

1. Tiere, Material und Methoden

1.1. Tiere und Narkose

Bei den Tieren handelt es sich um klinisch gesunde weibliche Schweine der deutschen Landrasse¹, mit einem durchschnittlichen Gewicht von 41 ± 7 kg. Die Eingangsuntersuchung beinhaltet auch eine Allgemeinuntersuchung der Tiere.

Am Operationstag werden die Tiere eine Stunde vor Operationsbeginn mit 5 mg Azaperon²/kg i.m. sediert und mit 0,05 mg/kg i.m. Atropin³ vorbehandelt.

Nach dem Anlegen einer Verweilkanüle in die Ohrvene wird die Einleitung der Intubationsnarkose mit Etomidat⁴ (0,25-0,5 mg/kg i.v.) vorgenommen. Bei noch vorhandenem Schluckreflex wird den Schweinen 5-10 mg/kg i.v. Thiopental⁵ verabreicht.

Pancuroniumbromid⁶ wird als Muskelrelaxans gegeben. Zur Analgesie und zusätzlichen Anästhesie wird Ketamin⁷ (10 mg/kg i.m.) verwendet.

Die Beatmung erfolgt volumengesteuert mit einem Isofluranverdampfer⁸ bei einem Atemzugvolumen von 100 – 150 ml/kg Körpergewicht und einer Atemfrequenz von 10 – 15/min. Der Beatmungsdruck beträgt 20 – 25 cm H₂O, der angestrebte ETCO₂ liegt bei 32 – 36 mm Hg. Zur Fortführung der Inhalationsnarkose wird ein Gemisch aus 40% O₂, 60% N₂O und 1,5 – 1,8%iges Isofluran benutzt.

Per EKG wird die Kreislaufsituation *intra operationem* überwacht. Mit Hilfe einer rektalen Temperatursonde wird die innere Körpertemperatur permanent gemessen.

Der im Vorbereitungsraum zuvor geschorene Abdominalbereich wird entfettet, desinfiziert und die Umgebung mit sterilen Tüchern abgedeckt.

1 Landwirtschaft Sommerfeld, Seddiner See, Ortsteil Kähnsdorf, Deutschland
2 Stresnil®, Fa. Janssen
3 Atropinsulfat, Fa. Braun, Melsungen
4 Etomidat-Lpuro®, Fa. Braun, Melsungen
5 Trapanal®, Fa. Byk Gulden
6 Pancuronium®, Fa. Organon-Technika
7 Ursotamin®, Fa. Serumwerk Bernburg
8 Isofluranverdampfer mit Ohmeda Isotec 5, BOC Healthcare, Siemens

1.2. Organgewinnung und Konservierung

Am intubierten und narkotisierten Schwein wird die Haut entlang der Drosselrinne etwa 5 cm durchtrennt und am lateralen Rand des *M. omohyoideus* und lateral des *M. sternomastoideus* stumpf in die Tiefe präpariert. Die *V. jugularis externa* wird aufgesucht, angeschlossen, eröffnet, mit einem sterilen Venenkatheter¹ in Herzrichtung kanüliert und eingebunden. Dieser dient dem späteren Entbluten des Tieres.

Zum Eröffnen der Bauchhöhle werden die verschiedenen Bauchschichten handbreit oberhalb des Bauchnabels bis zum kranialen Beckenrand in der Medianen durchtrennt.

Nach dem Aufsuchen der Nieren werden Arterie, Vene(n) und Harnleiter stumpf präpariert.

Die linke Niere wird bevorzugt verwendet, da sie aufgrund der längeren Nierenvene besser geeignet ist. Die rechte Niere wird dann verwendet, wenn die linke Niere aus mehr als nur einer Nierenarterie versorgt wird und/oder mehrere Nierenvenen aufweist.

Die Präparation des Nierenhilus folgt der *V. renalis* bis zur *V. cava caudalis*. Daraufhin wird die *A. renalis* bis zu ihrem Ursprung aus der Aorta präpariert.

Die Antikoagulation des Tieres erfolgt mit der intravenösen Gabe von 300 IE/kg KGW Heparin².

Der Ureter wird ebenfalls freigelegt und ebenso wie Arterie und Vene(n), unter Erhaltung eines möglichst langen Stückes, durchtrennt.

