Versuchsende positiv aus.

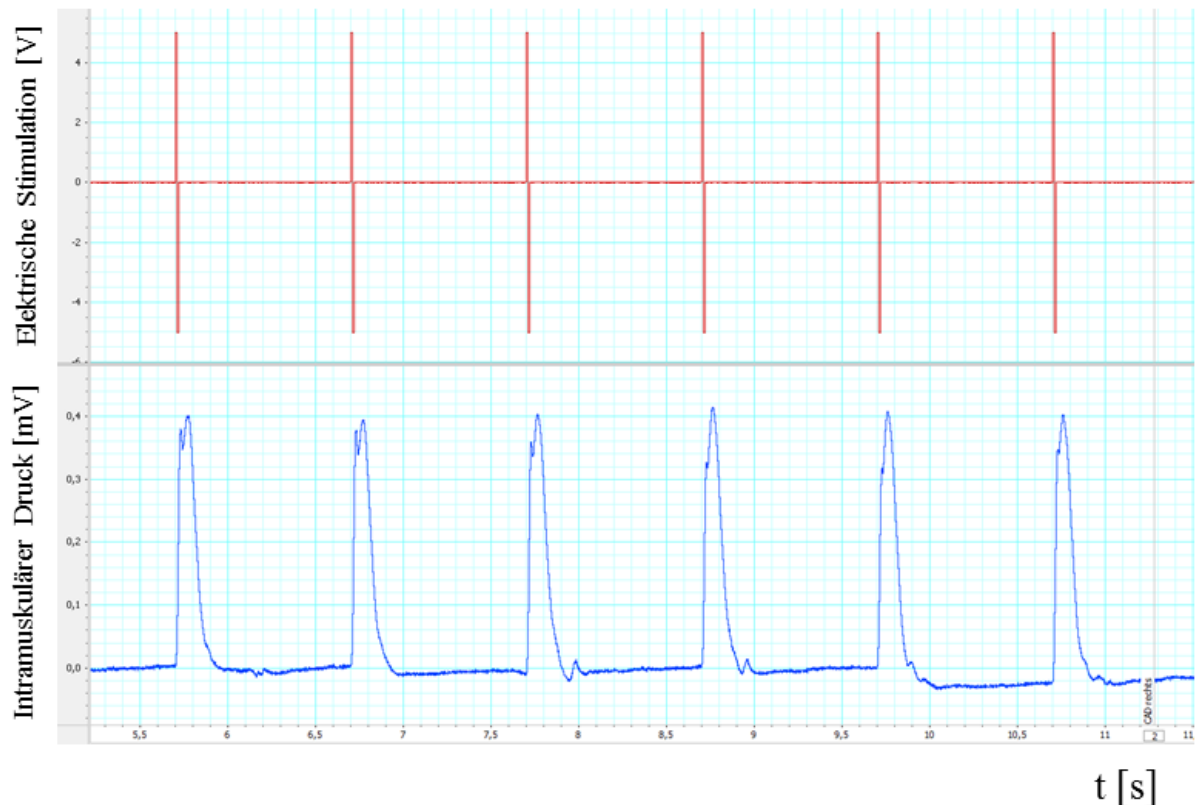


Abb. 4-14 Beispiel für einen positiven Test der Kontraktilität des CAD zum Versuchsende.

Auf jede elektrische Stimulation (oben, in rot dargestellt) erfolgt ein Anstieg des intramuskulären Drucks (unten, in blau dargestellt), der durch eine Kontraktion des Muskels erzeugt wird. Der Test auf Kontraktilität erfolgte in diesem Beispiel am rechten CAD.

4.3.2 Test der myogenen Autoregulation

Der Test auf das Vorhandensein der myogenen Autoregulation wurde analog zu den Vorversuchen wie unter 3.3.6.2 beschrieben jeweils zu Versuchsbeginn und Versuchsende durchgeführt. Die myogene Autoregulation war bei den ersten beiden der fünf entnommenen Kehlköpfe am Versuchsbeginn nicht vorhanden, am Versuchsende hingegen sichtbar. Beim dritten Versuchstier war sie zum Ende des Versuches nicht nachweisbar. Die letzten zwei verwendeten Kehlköpfe zeigten sowohl zu Versuchsbeginn als auch am Versuchsende eine vorhandene myogene Autoregulation.

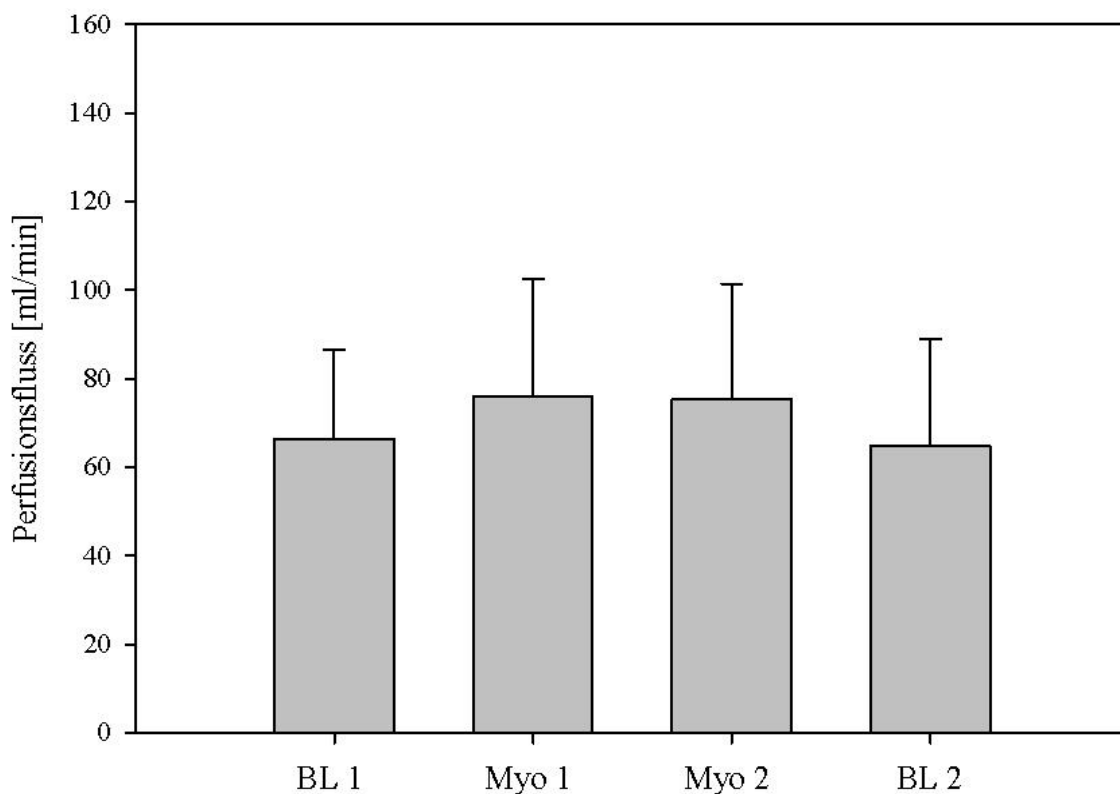


Abb. 4-15 Ergebnisse des Tests auf myogene Autoregulation am Versuchsbeginn. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD ($n = 5$). Für BL 1 und BL 2, betrug der Perfusionsdruck jeweils 9,81 kPa und für Myo 1 und Myo 2 jeweils 11,77 kPa.

Ergebnisse

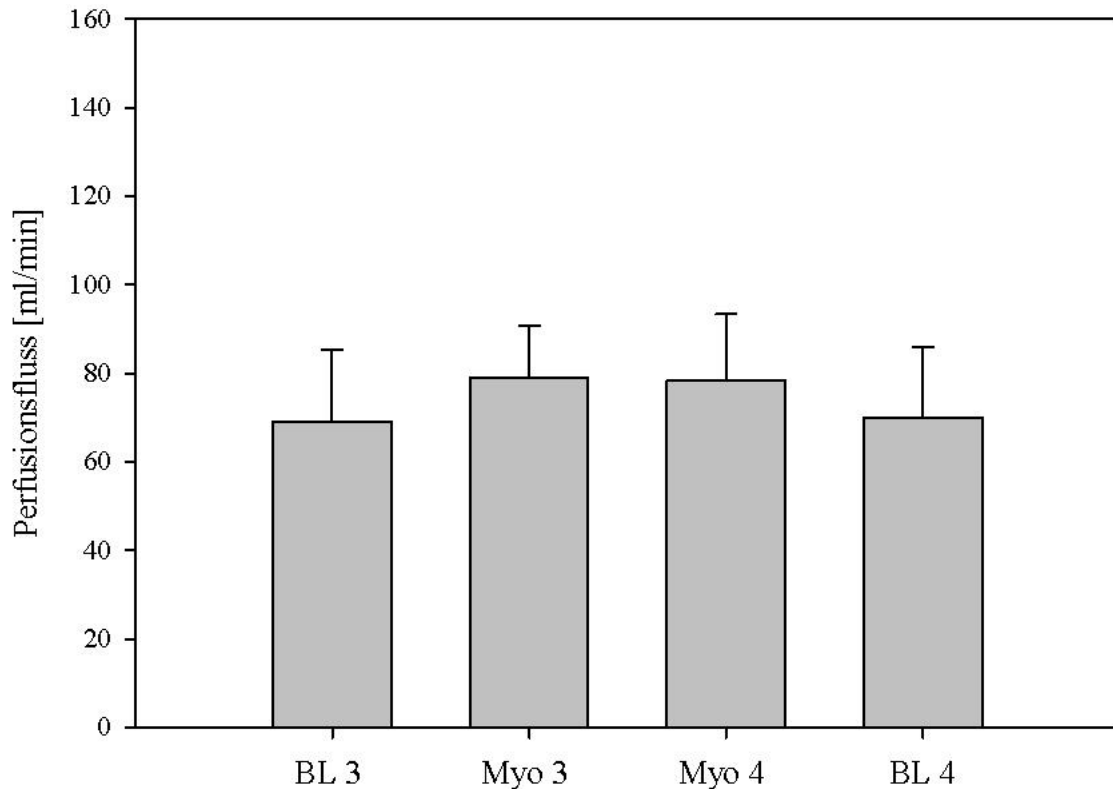


Abb. 4-16 Ergebnisse des Tests auf myogene Autoregulation am Versuchsende. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD (n = 5). Für BL 3 und BL 4, betrug der Perfusionsdruck jeweils 9,81 kPa und für Myo 3 und Myo 4 jeweils 11,77 kPa.

4.3.3 Perfusion unter Zugabe von Noradrenalin / Nitroprussid / Papaverin

Die durch Zugabe von Noradrenalin ausgelöste Vasokonstriktion wurde als positiv gewertet, wenn folgende Bedingung erfüllt wurde: BL 5 > NA bzw. BL 6 > NA 2. Dies wurde zu Versuchsbeginn bei vier von fünf Organen und am Versuchsende bei allen fünf Organen erfüllt. Eine durch Nitroprussid erzeugte Vasodilatation galt als positiv, wenn Nitro > NA bzw. Nitro 2 > NA 2 war. Nitroprussid erzeugte nach seiner Zugabe am Versuchsbeginn bei vier der Organe und am Versuchsende bei allen fünf Organen eine Vasodilatation. Am Versuchsende wurde Papaverin eingeschwenkt. Eine dadurch erzeugte verstärkte Vasodilatation wurde als positiv beurteilt, wenn die Bedingung Papa > Nitro 2 erfüllt wurde. Dies war bei allen fünf Versuchen der Fall.

Ergebnisse

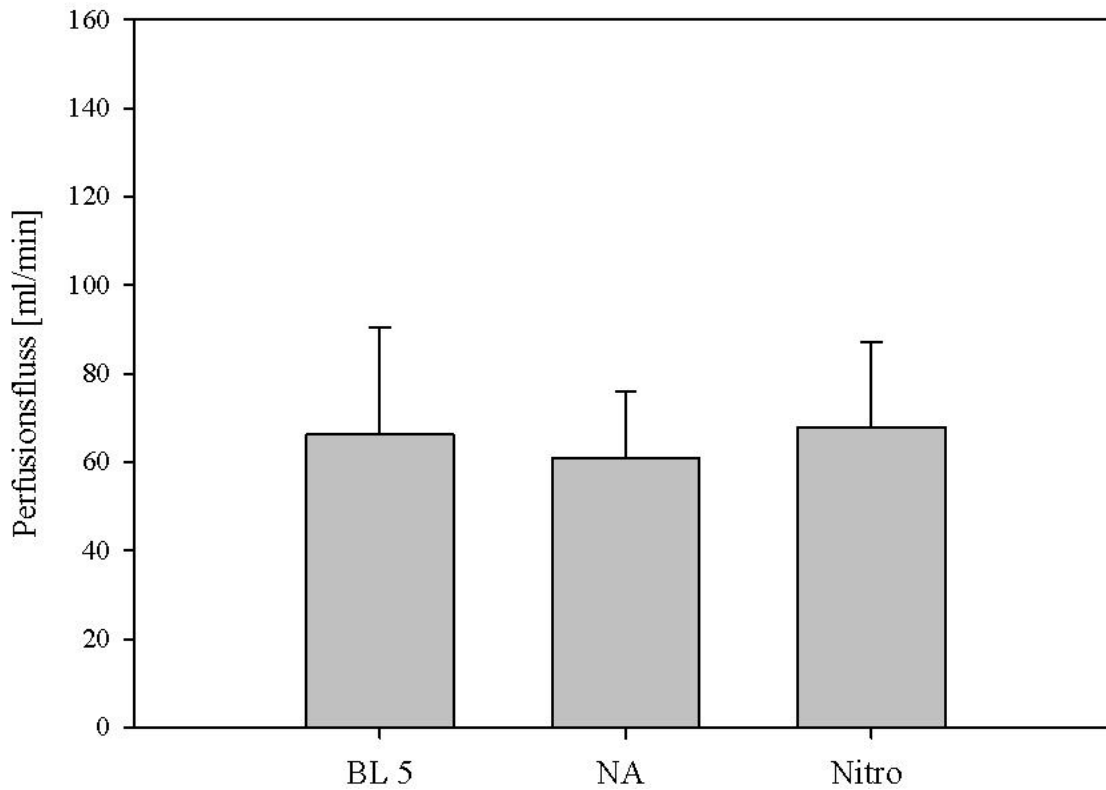


Abb. 4-17 Perfusionsfluss unter Zugabe von Noradrenalin und Nitroprussid am Versuchsbeginn.

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD ($n = 5$). Die Zugabe von Noradrenalin (NA) erzeugte in Bezug auf den Basisfluss (BL 5) eine Vasokonstriktion mit Abnahme des Perfusionsflusses. Nitroprussid (Nitro) hingegen erzeugte in Bezug auf NA eine Vasodilatation mit Steigerung des Perfusionsflusses.

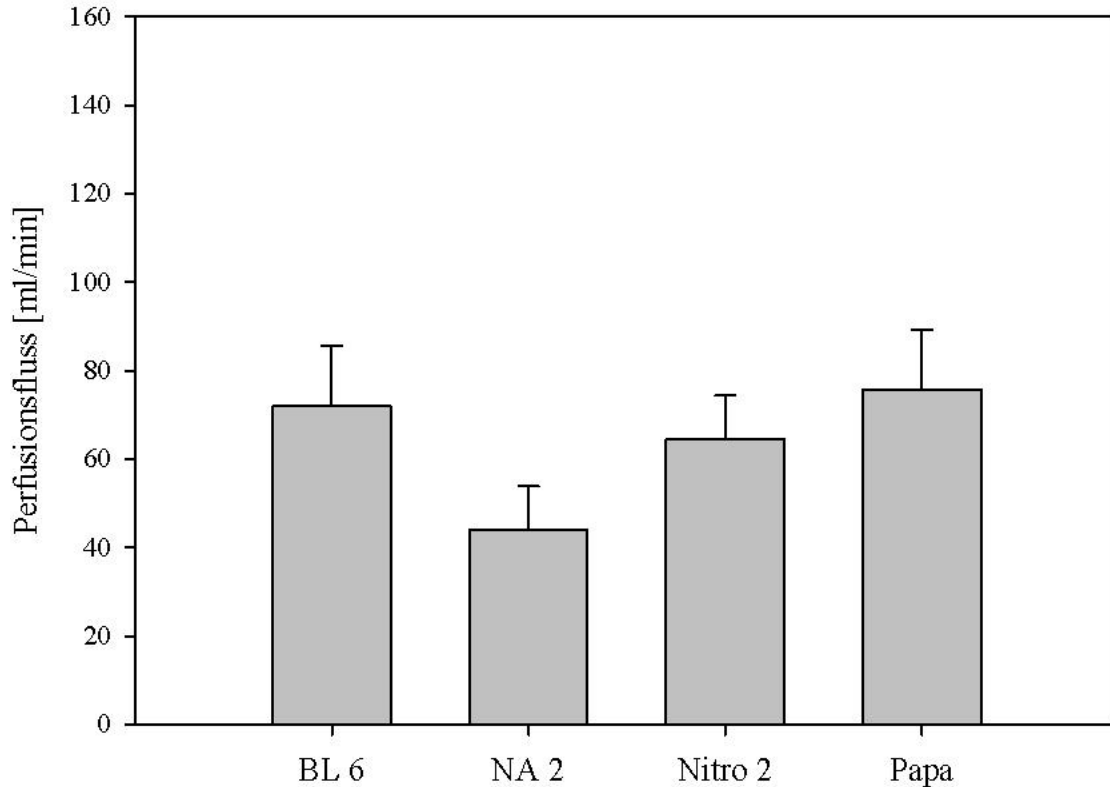


Abb. 4-18 Perfusionsfluss unter Zugabe von Noradrenalin, Nitroprussid und Papaverin am Versuchsende.

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD ($n = 5$). Die Zugabe von Noradrenalin (NA 2) erzeugte in Bezug auf den Basisfluss (BL 6) eine Vasokonstriktion mit deutlicher Abnahme des Perfusionsflusses. Nitroprussid (Nitro 2) hingegen erzeugte in Bezug auf NA 2 eine Vasodilatation mit Steigerung des Perfusionsflusses. Das applizierte Papaverin (Papa) erzeugte schließlich eine verstärkte Vasodilatation in Bezug auf Nitro 2.

4.3.4 Laktat und Laktat-Dehydrogenase

Die Konzentration von Laktat und die Enzymaktivität der Laktat-Dehydrogenase wurden bei allen fünf Versuchstieren des Hauptversuchs zu drei verschiedenen Messzeitpunkten bestimmt: am Versuchsbeginn (Messzeitpunkt 1), direkt vor dem Wechsel der Perfusionslösung (Messzeitpunkt 2) und zum Ende der Perfusion (Messzeitpunkt 3) (siehe 3.3.6.6). Bei allen fünf verwendeten Organen fiel ein geringer Anstieg der Enzymaktivität der Laktat-Dehydrogenase vom Messzeitpunkt 1 ($11,00 \pm 8,49$ U/l) zum Messzeitpunkt 2 ($31,00 \pm 32,04$ U/l) und ein deutlicher Anstieg vom Messzeitpunkt 2 zum Messzeitpunkt 3 ($259,20 \pm 172,76$ U/l) auf (siehe Abb. 4-20). Sowohl der Anstieg vom Messzeitpunkt 1 zu 3 als auch der Anstieg von Messzeitpunkt 2 zu 3 waren beide signifikant ($p < 0,05$). Es fällt auf, dass der Endwert bei Versuchstier 12 und 13 (39 U/l bzw. 105 U/l) deutlich niedriger ist als bei den anderen drei Versuchstieren (383 U/l, 371 U/l und 399 U/l).

Ergebnisse

Die Konzentration des Laktats stieg ebenfalls bei allen fünf Versuchstieren im Laufe des Versuchs an. Hierbei wurde ein Endwert von $1,68 \pm 0,33$ mmol/l erreicht. Der Anstieg von Messzeitpunkt 2 und 3 in Bezug auf Messzeitpunkt 1 und von Messzeitpunkt 3 in Bezug auf Messzeitpunkt 2 war jeweils statistisch signifikant ($p < 0,05$).

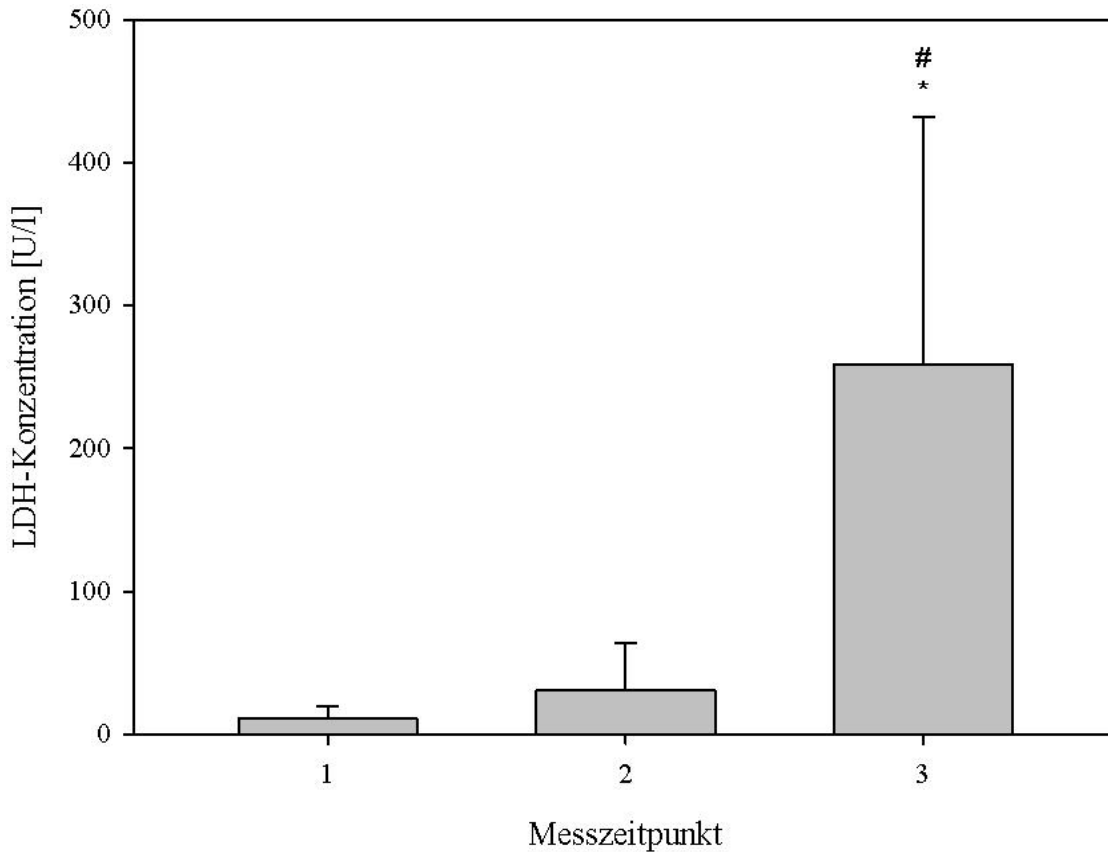


Abb. 4-19 Enzymaktivität der Laktat-Dehydrogenase im Verlauf des Versuches. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD ($n = 5$). Messzeitpunkt 1: am Versuchsbeginn, Messzeitpunkt 2: direkt vor dem Wechsel der Perfusionslösung, Messzeitpunkt 3: zum Ende der Perfusion. * $p < 0,05$ vs. Messzeitpunkt 1, # $p < 0,05$ vs. Messzeitpunkt 2 (einfache ANOVA mit wiederholten Messungen).

Ergebnisse

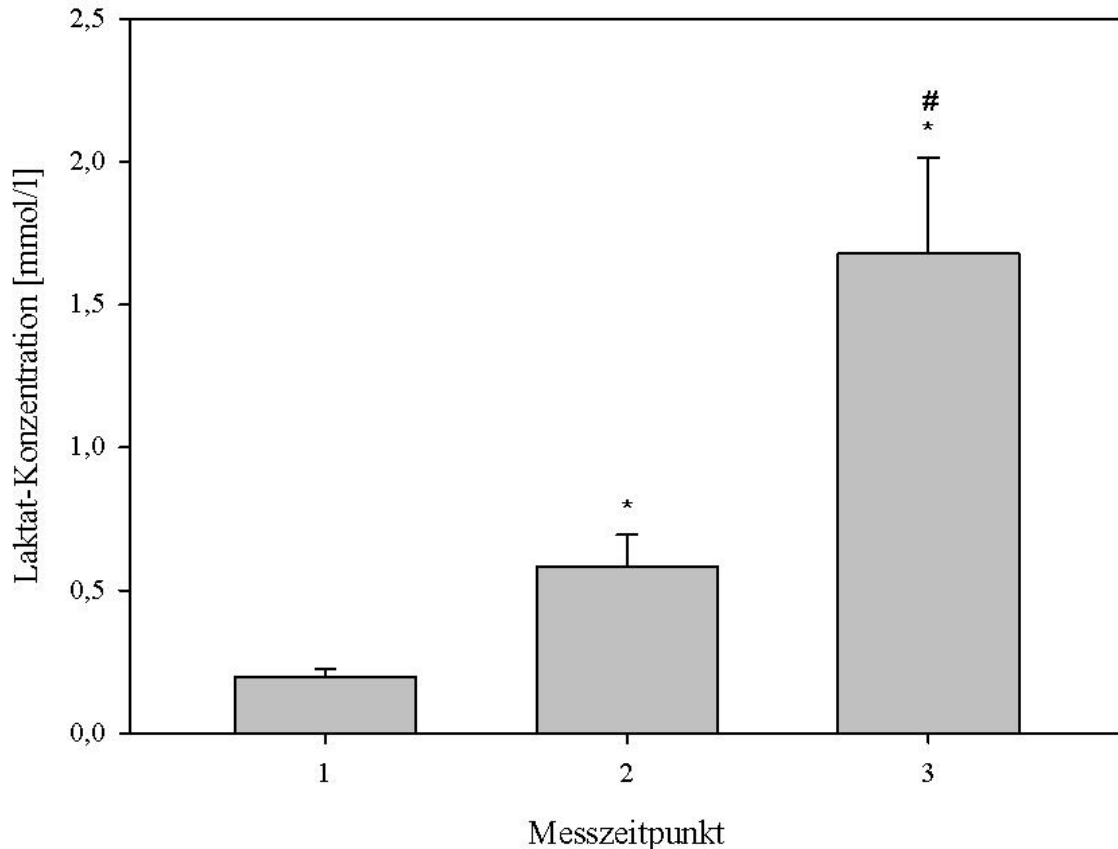


Abb. 4-20 Verlaufswerte der Laktatkonzentration während des Versuchs.

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD ($n = 5$). Messzeitpunkt 1: am Versuchsbeginn, Messzeitpunkt 2: direkt vor dem Wechsel der Perfusionslösung, Messzeitpunkt 3: zum Ende der Perfusion. * $p < 0,05$ vs. Messzeitpunkt 1, # $p < 0,05$ vs. Messzeitpunkt 2 (einfache ANOVA mit wiederholten Messungen).

4.3.5 Test der Funktionalität des CAD

Der Test auf Funktionalität des CAD wurde wie unter 3.3.6.7 beschrieben bei den Versuchstieren 12 – 16 durchgeführt. Die Ergebnisse der Messungen bei den Versuchstieren 12 und 15 wurden nicht mit in die Ergebnisse aufgenommen, da es bei den Versuchen zu einem negativen Anstieg des intramuskulären Drucks kam, was als Messfehler interpretiert wurde. Die Ergebnisse der Messungen der verbliebenen drei Versuchstiere (VT) und die Mittelwerte der ersten und zweiten Messung sind in Abbildung 4-21 dargestellt. Bei allen drei Versuchstieren zeigten die erste und zweite Messung einen ähnlichen Verlauf von Stim 1 zu Stim 5, wobei bei der 2. Messung fast immer ein niedrigerer intramuskulärer Druck erzielt wurde. Bei Versuchstier 13 konnte ein deutlicher Abfall des intramuskulären Drucks im zeitlichen Verlauf beobachtet werden. Bei Versuchstier 14 hingegen zeigte sich ein Anstieg des intramuskulären Drucks von Stim 1 bis Stim 3, gefolgt von einem Abfall und einem

Ergebnisse

erneuten kleineren Anstieg des intramuskulären Drucks. Die Ergebnisse von Versuchstier 16 zeigten eher einen linearen Verlauf mit nur einem geringen Abfall des intramuskulären Drucks.

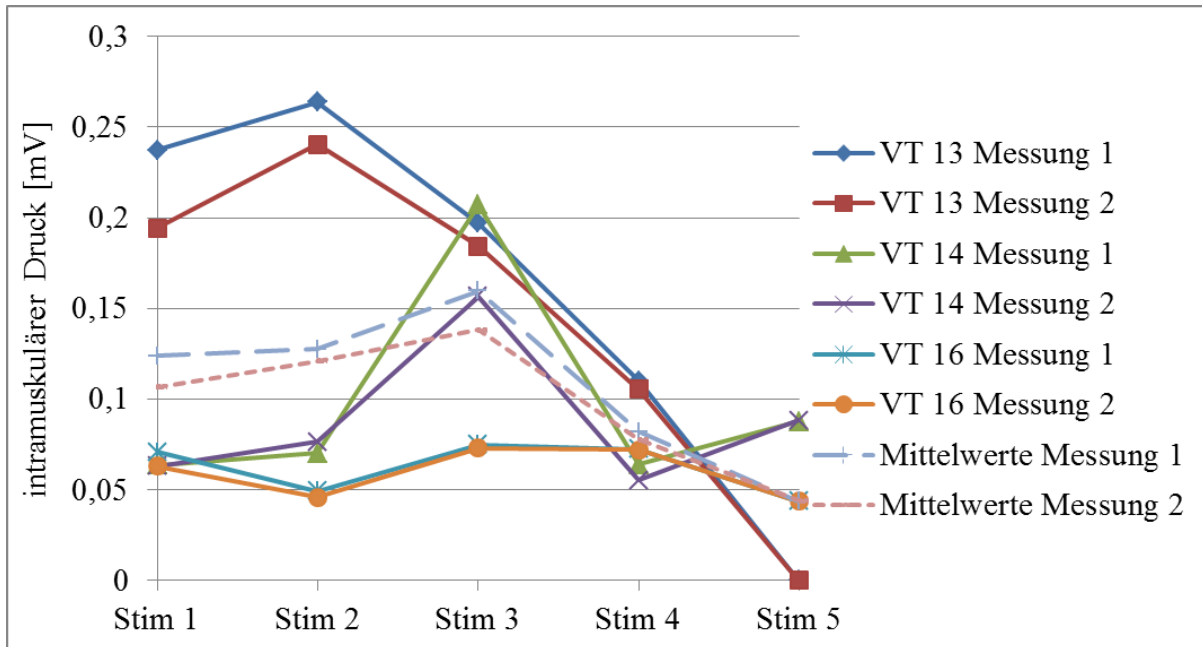


Abb. 4-21 Intramuskulärer Druck nach Elektrostimulation.

Dargestellt sind die Ergebnisse der ersten und zweiten Messung der Versuchstiere (VT) 13, 14 und 16 und deren Mittelwerte. Auffällig ist die deutliche Varianz zwischen den Versuchstieren bei den Initialdrücken. Auch fällt auf, dass der gemessene IMP bei der 2. Messung meist niedriger als bei der 1. Messung ist.

4.3.6 Feucht- / Trockengewicht

Das Verhältnis von Feucht- zu Trocken-Gewicht konnte bei vier von fünf Tieren ermittelt werden. Bei einem Tier konnte dies auf Grund eines technischen Defekts nicht bestimmt werden. Die durchschnittliche Gewichtszunahme am Ende der Perfusion lag bei $27,16 \pm 19,73$ %. Die prozentuale Gewichtszunahme pro Stunde lag bei $4,7 \pm 3,58$ %. Bei einem Tier war die Gewichtszunahme mit 56,45 % überdurchschnittlich hoch. Die stündliche Gewichtszunahme während der Perfusion lag bei diesem Tier bei 10,05 %.

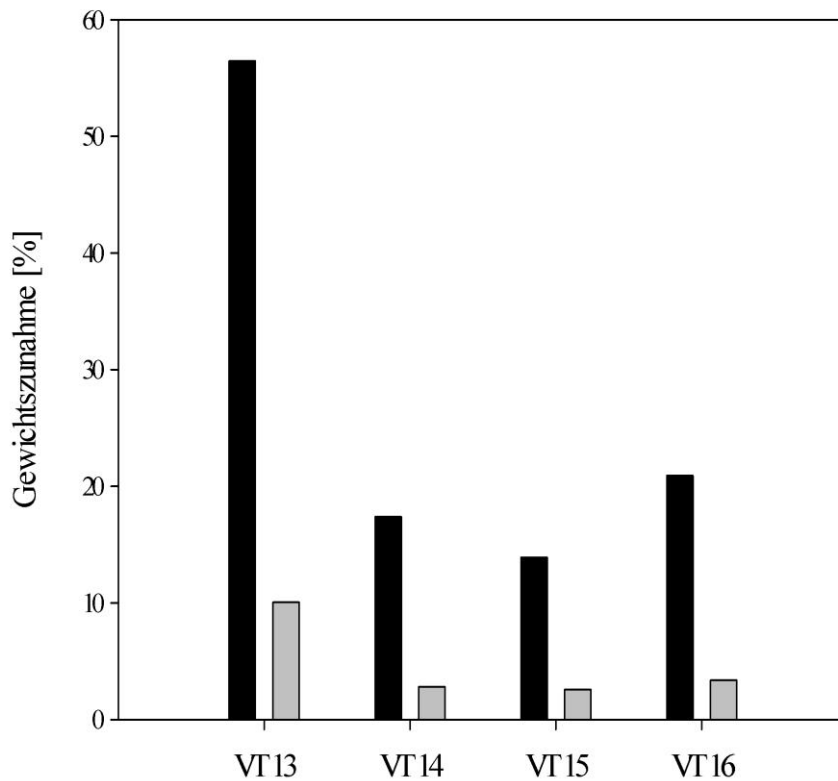


Abb. 4-22 Gewichtszunahme während der Perfusion.

Für $n = 4$ Versuchstiere ist die prozentuale Gewichtszunahme des isolierten Larynx während der Perfusion dargestellt. In schwarz ist die prozentuale Gesamtgewichtszunahme während der Perfusion, in grau ist die prozentuale Gewichtszunahme pro Stunde Perfusion dargestellt.

4.3.7 Zeitdauer

Es wurden für jeden Versuch drei Zeiträume bestimmt: A. Dauer von der Euthanasie des Versuchstieres bis zum Beginn der Perfusion, B. Gesamtdauer der Perfusion und C. Gesamtdauer des Versuches. Die durchschnittliche Gesamtdauer der Versuche ($n = 5$) lag bei $400,60 \pm 24,80$ Minuten. Die Gesamtdauer der Perfusion betrug im Durchschnitt $352 \pm 18,59$ Minuten. Die durchschnittliche Dauer von der Euthanasie des Pferdes bis zum Beginn der Perfusion betrug $48,60 \pm 10,37$ Minuten.

Ergebnisse

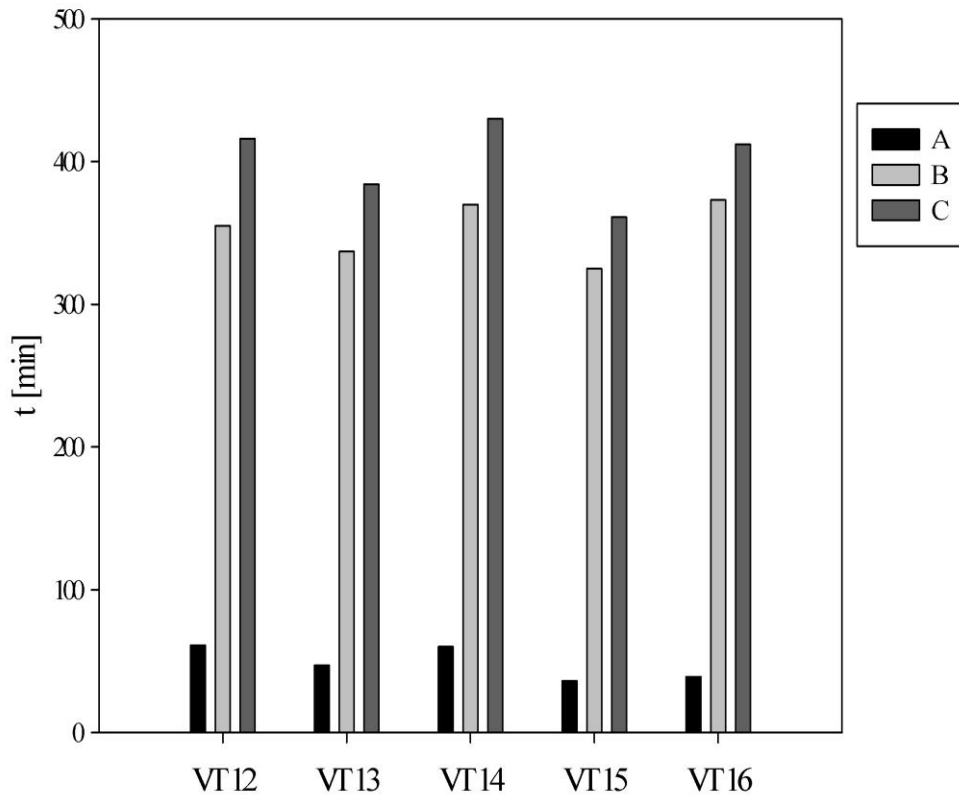


Abb. 4-23 Zeitdauer der Versuche.

Dargestellt sind die ermittelten Zeiträume der Hauptversuche ($n = 5$). A beschreibt die Dauer von der Euthanasie des Pferdes bis zum Beginn der Perfusion. B beschreibt die Gesamtdauer der Perfusion und C die Gesamtdauer des Versuches.

5 Diskussion

Ziel der hier vorliegenden Arbeit war die Etablierung eines druckkonstant perfundierten Ex-vivo-Modells des equinen Larynx. Es sollte ein relativ einfacher und kostengünstiger Perfusionskreislauf entwickelt werden, der gleichzeitig die Kriterien Vitalität, Zuverlässigkeit und Nähe zur In-vivo-Situation erfüllt. Die Vitalität des frisch entnommenen und dann perfundierten Kehlkopfes wurde über verschiedene Tests geprüft.

5.1 Etablierung des Perfusionskreislaufs

Ex-vivo-Modelle des Kehlkopfes kommen in der Forschung im Bereich der Phonation und von Erkrankungen des Kehlkopfes schon länger zur Anwendung (BERKE et al. 2007, GARRETT et al. 2000, MCCLELLAN et al. 2014). Der Großteil dieser Modelle ist jedoch nicht perfundiert. BERKE et al. (2007) und MARTINI et al. (2012) verwendeten beide flusskonstant perfundierte Ex-vivo-Modelle des Larynx für ihre Untersuchungen. Wie unter 2.2.3 beschrieben traten in beiden Studien Gewebeödeme bzw. –schwellungen auf. In beiden Studien wurde Sauerstoff für die Oxygenierung des Perfusionsmediums verwendet. Für das Modell in der vorliegenden Arbeit wurde eine druckkonstante Perfusion mit einer Begasung durch Carbogen (95 % Sauerstoff, 5 % Kohlenstoffdioxid) gewählt. MANCINA et al. (2014) konnten in ihrer Studie an perfundierten Schweinenieren zeigen, dass die Verwendung eines druckkonstanten Perfusionsmodells im Vergleich zu einem flusskonstanten und die Begasung des Perfusionsmediums mit Carbogen im Vergleich mit reinem Sauerstoff die physiologische Funktion der Niere besser aufrecht erhalten können. Zusätzlich wurde das isolierte Organ in der vorliegenden Arbeit wie von DHEIN (2005) vorgeschlagen in ein Wasserbad eingetaucht, um den Gewebsdruck zu erhöhen.

Als Perfusionslösung wurde eine kristalline modifizierte Tyrode-Lösung verwendet. Sie hat den Vorteil, dass sie preiswert und relativ einfach hergestellt werden kann. Mit Hilfe dieser modifizierten Tyrode-Lösung wurden die Kehlköpfe bis zu über sechs Stunden perfundiert. Allerdings fehlen ihr Fette, Proteine und Spurenelemente. Da in der vorliegenden Arbeit jedoch zur Oxygenierung kein Membranoxygenator eingesetzt wurde, bestünde beim Zusatz von Fetten oder Proteinen die Gefahr einer starken Schaumbildung oder Proteinausfällung (DHEIN 2005).

Alternativ zur Tyrode-Lösung könnte tierartspezifisches Vollblut als Perfusionsmedium verwendet werden. In einer Studie wurde gezeigt, dass durch die Verwendung von Vollblut als Perfusionsmedium und einer pulsatilen Perfusionspumpe in einem humanen Ex-vivo-Modell des Kehlkopfes für über zwölf Stunden eine Phonation erzeugt werden konnte

(BERKE et al. 2013). Allerdings müsste dann für die Oxygenierung des Blutes ein Membranoxygenator verwendet werden, der den Preis für dieses Ex-vivo-Modell deutlich erhöhen würde (DHEIN 2005). Der Einsatz von Vollblut hat zudem zahlreiche Nachteile. Der Kontakt des Blutes mit Fremdoberflächen im Perfusionskreislauf könnte die im Blut enthaltenen Anteile des Immunsystems aktivieren, was eine Zytokinfreisetzung zur Folge hätte. Diese könnte sich auf die Gefäße des isolierten Kehlkopfes auswirken (BOULANGER und VANHOUTTE 1993, PINTE et al. 2016). Auch kann der Kontakt mit Fremdoberflächen zur Hämolyse und Koagulation des verwendeten Vollblutes führen (KRÖSSIN 2007), was ein aufwendiges Gerinnungsmanagement in diesem Ex-vivo-Perfusionsmodell notwendig machen würde. Mit Hilfe der Messung der elektrischen Feldverteilung, wie von MARTINI et al. (2012) beschrieben, könnte man z. B. den Einfluss unterschiedlicher Stimulationsparameter auf die Öffnung der Rima glottidis messen. Da Blut im Gegensatz zu einer kristallinen Perfusionslösung korpuskuläre Bestandteile hat, könnte dies jedoch einen negativen Effekt auf solche Feldverteilungsmessungen haben.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein konstanter Perfusionsdruck von 1,0 mH₂O bzw. 9,81 kPa verwendet, was etwa 73,55 mmHg entspricht (persönliche Kommunikation mit Professor Stefan Dhein am 18.10.12). KNAAK et al. (2014) verwendeten bei ihren Versuchen mit ex vivo perfundierten Schweinelebern einen Perfusionsdruck von 60 – 70 mmHg. Bei Versuchen mit isolierten hämoperfundierten Schweinenieren konnte gezeigt werden, dass Perfusionsdrücke von 75 mmHg und 95 mmHg eine deutlich bessere renale Hämodynamik und renale Funktion als ein Perfusionsdruck von 55 mmHg erzeugen (HOSGOOD et al. 2006).

5.2 Vitalitätsparameter

Verschiedene Parameter wurden in der vorliegenden Arbeit gemessen, um die Vitalität des präparierten und isolierten Kehlkopfes zu überprüfen. Zum einen wurde die vaskuläre Vitalität, zum anderen die muskuläre Vitalität und damit auch die eigentliche Funktionalität des Kehlkopfes überprüft. Die vaskuläre Vitalität ist für eine gut funktionierende Perfusion und damit verbundene Versorgung des Kehlkopfes mit Sauerstoff und Nährstoffen eine Grundvoraussetzung.

5.2.1 Kontraktilität des CAD

Die Kontraktilität des CAD wurde durch externe elektrische Stimulation mittels einer Stimulationselektrode am Anfang und am Ende des Versuchs getestet. Der sich dabei ändernde IMP wurde mittels eines in den CAD implantierten Druckmesskatheters aufgezeichnet. Dieser Test fiel bei allen Versuchen positiv aus.

Spontane Muskelzuckungen werden regelmäßig post mortem bei Schlachttieren beobachtet. In der Rechtsmedizin werden Kontraktionen der Skelettmuskulatur nach mechanischer Stimulation noch 13 Stunden nach dem Tod beschrieben (WARTHER et al. 2012). Zur Bestimmung des Todeszeitpunktes wird die postmortale elektrische Erregbarkeit der Skelettmuskulatur gemessen. MADEA (1992) konnte in seiner Arbeit zeigen, dass eine maximale Kraft des Daumenballens bei externer Stimulation durch zwei Stimulationsnadeln mit 4 mA bis ca. 4,5 Stunden post mortem und mit 80 mA sogar bis ca. 11,5 Stunden post mortem nachweisbar war. Daher muss dem Test auf Kontraktilität des CAD in dieser Arbeit als Vitalitätsparameter eher geringe Aussagekraft beigemessen werden. Deshalb wurde zusätzlich der Test auf Funktionalität des CAD durchgeführt.

5.2.2 Myogene Autoregulation

Blutgefäße sind in der Lage, sich an Änderungen des transmuralen Druckes anzupassen. Bei einer Erhöhung des Druckes kommt es zu einer Vasokonstriktion, während eine Erniedrigung zu einer Vasodilatation führt (DAVIS und HILL 1999). Dieser Effekt wird auch myogene Autoregulation oder nach seinem Entdecker Sir William Maddock Bayliss als Bayliss-Effekt bezeichnet (BAYLISS 1902). Die Vasokonstriktion wird durch die Kontraktion glatter Gefäßmuskulatur herbeigeführt. Dadurch verringert sich der Durchmesser des entsprechenden Blutgefäßes, in dessen Folge gemäß dem Hagen-Poiseuilleschen-Gesetz der Gefäßwiderstand ansteigt. Dies hat eine Verminderung des Blutflusses zur Folge. Ziel dieses Mechanismus ist es, die Organe auch bei Schwankungen des Blutdruckes konstant mit Blut, Nährstoffen und Sauerstoff zu versorgen (ROMAN und VAN DOKKUM 2014).

SCHUBERT (2005) beschreibt bei Experimenten mit isolierten kanülierten Gefäßen, dass manchmal keine myogene Autoregulation sichtbar ist. Er empfiehlt dann den Einsatz eines Vasokonstriktors in submaximaler Konzentration. Dadurch könne sich häufig eine myogene Autoregulation induzieren lassen. Ähnliche Ergebnisse wurden auch in der vorliegenden Arbeit beobachtet. Bei zwei Versuchen konnte am Beginn des Experiments keine myogene Autoregulation nach Erhöhung des Perfusionsdruckes gemessen werden. Nach Zugabe von Noradrenalin als Vasokonstriktor wurde eine Vasokonstriktion mit daraus resultierender Abnahme des Perfusionsflusses beobachtet. Am Ende des jeweiligen Experiments konnte

dann bei beiden Versuchen eine myogene Autoregulation gemessen werden. LIU et al. (1994) beschreiben in ihren Untersuchungen an Ratten ähnliche Ergebnisse. Sie konnten zeigen, dass die schrittweise Erhöhung des intravaskulären Druckes um 10, 20 und 30 mmHg in der Kontrollgruppe zu keiner myogenen Antwort führte. Wurden die Gefäße jedoch mittels Noradrenalin zuvor zu 25 % konstriktiert, so zeigten die Gefäße eine deutliche myogene Antwort bei Erhöhung des intravaskulären Druckes. Eine Erklärung für die fehlende myogene Autoregulation am Beginn des Versuches könnte eine zu kurze Anpassungsphase an den Perfusionskreislauf sein. In den Hauptversuchen wurde der Kehlkopf initial über einen Zeitraum von zehn Minuten mit einem niedrigeren Perfusionsdruck perfundiert, um den Kehlkopf langsam an das Perfusionssystem zu gewöhnen. Danach wurde der Perfusionsdruck auf den Endwert erhöht. WÜSTENBERG (2006) setzte diese Phase in ihrer Arbeit mit 60 Minuten deutlich länger an. Diese Zeitspanne wurde auch von anderen Autoren verwendet (DHEIN et al. 2002). FRIEBE et al. (2013) hingegen wählten eine Zeitspanne von 30 Minuten zur Anpassung. Andere Arbeitsgruppen hingegen perfundierten ohne Anpassungsphase (BÄUMER et al. 2002, BERKE et al. 2007). Während bei FRIEBE et al. (2013) die Zeitspanne vom Tod des Tieres bis zum Beginn der Perfusion ca. 50 Minuten betrug, lag diese Zeitspanne bei BÄUMER et al. (2002) zwischen 30 und 45 Minuten. In der vorliegenden Arbeit betrug diese Zeitdauer in den Hauptversuchen $48,60 \pm 11,59$ min. Da bei den Vorversuchen vergleichbare Werte ermittelt wurden, wurde für die vorliegende Arbeit eine Anpassungsphase von zehn Minuten als ausreichend erachtet.

Bei Versuch 14 konnte zum Ende hin keine myogene Autoregulation mehr beobachtet werden. Eine Erklärung dafür wäre, dass es im Laufe des Versuches zu deutlichen Irritationen der beiden kanülierten Gefäße durch die Venenverweilkatheter gekommen ist. Dies kann die physiologische Reaktion kleiner Arteriolen verändern (DAVIS und SIKES 1990). Eine weitere Erklärung könnte sein, dass es nach ca. sechs Stunden Perfusion zu einer Ermüdung kam, da die Perfusionslösung in einem Kreislauf zugeführt wurde und nicht ständig durch frische Perfusionslösung ersetzt wurde. Dafür sprechen auch die deutlich angestiegenen Laktat- und LDH-Werten am Ende der Perfusion.

SCHNEIDER (2013) erhöhte in seiner Arbeit den intravaskulären Druck um 5 bis 120 mmHg. JARAPU et al. (2004) verwendeten in ihrer Arbeit über die A. ophtalmica der Ratte Drücke zwischen 1 und 199 mmHg. DAVIS und SIKES (1990) hingegen benutzten einen Maximaldruck von 240 cmH₂O (≈ 177 mmHg). In der vorliegenden Arbeit wurde der isolierte Kehlkopf mit einem Perfusionsdruck von 9,81 kPa ($\approx 73,55$ mmHg bzw. 1,0 mH₂O) perfundiert. Für den Test auf myogene Autoregulation wurde der Perfusionsdruck dann schlagartig auf 11,77 kPa ($\approx 88,26$ mmHg bzw. 1,20 mH₂O) erhöht. Wird der Perfusionsdruck sehr schnell erhöht, so kommt es zu Beginn zu einer passiven Weitung der Gefäße, an die sich dann eine Vasokonstriktion anschließt. Ausmaß der Weitung und der Vasokonstriktion sind

dabei von der Größe des Druckgradienten abhängig (DAVIS und SIKES 1990). Vergleichbare Ergebnisse wurden auch in der vorliegenden Arbeit beobachtet, obwohl der Druckgradient hier mit 1,96 kPa (20 cmH₂O) gering war. In der folgenden Abbildung ist hierfür beispielhaft eine Flusskurve dargestellt.

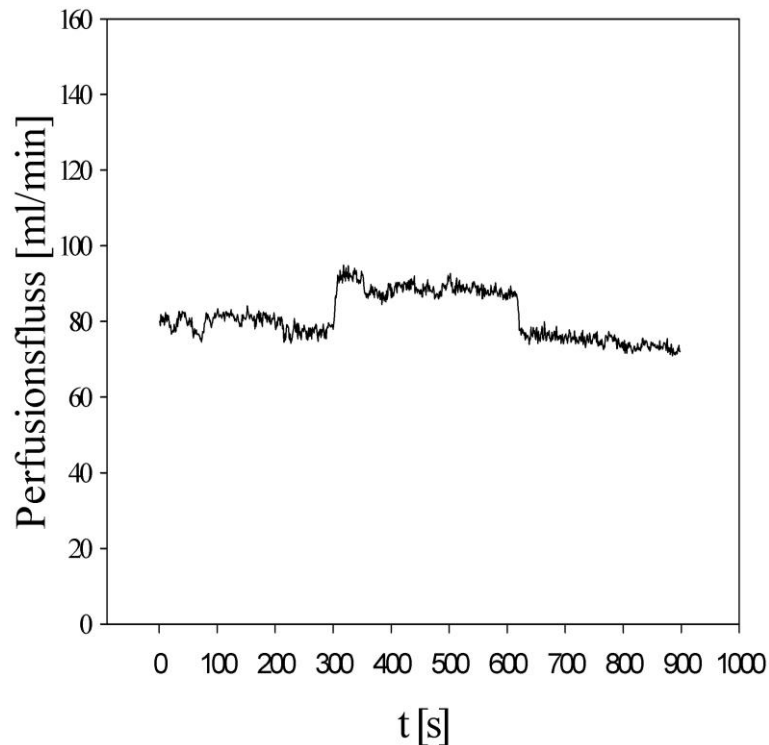


Abb. 5-1 Beispiel für eine Flusskurve beim Test auf myogene Autoregulation. Dargestellt ist repräsentativ eine Flusskurve während des Tests auf myogene Autoregulation. Nach 300 s wird der Perfusionsdruck schlagartig um 1,96 kPa erhöht. Zuerst steigt der Perfusionsfluss an. Dann beginnt die myogene Autoregulation und durch Vasokonstriktion sinkt der Perfusionsfluss wieder ab. Nach 600 s wird dann der Perfusionsdruck wieder auf das Ausgangsniveau gebracht und der Perfusionsfluss sinkt umgehend, bis er sich allmählich wieder etwa auf das Ausgangsniveau einpegelt.

SCHUBERT (2005) schlägt zusätzlich zur Überprüfung der myogenen Autoregulation noch die Applikation vasoaktiver Substanzen vor, um die Reaktion der Gefäße und damit deren Vitalität zu testen. Dies wurde so ebenfalls in der Arbeit von JARAPU et al. (2004) umgesetzt. Zusammengefasst kann gesagt werden, dass der Test auf myogene Autoregulation ein kostengünstiger und einfach durchzuführender Vitalitätstest ist, der durch das Einschweben vasoaktiver Substanzen noch erweitert werden kann. In der vorliegenden Arbeit wurde dieses Vorgehen in den Vorversuchen der Phase 2 und den Hauptversuchen realisiert.

5.2.3 Noradrenalin

In den Vorversuchen der Gruppe 1 und 2 wurde KCl als vasokonstriktorisches wirkende Substanz eingesetzt, um die Vitalität der glatten Gefäßmuskulatur zu überprüfen (DHEIN et al. 1995). Hohe KCl-Konzentrationen führen zu einer Depolarisation der Zellmembran glatter Gefäßmuskelzellen und öffnen darüber spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle, was zu einer Kontraktion glatter Muskelzellen führt (KARAKI et al. 1984, RATZ et al. 2005). In der Vorversuchsgruppe 1 wurde mit 30 mM KCl (DHEIN et al. 1995) und in der Vorversuchsgruppe 2 mit 50 mM KCl perfundiert (siehe Tab. 3-5). Bei allen Versuchen führte dies zu einer Vasokonstriktion. Da die Anwendung auf Grund der Größe der Perfusionswanne und der Menge der verwendeten Perfusionslösung sehr aufwändig war, wurde das Einschwemmen von KCl durch eine Bolusgabe des kurz wirksamen Noradrenalins ersetzt.

Noradrenalin wird zu den direkt wirkenden Sympathomimetika gezählt. Es wirkt zum einen als Überträgerstoff postganglionärer sympathischer Nerven, zum anderen als Hormon in der Peripherie (LÖSCHER 2010). Im Gegensatz zum Adrenalin besitzt es jedoch eine stark ausgeprägte α -Rezeptoren-Wirkung bei gleichzeitig niedriger β_2 -Rezeptoren-Wirkung (LÖSCHER 2010). Dadurch ist seine Hauptwirkung im Bereich der Blutgefäße eine starke periphere Vasokonstriktion (SWAN 1949). Dies geschieht am α_1 -Adrenozeptor über die Aktivierung eines G_q -Proteins, was schließlich zur Kontraktion glatter Gefäßmuskelzellen führt (STARKE 2013). Eine Entfernung des Endothels hat keinen Einfluss auf die vasokonstriktorisches Wirkung des Noradrenalins (BOLTON und CLAPP 1986).

Bei den beiden Tieren der Versuchsgruppe 2 führte oben genannter Mechanismus bei jeder Applikation zu einer Vasokonstriktion. In der Hauptgruppe konnte eine Vasokonstriktion mittels Gabe von Noradrenalin zu Beginn der Perfusion bei vier von fünf Versuchstieren und zum Ende der Perfusion bei allen fünf Versuchstieren erzeugt werden. Dies spricht für eine voll funktionsfähige Gefäßmuskulatur, deren Funktionalität auch nach mehrstündiger Perfusion noch erhalten geblieben ist.

5.2.4 Nitroprussid

Zusätzlich zu den vasokonstriktorisches wirkenden Substanzen KCl und Noradrenalin wurden auch vasodilatatorisch wirkende Substanzen verwendet. In den Vorversuchen der Phase 2 wurde initial Carbachol verwendet. Carbachol konnte lediglich in einem Experiment am Versuchsbeginn eine Vasodilatation erzeugen. In allen anderen Fällen konnte weder am Versuchsbeginn noch am Versuchsende eine Vasodilatation mittels Carbachol-Gabe erzeugt werden. Carbachol erzeugte in diesen Fällen sogar eher eine Vasokonstriktion. Carbachol gehört zu den Parasympathomimetika und dort zu den Muskarinrezeptor-Agonisten

(STARKE 2013). Muskarinrezeptor-Agonisten können sowohl vasokonstriktorisch als auch vasodilatatorisch wirken. Die Vasokonstriktion wird durch eine direkte Wirkung an der glatten Gefäßmuskulatur ausgelöst (STARKE 2013). Die vasodilatatorische Wirkung hingegen wird vor allem über den M₃ muskarinergen Acetylcholinrezeptor über die Freisetzung vasodilatatorisch wirkender Substanzen des Endothels vermittelt (GERICKE et al. 2014). BOLTON und CLAPP (1986) zeigten in ihrer Arbeit an isolierten kleinen Mesenterialarterien des Meerschweinchens, dass Carbachol einen dosisabhängigen relaxierenden Effekt hat, wenn die Gefäße zuvor mit Noradrenalin konstriktiert wurden. Wurde das Endothel jedoch mechanisch entfernt, so wurde dieser Effekt stark abgeschwächt oder sogar ganz aufgehoben. Die genannten Autoren zeigten auch, dass eine Vasokonstriktion durch hohe Konzentrationen an Kalium deutlich schlechter durch Carbachol gehemmt wurde als wenn die Vasokonstriktion durch Noradrenalin erzeugt wurde. Dies war ein weiterer Grund, weshalb im Zuge der Entwicklung des Perfusionsmodells des equinen Larynx in der vorliegenden Arbeit KCl als Vasokonstriktor durch Noradrenalin ersetzt wurde. Eine mechanische Entfernung des Endothels beeinflusst die vasokonstriktive Wirkung des Noradrenalins nicht (BOLTON und CLAPP 1986). Carbachol ist ein Strukturanalogon des Acetylcholins und trägt anstelle einer Acetylgruppe eine Carbamoylgruppe. Die Arbeitsgruppe von OBI et al. konnte zeigen, dass isolierte equine Koronararterien durch niedrige Konzentrationen von Acetylcholin relaxiert werden können (OBI et al. 1994). Diese Relaxation erfolgt durch Stimulation des M₃ muskarinergen Acetylcholinrezeptors über eine Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) aus dem Endothel. Eine Entfernung des Endothels und hohe Konzentrationen von Acetylcholin hingegen führen zu einer Konstriktion der isolierten Gefäße (OBI et al. 1994). Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit kann nicht geschlussfolgert werden, was die genaue Ursache für die ausbleibende vasodilatatorische Wirkung des Carbachols war. Zum einen könnte eine Schädigung des Endothels vorgelegen haben. In den Vorversuchen der Phase 1 wurde per Hand eine Vorperfusion durchgeführt. Dabei könnte ein zu hoher Druck erzeugt und das Endothel geschädigt worden sein. Aus diesem Grund wurde die Vorperfusion in den nachfolgenden Experimenten nicht mehr durchgeführt. Bei einer Studie mit isolierten kleinen Nierenarterien wurde das Endothel durch vorsichtige Applikation eines Luftbolus von drei bis fünf ml Luft entfernt, wobei der transmurale Druck ≤ 100 mmHg lag (LIU et al. 1994). In der vorliegenden Studie erfolgte in den Vorversuchen der Phase 1 die Vorperfusion mit 250 ml kalter Perfusionslösung mittels einer 20 ml Spritze. Möglich ist auch, dass es beim Wechseln der Spritze zu einem Eindringen von Luft in das Gefäßsystem des isolierten Larynx gekommen ist, wodurch es dann zu einer Schädigung bis hin zur teilweisen Entfernung des Endothels gekommen sein kann. Ebenfalls möglich ist, dass zu Beginn der Perfusion mit einem zu hohen Perfusionsdruck begonnen wurde, was eine Schädigung des Endothels verursacht haben könnte. Um dies auszuschließen, müsste man die Versuche mit niedrigeren initialen Perfusionsdrücken und langsamer

Steigerung wiederholen. Auch könnte eine zu hohe Konzentration des Carbachols vorgelegen haben. Des Weiteren muss bedacht werden, dass die zitierten Arbeiten alle an einzelnen isolierten Gefäßen durchgeführt wurden. Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich jedoch um die Perfusion eines ganzen Organs mit intaktem Gefäßsystem. Hier wurde der Gesamtperfluationsfluss gemessen und nicht derjenige einzelner Gefäße.

Nitroprussid ist ein NO-Donor, der auch bei defektem Endothel eine Vasodilatation erzeugen kann (GERICKE et al. 2014). Die gleiche Arbeitsgruppe konnte auch zeigen, dass dieser Effekt sowohl bei M₃ Rezeptor Knockout-Mäusen als auch in der Kontrollgruppe sichtbar war. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit schließlich Nitroprussid als Vasodilatator eingesetzt. Nitroprussid stellt sowohl venöse als auch arterielle Gefäße weit und besteht aus einem Komplex von NO und Eisen mit fünf Cyanidionen (HOTTINGER et al. 2014). Wenn Nitroprussid mit der glatten Gefäßmuskulatur in Berührung kommt, wird das NO freigesetzt. Dort wird über eine Guanylatcyclase cGMP gebildet, was schließlich die Relaxation der glatten Gefäßmuskelzelle und damit die Vasodilatation vermittelt (LOBSIEN 2009). Seine Anwendung in der Humanmedizin findet Nitroprussid als potenter Vasodilatator zur Behandlung der arteriellen Hypertonie (HOTTINGER et al. 2014) und beim akuten Herzversagen (FÖRSTERMANN 2013). Nitroprussid konnte in der vorliegenden Arbeit am Versuchsbeginn bei vier der fünf Versuchstiere und am Versuchsende bei allen Experimenten eine Vasodilatation erzeugen.

Nitroprussid besitzt aber auch unerwünschte Wirkungen. So kann eine Überdosierung zu einer Hypotension führen (HOTTINGER et al. 2014). Auch wird die Bildung von Cyanid-Ionen bei der Reaktion des Nitroprussids mit Oxyhämoglobin beschrieben, was bei längerer Gabe bzw. zu hoher Dosierung zu Vergiftungserscheinungen führen kann (VESEY et al. 1976). Es wird daher empfohlen, bei höheren Dosierungen (> 2 µg/kg/min) Natriumthiosulfat parallel zu verabreichen, um die Entgiftung der Cyanid-Ionen zu beschleunigen (FÖRSTERMANN 2013). Auch wird eine Verabreichung über einen längeren Zeitraum als 48 Stunden nicht empfohlen (FÖRSTERMANN 2013). In der vorliegenden Arbeit wurde das Nitroprussid lediglich zweimal als Bolusinjektion verwendet. Da eine modifizierte Tyrode-Lösung als Perfusionslösung verwendet wurde, ist unwahrscheinlich, dass es zu einer Bildung der genannten Cyanid-Ionen kommen konnte.

5.2.5 Papaverin

Papaverin (C₂₀H₂₁NO₄) gehört zu den Alkaloiden und kommt im Schlafmohn vor (COLLINS 1939). In der Pharmazie wird das wasserlösliche Papaverinhydrochlorid verwendet. Papaverin gehört zur Gruppe der Phosphodiesterase-Hemmer. Es hemmt relativ unspezifisch die Wirkung von Phosphodiesterasen, was den vasodilatatorischen Effekt des Papaverins erklärt

(PÖCH und KUKOVETZ 1971). Dieselben Autoren konnten auch zeigen, dass Papaverin keinen Einfluss auf die Wirkung von 5'-Nucleotidasen und Phosphatasen hat. Die Hemmung der Phosphodiesterasen wiederum hemmt die Hydrolyse von cAMP und cGMP (LUGNIER und STOCLET 1974).

Papaverin kommt in der Forschung in verschiedenen Bereichen zum Einsatz. KONTNY (2003) nennt fünf verschiedene Einsatzgebiete. So wird Papaverin auf Grund seiner vasodilatatorischen Eigenschaften genutzt, aber auch zur Beurteilung und zum Vergleich seiner vasodilatatorischen Potenz. Des Weiteren wird es als Hilfsmittel in der Diagnostik verwendet sowie ebenfalls um Wirkmechanismen anderer Substanzen zu beurteilen. Schließlich wird auch die Papaverinwirkung an sich weiter erforscht. Klinisch wird Papaverin im Bereich der Kardiologie eingesetzt. Hier kann es in arteriellen *Bypassgrafts* Gefäßspasmen verhindern (HARRISON et al. 2001). Früher wurde Papaverin in der Urologie zur Behandlung der erektilen Dysfunktion häufig verwendet (SHMUELI et al. 1999). Allerdings kommt heute das einfacher anzuwendende Sildenafil (Viagra®) zum Einsatz.

Papaverin wurde in dieser Arbeit erst ganz am Ende der Perfusion eingesetzt. HARRISON et al. (2001) zeigten in ihrer Arbeit mit humanen Segmenten der A. radialis, dass nach einer zwanzigminütigen Inkubation mit Papaverin zwei Stunden nach Applikation keine Vasokonstriktion mittels Noradrenalin mehr erzielt werden konnte. Erst nach 18 Stunden war wieder eine mit der Kontrollgruppe vergleichbare Vasokonstriktion mittels Noradrenalin möglich. In einer anderen Arbeit an der isolierten Aorta der Ratte konnte gezeigt werden, dass Papaverin unterschiedlich stark die vasokonstriktorische Wirkung verschiedener Substanzen hemmt (Adrenalin > KCl > 5HT) (YAVUZ et al. 2014) Um eine Beeinflussung der Wirkung der anderen vasoaktiven Substanzen durch das Papaverin zu vermeiden, wurde es daher erst als letzte vasoaktive Substanz am Ende der Perfusion appliziert.

NO diffundiert in die Gefäßmuskelzelle, wo es eine Guanylatcyclase stimuliert, was wiederum zu einem Anstieg des *second messengers* cGMP führt. Dieser vermittelt die Erschlaffung der Gefäßmuskelzelle und somit eine Vasodilatation. Indem Papaverin Phosphodiesterasen hemmt, wird die Hydrolyse des cGMP gehemmt, was zu einer Verstärkung der von NO erzeugten Vasodilatation führt (KONTNY 2003). Dies stellt neben der endothel-unabhängigen Hemmung der Phosphodiesterase einen vom Endothel abhängigen Faktor der Vasodilatation durch Papaverin dar (MARTIN et al. 1986). Dieser Mechanismus könnte eine Erklärung für die sehr ausgeprägte Vasodilatation nach der Papaverin-Gabe in der vorliegenden Arbeit sein, da das Papaverin fünf Minuten nach dem Nitroprussid appliziert wurde. Allerdings besitzt NO nur eine sehr kurze Halbwertszeit (LOBSIEN 2009, PALMER et al. 1987). Es wird eine Plasmahalbwertszeit von drei bis vier Minuten beschrieben

(FÖRSTERMANN 2013). Dies müsste durch weitere Experimente noch genauer verifiziert werden. In dieser Arbeit konnte mit Papaverin bei allen fünf Versuchstieren der Hauptgruppe und bei allen vier Versuchstieren aus den Vorversuchen der Phase 2 erfolgreich eine maximale Vasodilatation am Ende der Perfusion erzeugt werden, was für eine voll funktionsfähige vaskuläre Präparation mit intakter Gefäßmuskulatur spricht.

5.2.6 Laktat und Laktat-Dehydrogenase

Sowohl für die Kontraktion von Skelettmuskeln als auch für alle anderen Stoffwechselfvorgänge ist Energie notwendig. Diese wird chemisch durch das Adenosintriphosphat (ATP) bereitgestellt. ATP kann sowohl über die aerobe als auch über die anaerobe Glykolyse hergestellt werden. Das bedeutet, dass bei der Abwesenheit von Sauerstoff die Glykolyse trotzdem stattfinden kann. Dies wird durch das intrazytoplasmatische Enzym Laktat-Dehydrogenase (LDH) gewährleistet. LDH katalysiert die Reduktion von Pyruvat zu Laktat. LDH wird schon lange in der Medizin verwendet, um Zellschäden nachzuweisen (DANESE und MONTAGNANA 2016), da bei einer Schädigung der Zellmembran dieses Enzym aus der Zelle freigesetzt wird (CHAN et al. 2013). Die LDH ist einer der ersten Marker, die bei hypoxischen Zuständen im Blut ansteigen (DAVE et al. 2016) und kann als sensitiver Nachweis für zelluläre Schädigungen verwendet werden (KIM et al. 2004). In der Literatur werden Normwerte für Pferde bis 500 IU/l angegeben (GRABNER und FEY 2014). OEY (2006) konnte in ihrer Arbeit LDH-Werte vier Stunden nach einer Longenbelastung von Pferden von bis zu 1596 U/l messen. In der vorliegenden Arbeit stieg die Aktivität der LDH auf maximal $259,20 \pm 172,76$ U/l an, was noch deutlich innerhalb der für Pferde geltenden Normwerte liegt.

Sowohl in der Humanmedizin als auch in der Veterinärmedizin wird Laktat als Marker für eine Gewebhypoxie verwendet (BLOMKALNS 2006, FARÍAS et al. 2016, KARAGIANNIS et al. 2006), weshalb Laktat auch in der vorliegenden Arbeit als Vitalitätsmarker ausgewählt wurde. In der Literatur werden beim Pferd Normalwerte für Laktat von bis zu 1,0 mmol/l beschrieben (GRABNER und FEY 2014, HELLMOLD 2009). Unter Belastung kann dieser Wert aber enorm ansteigen. KORTE (2006) ermittelte in ihrer Arbeit Werte von bis zu 13 mmol/l bei Pferden, die eine Springprüfung absolviert hatten, und bis zu 19,76 mmol/l bei Pferden nach 1200 m Rennbahnbelastung. HELLMOLD (2009) berichtet sogar von extremen Werten bis 35 mmol/l und 46 mmol/l. Sie selber ermittelte Werte von bis zu 6,92 mmol/l nach Belastung. In der vorliegenden Arbeit wurden zum Ende der Perfusion hin Maximalwerte von $1,68 \pm 0,33$ mmol/l erreicht. Diese liegen deutlich unter den bereits erwähnten Werten bei Pferden unter Belastung, aber über den beschriebenen Normalwerten. Der Anstieg des Laktats von Messzeitpunkt 1 ($0,2 \pm 0,03$ mmol/l) zu

Messzeitpunkt 2 ($0,58 \pm 0,11$ mmol/l) ist zwar statistisch signifikant, jedoch liegen beide unter den Normalwerten von bis zu 1,0 mmol/l. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass zum Zeitpunkt des Beginns der Perfusion keine hypoxische Schädigung des entnommenen Kehlkopfes vorlag, die Entnahme und Präparation somit ausreichend schnell waren. Weiterhin kann daraus abgeleitet werden, dass nach dem Messzeitpunkt 2 ($85 \pm 3,54$ min nach Perfusionsbeginn) ein Anstieg des Laktats über den Normwert zu verzeichnen ist, was für eine beginnende Sauerstoffunterversorgung und damit Schädigung der Zellen sprechen kann. Zusammengefasst kann also für Laktat und die Aktivität der LDH gesagt werden, dass bis zum Messzeitpunkt 2 keine Schädigung des perfundierten Kehlkopfes vorlag.

5.2.7 Funktionalität des CAD

Um den entnommenen Kehlkopf nicht nur auf der vaskulären Ebene auf seine Vitalität zu untersuchen, sondern auch auf der Skelettmuskelebene, wurde die Funktionalität des CAD mittels elektrischer Stimulation via implantierter Stimulationselektroden getestet. TOPALOV und DASKALOV (2004) verwendeten in ihrer Arbeit einen mit Batterien betriebenen Elektrostimulator bei 23 Patienten, um die Gewebevitalität der Extremitäten nach Verletzungen zu überprüfen. In der hier vorliegenden Arbeit wurden in den linken CAD zwei Stimulationselektroden implantiert und dieser dann über diese elektrisch stimuliert. Um die Kontraktion des CAD und damit seine Funktionalität auch quantitativ darstellen zu können, wurde zusätzlich ein Druckmesskatheter in den linken CAD implantiert. Dafür wurde ein Mikro-Tip® Druckkatheter verwendet, der mehrere Vorteile bietet. Durch seine Größe von 3,5F kann er auch in sehr kleinen Gebieten verwendet werden. Zusätzlich kann er wiederverwendet und zusätzlich auch für Dauermessungen von bis zu sieben Tagen benutzt werden. Außerdem ist er im Gegensatz zum Wick-Katheter weniger anfällig für Artefakte, da er nicht vorher mit Flüssigkeit befüllt werden muss (HARGENS und BALLARD 1995). Der intramuskuläre Druck (IMP) wird als Flüssigkeitsdruck innerhalb eines Muskels definiert (BALLARD et al. 1998) und gibt einen Hinweis auf die Muskelkontraktionskraft (BALLARD et al. 1998, SEJERSTED et al. 1984). Es stellt sich also zusätzlich die Frage, ob durch die Messung des intramuskulären Druckes in einem Folgeexperiment an dem hier entwickelten Ex-vivo-Modell unterschiedliche Konfigurationen für die Stimulationselektroden getestet werden können.

Betrachtet man die ermittelten Werte für den intramuskulären Druck, so fällt auf, dass der Wert der zweiten Messung unter dem Wert der ersten Messung liegt. Dies ist typisch für Muskelermüdung. STEPHENS und TAYLOR (1972) konnten in ihren Experimenten zeigen, dass Muskelermüdung in zwei Phasen stattfindet und während der ersten Phase, die bis zu einer Minute andauert, die Muskelkraft bis ca. 50 % absinken kann. Weiterhin fällt auf, dass

die in dieser Arbeit ermittelten Werte für den intramuskulären Druck interindividuelle Unterschiede aufweisen. Dafür gibt es mehrere mögliche Erklärungen. Zum einen hängt der intramuskuläre Druck mit der Position des implantierten Druckmesskatheters innerhalb des Muskelvolumens zusammen (SEJERSTED et al. 1984). Da in der vorliegenden Studie der CAD der Versuchstiere nicht immer exakt die gleiche Größe und das gleiche Volumen aufwies, kam es zu interindividuellen Unterschieden bezüglich der Positionierung des Druckmesskatheters. Dies könnte Variationen des IMP bei den gemessenen Initialdrücken erklären (NAKHOSTINE et al. 2009). DAVIS et al. (2003) führen als Gründe für eine Variabilität des Zusammenhangs zwischen IMP und isometrischen Drehmoment die Tiefe des platzierten Druckkatheters, die Dicke des Muskels und Unterschiede in der Geometrie der Muskelfasern an. Zusätzlich nennen die genannten Autoren als möglichen Grund eine Bewegung des Druckmesskatheters durch die Verkürzung des Muskels bei seiner Kontraktion. Dieses Phänomen wurde auch von WARD et al. (2007) beobachtet. Eine Bewegung des Druckmesskatheters durch die Muskelkontraktion könnte auch den Anstieg des IMP erklären, der bei allen drei Versuchstieren zwischenzeitlich zu verzeichnen war (Versuchstier 13 Stim 2, Versuchstiere 14 und 16 Stim 3, siehe Abb. 4-21). Bei zwei Versuchstieren traten während der Messungen negative Muskeldrücke auf. Da dies als Messfehler interpretiert wurde, wurden die Ergebnisse dieser Tiere ausgeschlossen. Solche negativen Drücke wurden auch schon von anderen Autoren beobachtet (BALLARD et al. 1998, WARD et al. 2007). Als möglicher Grund dafür werden Bewegungen des Druckmesskatheters während der Kontraktion angesehen (BALLARD et al. 1998). Die genannten Autoren stellen aber auch die Hypothese auf, dass der negative Druck wichtig für die Muskelperfusion nach der Kontraktion sein könnte. Eine weitere Hypothese ist die Bildung eines Vakuums zwischen Druckmesskatheter und umgebendem Muskelgewebe während der Muskelkontraktion durch die Bewegung der Muskelfasern weg von der Spitze des Messkatheters (WARD et al. 2007). Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass die Messung des IMP zur Überprüfung der Funktionalität des CAD geeignet ist, jedoch auch eine gewisse Störanfälligkeit aufweist. Eine Alternative wäre die Messung des Abduktionsgrades des Arytaeniodknorpels (CHEETHAM et al. 2015). Bei zwei der drei Versuchstiere konnte bis 259 Minuten bzw. 275 Minuten nach Perfusionsbeginn ein Anstieg des IMP nach Stimulation aufgezeichnet werden (Stim 5). Bis zum Messzeitpunkt Stim 3 ($146 \pm 10,15$ min nach Perfusionsbeginn) konnten vergleichbare Werte bei den Versuchstieren abgeleitet werden, danach sanken die Werte jedoch deutlich ab. Vergleicht man dies mit den ermittelten Werten für Laktat, so stellt man fest, dass der Laktatwert zum Messzeitpunkt 2 ($85 \pm 3,54$ min nach Perfusionsbeginn) noch in dem für Pferde in der Literatur angegebenen Normwert liegt. Da jedoch der Messzeitpunkt 2 für das Laktat und der Stim3 Wert für den IMP knapp 60 Minuten auseinander liegen, kann daraus keinerlei Korrelation zwischen Laktatanstieg und Absinken des IMP hergestellt werden. Dazu müsste in weiteren Versuchen die

Messzeitpunkte von Laktat und IMP synchronisiert werden. BERKE et al. (2007) konnten in ihrem Ex-vivo-Modell des kaninen Larynx bis zu zwei Stunden nach Perfusionsbeginn eine Phonation und bis ca. vier Stunden nach Perfusionsbeginn eine Bewegung der Stimmritze erzeugen. In ihren Folgeexperimenten konnten sie für den kaninen Larynx zwölf Stunden nach Perfusionsbeginn und für den humanen Larynx drei Stunden nach Perfusionsbeginn eine Phonation erzeugen (BERKE et al. 2013). Dies zeigt, wie groß die Variabilität zwischen den Spezies ist. Abschließend kann gesagt werden, dass der Test auf Funktionalität des CAD über die Messung des IMP nach elektrischer Stimulation auf Grund seiner interindividuellen Variabilität nicht das geeignete Mittel ist, um an dem vorliegenden Ex-vivo-Modell des equinen Larynx unterschiedliche Stimulationsparameter zu testen. Hier wären z. B. die Messung der elektrischen Feldverteilung (MARTINI et al. 2012) oder die Bestimmung des Abduktionsgrades des Arytaenoidknorpels (CHEETHAM et al. 2015) die geeignetere Methode. Dieser Test besitzt aber im Vergleich zum Test auf Kontraktilität des CAD eine höhere Aussagekraft über die Vitalität des entnommenen Kehlkopfes, da hier zusätzlich optisch die Abduktion des Aryknorpels beobachtet werden kann.

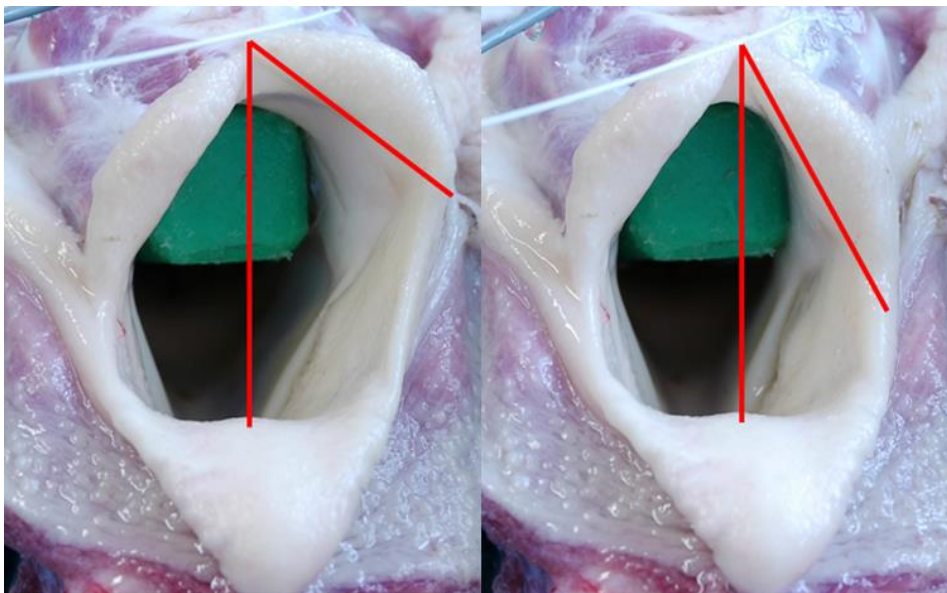


Abb. 5-2 Stimulation des linken CAD mit unterschiedlichen Stimulationsparametern. Beispielhaft ist ein Larynx dargestellt, dessen linker CAD mit unterschiedlichen Stimulationsparametern stimuliert wurde. Um die Stimulationsparameter miteinander zu vergleichen, kann der Abduktionsgrad des Arytaenoidknorpels bestimmt werden (rote Linien). Mit dieser Methode könnte auch die Funktionalität des CAD im Zeitverlauf bei einer Ex-Vivo-Perfusion verglichen werden.

Wie zuvor erwähnt, konnte bei zwei von drei Versuchstieren noch knapp viereinhalb Stunden nach Perfusionsbeginn ein Anstieg des IMP nach elektrischer Stimulation mit 5 mA verzeichnet werden. Ähnliche Ergebnisse konnten auch in einer anderen Arbeit gezeigt werden (MADEA 1992). Dort wurde der Daumenballen von humanen Leichen durch zwei Stimulationselektroden mit 4 mA stimuliert. Hier konnte noch viereinhalb Stunden post mortem eine Kontraktionskraft gemessen werden. In dieser Arbeit konnte auch gezeigt werden, dass die elektrische Erregbarkeit post mortem je nach Muskel variiert. So konnte der linke Bizeps ca. sechseinhalb Stunden nach dem Tod stimuliert werden, der linke Kleinfingerballen hingegen bis ca. elfeinhalb Stunden post mortem. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass eine Seitenvergleichbarkeit bei Stimulation des rechten und linken Daumenballens vorlag. Ob dies auf alle anderen Muskeln im Körper übertragbar ist, ist bisher nicht geprüft worden. In der vorliegenden Arbeit wurde nur der linke CAD auf Funktionalität überprüft. Es ist zu vermuten, dass die rechte Seite vergleichbare Ergebnisse liefert. Allerdings könnte es eine Differenz für den linken und rechten CAD bei Pferden geben, die an RLN leiden. Dies müsste aber in einer weiteren Studie verifiziert werden.

5.2.8 Feucht- / Trockengewicht

In der vorliegenden Arbeit wurde eine mittlere Gewichtszunahme von $27,16 \pm 19,73$ % beobachtet. Die prozentuale Gewichtszunahme pro Stunde Perfusion betrug durchschnittlich $4,7 \pm 3,58$ %. Bei einem Versuchstier wurde eine überdurchschnittlich hohe Gewichtszunahme während der Perfusion beobachtet (56,45 %). Auffällig war bei diesem Tier auch, dass bei der Überprüfung der Funktionalität des CAD (siehe 4.3.5) die letzte Stimulation (Stim 5) zu keinem messbaren Anstieg des intramuskulären Druckes führte. Die für dieses Tier ermittelten Werte für Laktat und LDH lagen jedoch unter dem Durchschnitt und alle weiteren Vitalitätstests bis auf Myo 1 waren positiv.

WÜSTENBERG (2006) konnte in ihrer Arbeit über die hämoperfundierte distale Rindergliedmaße Gewichtszunahmen von bis zu 14,73 % nach fünf Stunden Perfusion beobachten. Die Gliedmaßen wurden entweder mit Vollblut oder Blut-Dialysat-Mix flusskontrolliert perfundiert. Die durchschnittliche Gewichtszunahme wurde mit 3,99 % angegeben. Gliedmaßen, die eine Gewichtszunahme größer 10 % zeigten, wurden aus der Studie ausgeschlossen, da sie nach Ansicht der Autorin als organisch tot anzusehen waren. Als Grund für eine Ödembildung im perfundierten Organ wird eine Schädigung der Natrium-Kalium-Pumpen durch Sauerstoffmangel genannt. FRIEBE et al. (2013) hingegen schildern eine mittlere Gewichtszunahme von 4,5 % bei perfundierten distalen Gliedmaßen des Pferdes nach acht Stunden Perfusion. Hier wurde eine Tyrode-Lösung und als Zusatz Natrium-Carboxymethylcellulose bei konstantem Perfusionsfluss verwendet. BÄUMER et al. (2002)

sehen eine Gewichtszunahme nach fünf Stunden Perfusion mit einem Blut-Tyrode-Lösung-Mix bei konstantem Fluss beim perfundierten bovinen Uterus bis 20 % als tolerabel an. RIVIERE et al. (1986) berichten von einer Gewichtszunahme von 25 – 42 % bei isolierten perfundierten Hautlappen des Schweins nach zehn bis zwölf Stunden Perfusion mit einer Krebs-Ringer-Lösung bei konstantem Perfusionsfluss. Insgesamt wird daraus ersichtlich, dass die von verschiedenen Autoren akzeptierten Werte zwischen den einzelnen Organen und Spezies deutlich variieren. Bei den in der Literatur beschriebenen Versuchen mit perfundierten Kehlköpfen wurde das Organgewicht nicht bestimmt (BERKE et al. 2013, BERKE et al. 2007, HOWARD et al. 2015, MENDELSON et al. 2015). Somit sind die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Werte bisher einzigartig und können auch nicht mit Werten aus der Literatur verglichen werden. Das Organgewicht sollte daher nicht als alleiniger Vitalparameter herangezogen werden, sondern immer im Kontext mit weiteren Vitalparametern verwendet werden. In weiteren Versuchen könnte statt der entnommenen Muskelprobe auch der ganze Kehlkopf gewogen werden und untersucht werden, welche der beiden Methoden exaktere Werte liefert. Anzumerken zu der prozentualen Gewichtszunahme pro Stunde Perfusion ist, dass nicht zwingend ein linearer Zusammenhang bestehen muss. Dies müsste in weiteren Versuchen mittels stündlicher Gewebeproben und anschließender Feucht-/Trockengewichtbestimmung genauer untersucht werden. Der Einfluss verschiedener Perfusionsmedien wie Vollblut oder Blut-Tyrode-Lösung wäre in einem weiteren Versuchsansatz zu klären.

5.3 Fazit

Im Rahmen dieser Dissertation konnte erstmalig erfolgreich ein funktionales Ex-vivo-Modell des equinen Larynx etabliert werden. Im Gegensatz zu anderen Modellen wurde hier eine druckkonstante Perfusion verwendet. Die Vitalität des entnommenen Organs wurde über verschiedene Vitalitätstests überprüft. Die myogene Autoregulation hat sich grundsätzlich als verlässlicher Vitalitätstest erwiesen, der einfach durchgeführt werden kann. Er erfordert allerdings eine ausreichend lange Adaptationsphase und gelegentlich die Applikation eines Vasokonstriktors, bevor sich eine sichtbare myogene Autoregulation messen lässt. Dieser Vitalitätstest wurde durch die zusätzliche Verwendung vasoaktiver Substanzen ergänzt. So konnte Noradrenalin eine Vasokonstriktion und Nitroprussid und Papaverin eine Vasodilatation erzeugen und damit die Vitalität der Gefäße des entnommenen Kehlkopfes nachweisen. In weiteren Versuchen könnte durch Dosis-Wirkungs-Kurven eine Verfeinerung der Dosierung der einzelnen Substanzen erfolgen. Dem Test auf Kontraktilität des CAD kann nur eine geringe Aussagekraft beigemessen werden. Er wurde daher um den Test auf Funktionalität des CAD ergänzt. Die Messung des intramuskulären Druckes im CAD bei

Stimulation ist zum Nachweis der Funktionalität des CAD und damit auch des Kehlkopfes geeignet, hat sich aber auch als störanfällig erwiesen und müsste in weiteren Versuchen noch verfeinert werden. Die zusätzliche Bestimmung von Laktat und der Aktivität der LDH konnte zeigen, dass die LDH-Werte stets im in der Literatur genannten Normbereich für Pferde lag und der Laktat-Wert am Ende der Perfusion zwar den Normbereich überschritten hat, aber immer noch unter den Werten von Pferden nach einer Vollbelastung lag. Die Bestimmung von Feucht- und Trockengewicht vor und nach der Perfusion lieferte im Vergleich zu anderen perfundierten Organen höhere Werte.

5.4 Ausblick

Das in dieser Arbeit etablierte Ex-vivo-Modell des equinen Larynx bietet eine solide Grundlage für viele Forschungsvorhaben insbesondere im Bereich der Kehlkopflähmung. Für den experimentellen Bereich der Pferdemedizin ist es durch die gewählte druckkonstante Perfusion erstbeschreibend. So könnten beispielsweise in weiteren Studien unterschiedliche Stimulationsparameter für die Stimulation des CAD und deren Auswirkung auf den Verschluss der Stimmritze getestet werden. CHEETHAM et al. (2015) konnten zeigen, dass die FES bei Pferden mit denerviertem CAD in der Lage ist, die entstandene Muskelatrophie teilweise rückgängig zu machen. So konnte nach einmal täglicher Stimulation über einen Zeitraum von acht Wochen eine Zunahme der Muskelfaserdicke von 30 % beobachtet werden. Mit Hilfe des in dieser Arbeit entwickelten Ex-vivo-Modells könnten weitere Stimulationsparameter getestet werden und somit die Ergebnisse der FES weiter verfeinert werden.

Ebenso könnte das hier vorgestellte Modell auch auf andere Tierarten übertragen werden, um z. B. neue Behandlungsmethoden bei der Kehlkopflähmung des Hundes oder der Katze (MILLARD und TOBIAS 2009, SCHACHTER und NORRIS 2000) zu erforschen. Dazu müssten Perfusionsmedium und Perfusionsdruck an die jeweilige Spezies angepasst werden.

Um den jeweiligen Anforderungen weiterer Versuche noch besser gerecht zu werden, bietet sich eine Modifikation des Versuchsaufbaus an. So könnte der Perfusionskreislauf dahingehend verändert werden, dass kein geschlossenes Kreissystem mehr verwendet wird, sondern ein System, das dem in der Anästhesiologie eingesetztem halboffenen Narkosesystem ähnelt. Dabei würde dem Perfusionskreislauf ständig frisches Perfusionsmedium zugeführt werden und das bereits verwendete Medium dann aus der Perfusionswanne in den Abfall abgeführt werden. Während diese Methode im Vergleich zum geschlossenen Kreislaufsystem auf Grund des hohen Ressourcenverbrauchs deutlich unwirtschaftlicher wäre, hätte sie den

Diskussion

Vorteil, dass dem System ständig frisches Perfusionsmedium zur Verfügung stehen würde, was eine konstante optimale Versorgung des perfundierten Organs mit sich bringen würde.

Jenseits des Einsatzes in der Forschung am equinen Larynx eröffnen sich mit diesem Modell Einsatzgebiete in der humanen Forschung und in der veterinärmedizinischen Forschung an weiteren Spezies. Der Laryngospasmus stellt ein großes Problem in der pädiatrischen Anästhesie dar (ROY und LERMAN 1988). Häufig wird dabei zur Prävention Lidocain verwendet (MIHARA et al. 2014). Der Laryngospasmus ist auch eine gefürchtete Komplikation bei der endotrachealen Intubation der Katze. Auch hier wird oftmals Lidocain eingesetzt (DYSON 1988). In neueren Studien kommen z. B. auch Muskelrelaxantien wie Rocuronium zum Einsatz (MARTIN-FLORES et al. 2016). Auch hier könnte das in der vorliegenden Arbeit entwickelte Modell genutzt werden, um eine pharmakologische Beeinflussung des Kehlkopfes während eines Laryngospasmus zu untersuchen.

6 Zusammenfassung

Sven Otto

Etablierung eines isoliert druckkonstant perfundierten Ex-vivo-Modells des equinen Larynx

Veterinär-Anatomisches Institut der Veterinärmedizinischen Fakultät, Universität Leipzig

(75 Seiten, 32 Abbildungen, 5 Tabellen, 135 Literaturangaben)

Schlüsselwörter: Larynx, Ex-vivo-Modell, Organperfusion, Musculus cricoarytaenoideus dorsalis, Pferd, *recurrent laryngeal neuropathy*

Einführung: Der Einsatz von Ex-vivo-Modellen ermöglicht die experimentelle Untersuchung isolierter Organe, die vom Gesamtorganismus unbeeinflusst sind. Für viele Spezies und Organe sind solche Modelle bereits beschrieben. Wird das Organ dabei perfundiert, stehen flusskonstante und druckkonstante Perfusion zur Auswahl. Für den Larynx des Pferdes existiert in der Literatur bisher nur ein einziges flusskonstant perfundiertes Modell. Im Bereich der Pferdemedizin können solche Modelle helfen, neue Behandlungsoptionen der sogenannten *recurrent laryngeal neuropathy* (RLN) zu entwickeln, bei der es zu einer Atrophie des Musculus cricoarytaenoideus dorsalis (CAD) kommt.

Ziele der Untersuchungen: Die Studie hatte zum Ziel, ein druckkonstant perfundiertes Ex-vivo-Modell des equinen Larynx zu etablieren, in dessen Fokus insbesondere die Funktionalität des CAD stand. Hierzu wurden in zwei Vorversuchsphasen verschiedene Parameter auf ihre Eignung als Marker für die Vitalität des entnommenen Kehlkopfes getestet. Die ermittelten Parameter wurden dann in den Hauptversuchen verwendet, um die Vitalität des perfundierten Kehlkopfes zu Beginn und am Ende der Perfusion zu untersuchen.

Tiere, Material und Methoden: Für die Untersuchungen wurden Kehlköpfe von 16 Pferden verwendet. Diese wurden im direkten Anschluss an die Euthanasie frisch entnommen und im Labor an einen Perfusionskreislauf angeschlossen. Hierzu wurde eine modifizierte Tyrode-Lösung beidseits über die Arteria thyroidea cranialis perfundiert. Die Lösung wurde über den gesamten Versuchszeitraum mit Carbogen begast und somit ein pH-Wert von 7,35 bis 7,45 gehalten. Es wurde ein konstanter Perfusionsdruck von 9,81 kPA eingestellt. Im Anschluss an

Zusammenfassung

die Adaptationsphase wurden die Vitalitätsparameter zur Überprüfung der Unversehrtheit und Funktionalität der arteriellen Gefäßversorgung und des CAD getestet. Neben der myogenen Autoregulation wurde die Reaktion der Gefäße auf die Zugabe von Noradrenalin (NA), Nitroprussid (NO) und Papaverin (Papa) als Vasokonstriktor (NA) und Vasodilatoren (NO, Papa) ermittelt. Des Weiteren wurde die Kontraktilität und Funktionalität des CAD durch Messung des intramuskulären Druckes nach elektrischer Stimulation überprüft. Zusätzlich wurden aus dem Perfusat Proben zur Messung von Laktat und der Aktivität der Laktat-Dehydrogenase (LDH) zu drei Zeitpunkten entnommen. Für die statistische Auswertung wurden eine einfache ANOVA mit wiederholten Messungen sowie der Holm-Sidak-Test als Post-hoc-Test im Falle signifikanter Unterschiede verwendet. Dabei wurde eine Wahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ als statistisch signifikant angenommen.

Ergebnisse: Im Hauptversuch konnten an $n = 5$ Kehlköpfen Perfusionen über einen Zeitraum von $352 \pm 18,59$ Minuten durchgeführt werden. Die myogene Autoregulation zu Beginn der Perfusion war bei drei Kehlköpfen und zum Ende der Perfusion bei vier Kehlköpfen sichtbar. Auf die Zugabe von NA reagierten am Beginn der Perfusion vier Kehlköpfe und am Ende der Perfusion alle fünf Kehlköpfe mit einer Vasokonstriktion. NO erzeugte am Versuchsbeginn bei vier Kehlköpfen eine Vasodilatation. Die Zugabe von NO und Papa führte am Versuchsende in allen Fällen zu einer Vasodilatation. Die Kontraktilität des CAD nach elektrischer Stimulation konnte in allen Fällen am Versuchsbeginn und Versuchsende gemessen werden. Bei Überprüfung der Funktionalität des CAD zeigten sich insgesamt heterogene Messergebnisse. Im Verlauf der Perfusion stiegen sowohl die Konzentration des Laktats als auch die Aktivität der LDH statistisch signifikant an, lagen aber beide im Bereich der für das Pferd in der Literatur beschriebenen Normwerte.

Schlussfolgerungen: Die vorliegende Arbeit beschreibt erstmalig die Etablierung eines druckkonstant perfundierten Ex-vivo-Modells des equinen Larynx. Über verschiedene Vitalitätstests wurde die Intaktheit und Funktionalität des perfundierten Kehlkopfes überprüft. Die myogene Autoregulation hat sich als sinnvoller aber störanfälliger Test erwiesen. Die Applikation vasoaktiver Substanzen zur Überprüfung der Funktionalität der arteriellen Gefäße hat sich als sehr zuverlässig gezeigt. Der Test auf Kontraktilität des CAD hat sich als Vitalitätsparameter mit geringer Aussagekraft gezeigt. Der Test auf Funktionalität des CAD hingegen hatte eine höhere Aussagekraft über die Vitalität des entnommenen Kehlkopfes, zeigte aber auch interindividuelle Schwankungen. Das in der vorliegenden Arbeit beschriebene Ex-vivo-Modell stellt eine solide Grundlage für weitere Untersuchungen auf dem Gebiet der Kehlkopflähmung dar.

7 Summary

Sven Otto

Establishing an Isolated Pressure-consistent Perfused Ex-vivo Model of the Equine Larynx

Institute of Anatomy, Histology and Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig

(75 pages, 32 images, 5 tables, 135 references)

Key words: larynx, ex vivo model, organ perfusion, cricoarytenoideus dorsalis muscle, horse, recurrent laryngeal neuropathy

Introduction: The application of ex vivo models enables examinations of isolated organs unaffected by the organism as a whole. Those kinds of models are already well-described for various species and organs. If the respective organ is to be perfused, there are two different options: constant flow perfusion or constant pressure perfusion. In the area of equine medicine those models can help in the development of new treatment options for the so-called recurrent laryngeal neuropathy (RLN), which leads on to an atrophy of the cricoarytenoideus dorsalis muscle (CAD). For the equine larynx only one constant flow perfusion system has been described in the literature so far.

Aims of the study: The aim of this study was to establish a constant pressure perfused ex vivo model of the equine larynx, with special focus on the function of the CAD. Therefore, different parameters were tested – in two pre-test phases – for their applicability as vitality markers for the isolated larynx. The ascertained parameters were then used in the main experiments to test the vitality of the perfused larynx at the beginning and in the end of perfusion.

Animals, materials and methods: For the tests the larynges of 16 horses were used. The larynges were dissected immediately after euthanasia and connected to a perfusion circuit in the lab. For this purpose, a modified Tyrode's solution was perfused via the thyroidea cranialis artery on both sides. The solution was gassed with Carbogen during the entire test and, therefore, it was possible to maintain the pH-value between 7.35 and 7.45. The perfusion pressure was set to a constant 9.81kPA. After an adaptation phase the established vitality parameters were used to check intactness and functionality of the arterial vascularization and the CAD. Next to myogenic autoregulation also the vessels' reaction to the addition of norepinephrine (NE), sodium nitroprusside (SNP) and papaverine (Papa) as vasoconstrictor (NE) and vasodilators (SNP, Papa) was tested. Furthermore, contractility and functionality of

Summary

the CAD were examined by measuring its intramuscular pressure after electric stimulation. Additionally, samples were taken from the perfusate three times in order to measure lactate and the activity of lactate dehydrogenase (LDH). For statistical evaluation One-Way repeated measures ANOVA and the Holm-Sidak Test for post hoc analysis were used in case of significant differences. A probability of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results: In the main test phase we were able to carry out a perfusion of $n = 5$ larynges over a period of 352 ± 18.59 minutes. Myogenic autoregulation at the beginning of perfusion was apparent in three larynges and in the end of perfusion in four larynges. At the beginning of perfusion four larynges reacted to the addition of NE, and in the end this led to a vasoconstriction in all five larynges. Administering SNP at the beginning of the perfusion led to a vasodilatation in four larynges. Addition of SNP and Papa led to a vasodilation in all cases at the end of the experiments. Contractility of the CAD after electric stimulation could be measured at the beginning and in the end of the test in all cases. For checking functionality of the CAD heterogeneous results could be obtained. During the process of perfusion the concentration of lactate as well as the activity of the LDH increased statistically significantly. Both were within the standard values for horses described in the literature.

Conclusions: This study for the first time describes the establishment of a constant pressure perfused ex vivo model of the equine larynx. With the help of different vitality tests intactness and functionality of the perfused larynx were examined. Myogenic autoregulation proved to be a useful test, which, however, is prone to failure. Application of vasoactive substances in order to test intactness and functionality of the CAD proved to be a reliable vitality parameter. Testing the contractility of the CAD proved to be a vitality parameter with restricted validity. In contrast, the test checking functionality of the CAD was more informative for the vitality of the isolated larynx, but also showed interindividual variation. The ex vivo model described in this study establishes a solid basis for further examination laryngeal paralysis.

8 Literaturverzeichnis

- Anderson MG. The effect of exercise on the lactic dehydrogenase and creatine kinase isoenzyme composition of horse serum. *Res Vet Sci.* 1976;20(2):191–6.
- Angus JA, Campbell GR, Cocks TM, Manderson JA. Vasodilatation by acetylcholine is endothelium-dependent: A study by sonomicrometry in canine femoral artery in vivo. *J Physiol.* 1983;344:209–22.
- Bakhshae H, Young J, Yang, Justin C W, Mongeau L, Miri AK. Determination of strain field on the superior surface of excised larynx vocal folds using DIC. *J Voice.* 2013;27(6):659–67.
- Ballard RE, Watenpugh DE, Breit GA, Murthy G, Holley DC, Hargens AR. Leg intramuscular pressures during locomotion in humans. *J Appl Physiol.* 1998;84(6):1976–81.
- Barker E, Macchiarini P, Murison P, Jones A, Haverson K, Bailey M et al. An ex vivo model for reperfusion of laryngotracheal grafts. *Laryngoscope.* 2005;115(4):699–702.
- Bäumer W, Mertens A, Braun M, Kietzmann M. The isolated perfused bovine uterus as a model for mucous membrane irritation and inflammation. *ALTEX.* 2002;19(2):57–63.
- Bayliss WM. On the local reactions of the arterial wall to changes of internal pressure. *J Physiol.* 1902;28(3):220–31.
- Berke G, Mendelsohn AH, Howard NS, Zhang Z. Neuromuscular induced phonation in a human ex vivo perfused larynx preparation. *J Acoust Soc Am.* 2013;133(2):7.
- Berke GS, Neubauer J, Berry DA, Ye M, Chhetri DK. Ex vivo perfused larynx model of phonation: preliminary study. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2007;116(11):866–70.
- Blomkalns AL. Lactate – a marker for sepsis and trauma. *EMCREG.* 2006;2(1):43–9.
- Bolton TB, Clapp LH. Endothelial-dependent relaxant actions of carbachol and substance P in arterial smooth muscle. *Br J Pharmacol.* 1986;87(4):713–23.
- Boulanger CM, Vanhoutte PM. Interleukin-2 causes endothelium-dependent contractions to arachidonic acid. *Hypertension.* 1993;21(3):289–93.
- Boyko AR, Brooks SA, Behan-Braman A, Castelhana M, Corey E, Oliveira KC et al. Genomic analysis establishes correlation between growth and laryngeal neuropathy in Thoroughbreds. *BMC genomics.* 2014;15:259.
- Bradley OC. The topographical anatomy of the head and neck of the horse. Edinburgh: Green; 1923.
- Busse R. Kreislauf. In: Schmidt RF, Lang F, Hrsg. *Physiologie des Menschen: Mit Pathophysiologie.* 30. Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer Medizin Verlag Heidelberg; 2007. p. 618–682.
- Cahill JI, Goulden BE. The pathogenesis of equine laryngeal hemiplegia--a review. *N Z Vet J.* 1987;35(6):82–90.
- Chan FK, Moriwaki K, De Rosa MJ. Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase activity. *Methods Mol Biol.* 2013;979:65–70.

- Cheetham J, Perkins JD, Jarvis JC, Cercone M, Maw M, Hermanson JW et al. Effects of Functional Electrical Stimulation on Denervated Laryngeal Muscle in a Large Animal Model. *Artif Organs*. 2015;39(10):876–85.
- Cheetham J, Radcliffe CR, Ducharme NG, Sanders I, Mu L, Hermanson JW. Neuroanatomy of the equine dorsal cricoarytenoid muscle: surgical implications. *Equine Vet J*. 2008;40(1):70–5.
- Cheetham J, Regner A, Jarvis JC, Priest D, Sanders I, Soderholm LV et al. Functional electrical stimulation of intrinsic laryngeal muscles under varying loads in exercising horses. *PloS one*. 2011;6(8):e24258.
- Collins DC. Surgical Importance of Papaverin Hydrochlorid. *Cal West Med*. 1939;51(5):307–9.
- Danese E, Montagnana M. An historical approach to the diagnostic biomarkers of acute coronary syndrome. *Ann Transl Med*. 2016;4(10):194.
- Dave A, Maru L, Jain A. LDH (Lactate Dehydrogenase): A Biochemical Marker for the Prediction of Adverse Outcomes in Pre-eclampsia and Eclampsia. *J Obstet Gynecol India*. 2016;66(1):23–9.
- Davenport-Goodall CLM, Parente EJ. Disorders of the larynx. *Vet Clin North Am Equine Pract*. 2003;19(1):169–87.
- Davis J, Kaufman KR, Lieber RL. Correlation between active and passive isometric force and intramuscular pressure in the isolated rabbit tibialis anterior muscle. *J Biomech*. 2003;36(4):505–12.
- Davis MJ, Hill MA. Signaling mechanisms underlying the vascular myogenic response. *Physiol Rev*. 1999;79(2):387–423.
- Davis MJ, Sikes PJ. Myogenic responses of isolated arterioles: Test for a rate-sensitive mechanism. *Am J Physiol*. 1990;259(6 Pt 2):H1890-900.
- Dhein S. The Langendorff Heart. In: Dhein S, Mohr FW, Delmar M, Hrsg. *Practical methods in cardiovascular research*. Berlin, New York: Springer; 2005. p. 155–172.
- Dhein S, Giessler C, Heinroth-Hoffmann I, Leineweber K, Seyfarth T, Brodde O-E. Changes in alpha(1)-adrenergic vascular reactivity in monocrotaline-treated rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2002;365(2):87–95.
- Dhein S, Zhao Y, Simsek S, Salameh A, Klaus W. Actions of 1,4-dihydropyridines in isolated mesenteric vascular beds. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1995;26(5):784–91.
- Droutsas K, Petrak M, Melles, Gerrit R J, Koutsandrea C, Georgalas I, Sekundo W. A simple ex vivo model for teaching Descemet membrane endothelial keratoplasty. *Acta Ophthalmol*. 2014;92(5):5.
- Ducharme NG, Cheetham J, Sanders I, Hermanson JW, Hackett RP, Soderholm LV et al. Considerations for pacing of the cricoarytenoid dorsalis muscle by neuroprosthesis in horses. *Equine Vet J*. 2010;42(6):534–40.
- Duncan ID, Griffiths IR, McQueen A, Baker GO. The pathology of equine laryngeal hemiplegia. *Acta Neuropathol*. 1974;27(4):337–48.

- Dyce KM, Sack WO, Wensing CJG. General Anatomy: The Respiratory Apparatus. In: Dyce KM, Sack WO, Wensing, C. J. G, Hrsg. Textbook of veterinary anatomy. 4. Aufl. St. Louis, Mo: Saunders/Elsevier; 2010. p. 148–166.
- Dyson DH. Efficacy of lidocaine hydrochloride for laryngeal desensitization: a clinical comparison of techniques in the cat. *J Am Vet Med Assoc.* 1988;192(9):1286–8.
- Esche V. Einfluss verschiedener Heparinisierungskonzepte auf die Funktion und Stabilität des isoliert hämoperfundierte Schweinejunums im Rahmen der Modelletablierung [Dissertation med. vet]. Berlin: Freie Universität Berlin; 2007.
- Farías JG, Herrera EA, Carrasco-Pozo C, Sotomayor-Zárate R, Cruz G, Morales P et al. Pharmacological models and approaches for pathophysiological conditions associated with hypoxia and oxidative stress. *Pharmacol Ther.* 2016;158:1–23.
- Förstermann U. Pharmakologie des kardiovaskulären Systems – die Blutgefäße – Behandlung von Hypertonie und Hypotonie. In: Aktories K, Förstermann U, Hofmann FB, Starke K, Hrsg. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie: Begründet von W. Forth, D. Henschler. W. Rummel. 11. Aufl. München: Urban & Fischer in Elsevier; 2013. p. 437–473.
- Franco RA, Dowdall JR, Bujold K, Amann C, Faquin W, Redmond RW et al. Photochemical repair of vocal fold microflap defects. *Laryngoscope.* 2011;121(6):1244–51.
- Friebe M, Stahl J, Kietzmann M. The isolated perfused equine distal limb as an ex vivo model for pharmacokinetic studies. *J Vet Pharmacol Ther.* 2013;36(3):292–7.
- Garrett CG, Coleman JR, Reinisch L. Comparative histology and vibration of the vocal folds: implications for experimental studies in microlaryngeal surgery. *Laryngoscope.* 2000;110(5 Pt 1):814–24.
- Gericke A, Steege A, Manicam C, Böhmer T, Wess J, Pfeiffer N. Role of the M3 Muscarinic Acetylcholine Receptor Subtype in Murine Ophthalmic Arteries After Endothelial Removal. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014;55(1):625–31.
- Goody P, Goody J. Anatomie des Pferdes. Stuttgart (Hohenheim): Ulmer; 2004.
- Grabner A, Fey K. Spezielle Untersuchungen beim Pferd. In: Moritz A, Hrsg. Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin: Der neue Kraft/Dürr. Mit 286 Tabellen. 7. Aufl. Stuttgart: Schattauer; 2014. p. 703–725.
- Grosse-Siestrup C, Fehrenberg C, Baeyer H von, Groneberg DA. Multiple-organ harvesting for models of isolated hemoperfused organs of slaughtered pigs. *ALTEX.* 2002;19(1):9–13.
- Guillemot A, Rouvre G, Autefage A, Etchepareborde S. Changes in rima glottidis area and lack of laryngeal epiglottic-glottic seal after unilateral cricoarytenoid lateralization ex vivo. *Vet Surg.* 2015;44(2):236–41.
- Guy PS, Snow DH. The effect of training and detraining on lactate dehydrogenase isoenzymes in the horse. *Biochem Biophys Res Commun.* 1977;75(4):863–9.
- Hargens AR, Ballard RE. Basic principles for measurement of intramuscular pressure. *Oper Tech Sports Med.* 1995;3(4):237–42.
- Harrison IW, Speirs VC, Braund KG, Steiss JE. Attempted reinnervation of the equine larynx using a muscle pedicle graft. *Cornell Vet.* 1992;82(1):59–68.

- Harrison WE, Mellor AJ, Clark J, Singer DR. Vasodilator pre-treatment of human radial arteries; comparison of effects of phenoxybenzamine vs papaverine on norepinephrine-induced contraction in vitro. *Eur Heart J.* 2001;22(23):2209–16.
- Hellmold A. Herzfrequenz und Laktat von Warmblutpferden in der Anreitphase und zu Beginn der Ausbildung [Dissertation med. vet]. Hannover: Tierärztliche Hochschule Hannover; 2009.
- Herrera VLM, Viereck JC, Lopez-Guerra G, Kumai Y, Kobler J, Karajanagi S et al. 11.7 Tesla magnetic resonance microimaging of laryngeal tissue architecture. *Laryngoscope.* 2009;119(11):2187–94.
- Hosgood S, Harper S, Kay M, Bagul A, Waller H, Nicholson ML. Effects of arterial pressure in an experimental isolated haemoperfused porcine kidney preservation system. *Br J Surg.* 2006;93(7):879–84.
- Hottinger DG, Beebe DS, Kozhimannil T, Prielipp RC, Belani KG. Sodium nitroprusside in 2014: A clinical concepts review. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol.* 2014;30(4):462–71.
- Howard NS, Mendelsohn AH, Berke GS. Development of the ex vivo laryngeal model of phonation. *Laryngoscope.* 2015;125(6):1414–9.
- Jarajapu YPR, Grant MB, Knot HJ. Myogenic tone and reactivity of the rat ophthalmic artery. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004;45(1):253–9.
- Karagiannis MH, Reniker AN, Kerl ME, Mann FA. Lactate measurement as an indicator of perfusion. *Compendium.* 2006;28(4):287–98.
- Karaki H, Urakawa N, Kutsky P. Potassium-induced contraction in smooth muscle. *Nihon Heikatsukin Gakkai zasshi.* 1984;20(6):427–44.
- Kim SS, Yang HW, Kang HG, Lee HH, Lee HC, Ko DS et al. Quantitative assessment of ischemic tissue damage in ovarian cortical tissue with or without antioxidant (ascorbic acid) treatment. *Fertil Steril.* 2004;82(3):679–85.
- Knaak JM, Spetzler VN, Goldaracena N, Boehnert MU, Bazerbachi F, Louis KS et al. Subnormothermic ex vivo liver perfusion reduces endothelial cell and bile duct injury after donation after cardiac death pig liver transplantation. *Liver transpl.* 2014;20(11):1296–305.
- Kölle S, Reese S, Mülling C. Kopf: Kehlkopf und Kehlkopfmuskeln. In: Mülling C, Hrsg. *Atlas der Anatomie des Pferdes: Herausgeben von Christoph Mülling, Christiane Pfarrer, Sven Reese, Sabine Kölle, Klaus-Dieter Budras.* 7. Aufl. Hannover: Schlütersche; 2013. p. 198–201.
- König HE, Liebich H-G. Atmungsapparat: (Apparatus respiratorius). In: König HE, Liebich H-G, Hrsg. *Anatomie der Haussäugetiere: Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis ; mit 53 Tabellen ; + Vet-Anatomie online.* Stuttgart: Schattauer; 2012. p. 367–388.
- Kontny A. Papaverinwirkung an isoliert arbeitenden Ratten- und Meerschweinchenherzen bei unterschiedlicher Kalziumkonzentration [Dissertation med.]. Berlin: Freie Universität Berlin; 2003.
- Koo HJ, Burns JA, Kobler JB, Heaton JT, Zeitels SM. Novel device for tissue cooling during endoscopic laryngeal laser surgery: thermal damage study in an ex vivo calf model. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2012;121(7):485–9.

- Korte M. Leistungsbewertung bei Pferden mit definierten Trainingsprogrammen und bei Pferden mit nicht überwachtem Training [Dissertation med. vet]. Hannover: Tierärztliche Hochschule Hannover; 2006.
- Koukourakis MI, Kakouratos C, Kalamida D, Bampali Z, Mavropoulou S, Sivridis E et al. Hypoxia-inducible proteins HIF1alpha and lactate dehydrogenase LDH5, key markers of anaerobic metabolism, relate with stem cell markers and poor post-radiotherapy outcome in bladder cancer. *Int J Radiat Biol.* 2016;92(7):353–63.
- Krössin T. Untersuchungen von Nierenfunktionsparametern zur Beschreibung des akuten Nierenversagens der extrakorporal normotherm perfundierten porcinen Schlachthausniere [Dissertation med.]. Berlin: Freie Universität Berlin; 2007.
- Langendorff O. Untersuchungen am überlebenden Säugetierherzen. *Pflügers Arch.* 1895;61(6):291–332.
- Lechartier A, Rossignol F, Brandenberger O, Vitte A, Mespoulhès-Rivière C, Rossignol A et al. Mechanical Comparison of 3 Anchoring Techniques in the Muscular Process for Laryngoplasty in the Equine Larynx. *Vet Surg.* 2014;44(3):333–40.
- Liu G, Rubinstein M, Saidi A, Qi W, Foulad A, Wong B et al. Imaging vibrating vocal folds with a high speed 1050 nm swept source OCT and ODT. *Opt Express.* 2011;19(12):11880–9.
- Liu Y, Harder DR, Lombard JH. Myogenic activation of canine small renal arteries after nonchemical removal of the endothelium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1994;267(1):H302-H307.
- Lobsien E. Das Zusammenspiel von Stickstoffmonoxid und Kaliumkanälen in der zerebrovaskulären Reaktion auf gesteigerte Kaliumkonzentrationen - eine in-vitro Studie [Dissertation med.]. Berlin: Freie Universität Berlin; 2009.
- Löscher W. Pharmaka mit Wirkung auf das autonome (vegetative) Nervensystem: Sympathikus. In: Löscher W, Ungemach FR, Kroker R, Hrsg. *Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren: 99 Tabellen.* 8. Aufl. Stuttgart: Enke; 2010. p. 43–56.
- Lugnier C, Stoclet JC. Inhibition by papaverine of cGMP and cAMP phosphodiesterases from the rat heart. *Biochem Pharmacol.* 1974;23(21):3071–4.
- Madea B. Estimating time of death from measurement of the electrical excitability of skeletal muscle. *J Forensic Sci Soc.* 1992;32(2):117–29.
- Mancina E, Kalenski J, Paschenda P, Beckers C, Bleilevens C, Boor P et al. Determination of the preferred conditions for the isolated perfusion of porcine kidneys. *Eur Surg Res.* 2015;54(1-2):44–54.
- Markwell HJ, Mueller POE. Ex Vivo Mechanical Evaluation of a Sternal ZipFix((R)) Implant for Prosthetic Laryngoplasty in Horses. *Vet Surg.* 2016;45(4):450–5.
- Martin W, Furchgott RF, Villani GM, Jothianandan D. Phosphodiesterase inhibitors induce endothelium-dependent relaxation of rat and rabbit aorta by potentiating the effects of spontaneously released endothelium-derived relaxing factor. *J Pharmacol Exp Ther.* 1986;237(2):539–47.
- Martin-Flores M, Sakai DM, Portela DA, Borlle L, Campoy L, Glead RD. Prevention of laryngospasm with rocuronium in cats: a dose-finding study. *Vet Anaesth Analg.* 2016;43(5):511–8.

- Martini P, Cercone M, Cheetham J, Koch KP. Experimental electrical field distribution measurements in a perfused ex vivo model. *Biomed Tech.* 2012;57(Suppl. 1):870–3.
- Matera MG, Calzetta L, Rogliani P, Bardaro F, Page CP, Cazzola M. Evaluation of the effects of the R- and S-enantiomers of salbutamol on equine isolated bronchi. *Pulm Pharmacol Ther.* 2011;24(2):221–6.
- Maytag AL, Robitaille MJ, Rieves AL, Madsen J, Smith BL, Jiang JJ. Use of the rabbit larynx in an excised larynx setup. *J Voice.* 2013;27(1):24–8.
- McClellan NR, Santschi EM, Hurcombe SD, Litsky AS. An ex vivo model to evaluate the effect of cyclical adductory forces on maintenance of arytenoid abduction after prosthetic laryngoplasty performed with and without mechanical arytenoid abduction. *Vet Surg.* 2014;43(5):598–605.
- Mendelsohn AH, Zhang Z, Luegmair G, Orestes M, Berke GS. Preliminary Study of the Open Quotient in an Ex Vivo Perfused Human Larynx. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg.* 2015;141(8):751–6.
- Mihara T, Uchimoto K, Morita S, Goto T. The efficacy of lidocaine to prevent laryngospasm in children: a systematic review and meta-analysis. *Anaesthesia.* 2014;69(12):1388–96.
- Millard RP, Tobias KM. Laryngeal paralysis in dogs. *Compend Contin Educ Vet.* 2009;31(5):212–9.
- Mitsui M, Karaki H. Dual effects of carbachol on cytosolic Ca²⁺ and contraction in intestinal smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol.* 1990;258(5):C787-C793.
- Nakhostine M, Styf JR, van Leuven S, Hargens AR, Gershuni DH. Intramuscular pressure varies with depth: The tibialis anterior muscle studied in 12 volunteers. *Acta Orthop Scand.* 2009;64(3):377–81.
- Nassar A, Liu Q, Farias K, D'Amico G, Tom C, Grady P et al. Ex Vivo Normothermic Machine Perfusion Is Safe, Simple, and Reliable: Results From a Large Animal Model. *Surg Innov.* 2015;22(1):61–9.
- Nelson K, Bobba C, Ghadiali S, Jr DH, Black SM, Whitson BA. Animal models of ex vivo lung perfusion as a platform for transplantation research. *World J Exp Med.* 2014;4(2):7–15.
- Obi T, Kabeyama A, Nishio A. Characterization of muscarinic receptor subtype mediating contraction and relaxation in equine coronary artery in vitro. *J Vet Pharmacol Ther.* 1994;17(3):226–31.
- Oey L. Untersuchungen der Skelettmuskulatur bei Pferden mit chronischen Pneumopathien [Dissertation med. vet]. Hannover: Tierärztliche Hochschule Hannover; 2006.
- O'Neil MP, Fleming JC, Badhwar A, Guo LR. Pulsatile versus nonpulsatile flow during cardiopulmonary bypass: microcirculatory and systemic effects. *Ann Thorac Surg.* 2012;94(6):2046–53.
- Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 1987;327(6122):524–6.
- Paulsen F, Waschke J. Hals: Kehlkopf. In: Paulsen F, Waschke J, Hrsg. *Sobotta Atlas der Anatomie des Menschen Band 3: Kopf, Hals und Neuroanatomie: 569 farbige Tafelbilder mit 627 Einzelabbildungen.* 23. Aufl. München: Elsevier, Urban & Fischer; 2010. p. 180–191.

- Perkins JD, Raffetto J, Thompson C, Weller R, Piercy RJ, Pfau T. Three-dimensional biomechanics of simulated laryngeal abduction in horses. *Am J Vet Res.* 2010;71(9):1003–10.
- Pescina S, Govoni P, Potenza A, Padula C, Santi P, Nicoli S. Development of a Convenient ex vivo Model for the Study of the Transcorneal Permeation of Drugs: Histological and Permeability Evaluation. *J Pharm Sci.* 2015;104(1):63–71.
- Pham DV, Shah A, Borao FJ, Gorcey S. Endoscopic submucosal dissection training with ex vivo human gastric remnants. *Surg Endosc.* 2014;28(1):222–6.
- Pinte S, Caetano B, Le Bras A, Havet C, Villain G, Dernayka R et al. Endothelial Cell Activation is Regulated by Epidermal Growth Factor-Like Domain 7 (Egfl7) during Inflammation. *J Biol Chem.* 2016;291(46):24017–28.
- Pösch G, Kukovetz WR. Papaverine - induced inhibition of phosphodiesterase activity in various mammalian tissues. *Life Sci I.* 1971;10(3):133–44.
- Quinlan TJ, Goulden BE, Barnes GR, Anderson LJ, Cahill JI. Innervation of the equine intrinsic laryngeal muscles. *N Z Vet J.* 1982;30(4):43–5.
- Ratz PH, Berg KM, Urban NH, Miner AS. Regulation of smooth muscle calcium sensitivity: KCl as a calcium-sensitizing stimulus. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2005;288(4):C769-83.
- Reesink HL, Hermanson JW, Cheetham J, Mu L, Mitchell LM, Soderholm LV et al. Anatomic and neuromuscular characterisation of the equine cricothyroid muscle. *Equine Vet J.* 2013;45(5):630–6.
- Reichel M, Martinek J. Simulation of the Electrical Field in Equine Larynx to Optimize Functional Electrical Stimulation in Denervated Musculus Cricoarythenoideus Dorsalis. *Eur J Transl Myol.* 2014;24(3):3320.
- Riviere JE, Bowman KF, Monteiro-Riviere NA, Dix LP, Carver MP. The isolated perfused porcine skin flap (IPPSF). I. A novel in vitro model for percutaneous absorption and cutaneous toxicology studies. *Fundam Appl Toxicol.* 1986;7(3):444–53.
- Robertz A. Biomechanische Zugversuche am Arytaenoid und Cricoid des Pferdes unter Verwendung von metallischen Implantaten [Dissertation med. vet]. Hannover: Tierärztliche Hochschule Hannover; 2008.
- Rohlf AK, Goodyer E, Clauditz T, Hess M, Kob M, Koops S et al. The anisotropic nature of the human vocal fold: an ex vivo study. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2013;270(6):1885–95.
- Roman RJ, van Dokkum RP. Commentary on the special issue on the impact of myogenic tone in health and disease. *Curr Vasc Pharmacol.* 2014;12(6):779.
- Rossignol F, Vitte A, Boening J, Maher M, Lechartier A, Brandenberger O et al. Laryngoplasty in standing horses. *Vet Surg.* 2015;44(3):341–7.
- Roy WL, Lerman J. Laryngospasm in paediatric anaesthesia. *Can J Anaesth.* 1988;35(1):93–8.
- Russell WM, Burch RL. The principles of humane experimental technique. London: Methuen; 1959.
- Salomon F-V. Atmungsapparat, Apparatus respiratorius: Kehlkopf, Larynx. In: Salomon F-V, Hrsg. *Anatomie für die Tiermedizin.* 2. Aufl. Stuttgart: Enke; 2008. p. 341–349.

- Sanchez PG, Bittle GJ, Burdorf L, Pierson III RN, Griffith BP. State of Art: Clinical ex vivo lung perfusion: Rationale, current status, and future directions. *J Heart Lung Transplant*. 2012;31(4):339–48.
- Sanders I, Jacobs I, Wu BL, Biller HF. The three bellies of the canine posterior cricoarytenoid muscle: implications for understanding laryngeal function. *Laryngoscope*. 1993;103(2):171–7.
- Sanders I, Wu BL, Mu L, Biller HF. The innervation of the human posterior cricoarytenoid muscle: evidence for at least two neuromuscular compartments. *Laryngoscope*. 1994;104(7):880–4.
- Schachter S, Norris CR. Laryngeal paralysis in cats: 16 cases (1990-1999). *J Am Vet Med Assoc*. 2000;216(7):1100–3.
- Schneider H. Ligandenunabhängige Aktivierung heptahelikaler Transmembranrezeptoren: der Bayliss-Effekt als Paradebeispiel für Mechanosensitivität [Dissertation med.]. München: Ludwig-Maximilians-Universität München; 2013.
- Schubert R. Isolated Vessels. In: Dhein S, Mohr FW, Delmar M, Hrsg. *Practical methods in cardiovascular research*. Berlin, New York: Springer; 2005. p. 198–211.
- Sejersted OM, Hargens AR, Kardel KR, Blom P, Jensen O, Hermansen L. Intramuscular fluid pressure during isometric contraction of human skeletal muscle. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol*. 1984;56(2):287–95.
- Shmueli J, Israilov S, Segenreich E, Baniel J, Livne P. Progressive treatment of erectile dysfunction with intracorporeal injections of different combinations of vasoactive agents. *Int J Impot Res*. 1999;11(1):15–9.
- Stadler M, Nuyens V, Seidel L, Albert A, Boogaerts JG. Effect of nutritional status on oxidative stress in an ex vivo perfused rat liver. *Anesthesiology*. 2005;103(5):978–86.
- Starke K. Pharmakologie noradrenerger und adrenerger Systeme – Pharmakotherapie des Asthma bronchiale – Doping. In: Aktories K, Förstermann U, Hofmann FB, Starke K, Hrsg. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie: Begründet von W. Forth, D. Henschler, W. Rummel*. 11. Aufl. München: Urban & Fischer in Elsevier; 2013. p. 153–189.
- Stephens JA, Taylor A. Fatigue of maintained voluntary muscle contraction in man. *J Physiol*. 1972;220(1):1–18.
- Swan HJC. Effect of noradrenaline on the human circulation. *Lancet*. 1949;2(6577):508–10.
- Topalov I, Daskalov I. Electrical stimulation for rapid assessment of extremity tissues vitality in critical ischemia. *Ann Chir*. 2004;129(2):79–82.
- Vesey CJ, Cole PV, Simpson PJ. Cyanide and thiocyanate concentrations following sodium nitroprusside infusion in man. *Br J Anaesth*. 1976;48(7):651–60.
- Voss B, Krane M, Jung C, Brockmann G, Braun S, Günther T et al. Cardiopulmonary bypass with physiological flow and pressure curves: pulse is unnecessary! *Eur J Cardiothorac Surg*. 2010;37(1):223–32.
- Waibl H. Atmungsapparat: Kehlkopf. In: Nickel R, Seiferle E, Frewein J, Hrsg. *Eingeweide. Lehrbuch der Anatomie der Haustiere 2: Parey*; 2004. p. 245–256.

Literaturverzeichnis

Ward SR, Davis J, Kaufman KR, Lieber RL. Relationship between muscle stress and intramuscular pressure during dynamic muscle contractions. *Muscle Nerve*. 2007;36(3):313–9.

Warther S, Sehner S, Raupach T, Puschel K, Anders S. Estimation of the time since death: post-mortem contractions of human skeletal muscles following mechanical stimulation (idiomuscular contraction). *Int J Legal Med*. 2012;126(3):399–405.

Winters TM, Sepulveda GS, Cottler PS, Kaufman KR, Lieber RL, Ward SR. Correlation between isometric force and intramuscular pressure in rabbit tibialis anterior muscle with an intact anterior compartment. *Muscle Nerve*. 2009;40(1):79–85.

Witte TH, Cheetham J, Rawlinson JJ, Soderholm LV, Ducharme NG. A transducer for measuring force on surgical sutures. *Can J Vet Res*. 2010;74(4):299–304.

Wright D, Sharma P, Ryu M-H, Risse P-A, Ngo M, Maarsingh H et al. Models to study airway smooth muscle contraction in vivo, ex vivo and in vitro: implications in understanding asthma. *Pulm Pharmacol Ther*. 2013;26(1):24–36.

Wüstenberg R-Y. Modell der isoliert hämoperfundierte distalen Rindergliedmaßen für experimentelle Untersuchungen zur Pathogenese der Klauenrehe [Dissertation med. vet]. Berlin: Freie Universität Berlin; 2006.

Yavuz C, Callskan A, Karahan O, Demirtas S, Yazici S, Guclu O et al. Evaluation of the vasoplegic impact of papaverine in the rat aorta. *J Pak Med Assoc*. 2014;64(6):660–3.

Danksagung

Mein Dank gilt zunächst meinem Doktorvater Herrn Professor Doktor C. Mülling für die Vergabe und Betreuung des Themas. Es war eine tolle Zeit im Veterinär-Anatomischen Institut! Dies nicht zuletzt wegen des unheimlich netten Miteinanders, vielen Dank an das gesamte Team und insbesondere an Verena Tast und Jenny Heinze für ihre Unterstützung bei der Vorbereitung der Versuche und Janet Reichenbach für Formatierungshilfen aller Art.

Weiter möchte ich der Klinik für Pferde und dem Veterinär-Physiologischem Institut für ihre Unterstützung bei der Durchführung der Versuche danken. Herrn Dr. rer. nat. Gábor Köller und seinem Team aus dem Labor danke ich für die Bestimmung von Laborwerten.

Ein weiterer großer Dank gebührt Werner Lindenthaler und der Firma MED-EL für das Stipendium sowie die Projektmittel im Rahmen meiner Doktorarbeit. Vor allem die Möglichkeit zur Teilnahme an Kongressen sowie der Austausch an die Cornell University waren großartige Erfahrungen, die ich nicht missen möchte und an die ich gern zurückdenke. Vielen Dank darüber hinaus an Christian Diekow und Christian Denk der Firma MED-EL, Professor Dr. Klaus Peter Koch und Peter Gänz der FH Trier und FH-Professor Dr. Johannes Martinek und FH-Prof. Dr. Martin Reichel des Technikums Wien für die gute Zusammenarbeit.

Lena Michler danke ich für die Durchsicht des Manuskripts.

Mein besonderer Dank zuletzt gilt Jule Michler für ihren nie endenden Enthusiasmus, ihre Begeisterung für die Forschung, die zahlreichen Diskussionen und ihre Unterstützung, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.