Nach der sterilen Kanülierung der Nierenarterie³ wird die Niere entnommen. Vene und Harnleiter bleiben zunächst unkanüliert.

Es folgt eine zügige Wägung der Niere und Zwischenlagerung im Plastikbeutel auf Eis.

Anschließend erfolgt die Durchspülung der Niere mit kalter von-Baeyer-2-Konservierungslösung (B2) für drei Minuten, dies stellt den Beginn der kalten Ischämiezeit dar. Die Niere „schwimmt“ im Plastikbeutel in der Konservierungslösung, da die Flüssigkeit aus der unverschlossenen Vene austritt und den Beutel anfüllt. Das Organ kommt für zwei Stunden bei 4° C in den Kühlschrank.

1 Venenkatheter, Fa. Stöckert

2 Liquemin®, Fa. Hoffmann – La Roche AG, Grenzach-Wyhlen

3 Silikonschlauch der Fa. Loewe Berlin mit Konnektor der Fa. Jostra Medizintechnik

1.3. Organanschluss

Nach dem Ablauf der zweistündigen kalten Ischämiezeit im Kühlschrank wird das Organ erneut gewogen, es folgt die Installation des Venenkatheters¹ und des Harnkatheters².

Bei Vorhandensein mehrerer Venen sind die überschüssigen Gefäße durch Ligaturen abzudichten.

An der immer noch auf Eis gelagerten Niere wird die Vene aufgesucht, der Katheter¹ vorsichtig eingeführt und mit Nahtmaterial³ befestigt.

Gleiches geschieht mit dem Harnleiter, der aufgrund seines kleinen Öffnungsdurchmessers meist etwas eingeschnitten werden muss, um das Einführen des Katheters² zu ermöglichen.

Über den arteriellen Katheter wird die Niere mit ca. 50 ml Elektrolytlösung⁴ durchspült, wobei darauf geachtet wird, dass keine Luftblasen in das Gefäß gelangen.

Bei korrektem Sitz aller Katheter läuft die Flüssigkeit über den venösen Schlauch ab, und im Harnkatheter ist der erste Urin zu beobachten.

Nun wird die Niere an das zuvor mit heparinisierter Elektrolytlösung (10000 IE) gefüllte Perfusionssystem angeschlossen, wobei die Elektrolytlösung vor dem Anschluss noch durch autologes Schweineblut ersetzt wird.

Dem Perfusat wird 6 g Albumin⁵/l (*Gruppe 2*) bzw. 20 g Albumin⁵/l (*Gruppe 3*), 10000 IE Heparin⁶/l, 2 ml Verapamilhydrochlorid⁷/l und 1,2 g Amoxicillin-Natrium⁸/l zugesetzt.

-
- 1 Venenkatheter, Fa. Stöckert
 - 2 Absaugkatheter der Fa. Unomedical
 - 3 Nahtmaterial Vicryl 0, Fa. Ethicon
 - 4 Elektrolytinfusionslösung 153, Fa. Berlin Chemie
 - 5 Human Albumin 20% Immuno, Fa. Baxter AG, Wien
 - 6 Liquemin®, Fa. Hoffmann – La Roche AG, Grenzach.Wyhlen
 - 7 Isoptin®, Abbott GmbH&Co.KG Wiesbaden
 - 8 Augmentan®, Fa. Beecham Belgien

1.4. Versuchsgruppen, Protokolle, Messzeitpunkte und Versuchsablauf

Es kommen zwei verschiedene Perfusionsaufbauten zur Verwendung. Ein Aufbau mit Rollenpumpen (R) und ein Aufbau mit pneumatischen Blutpumpen (P).

Die Nieren der Gruppen 1 und 3 werden anhand pneumatischer Blutpumpen perfundiert, in Gruppe 2 werden Rollenpumpen als Antrieb eingesetzt.

Die Ergebnisse aller Gruppen werden statistisch miteinander verglichen. Alle Ergebnisse werden grundsätzlich als Medianwerte angegeben. Ist dies nicht der Fall, so wird dies zusätzlich vermerkt.

Gruppe 1:	ohne Albuminsubstitution (P);	n = 8
Gruppe 2:	Substitution von 6 g Albumin/l Blut (R);	n = 7
Gruppe 3:	Substitution von 20 g Albumin/l Blut (P);	n = 6

Die Rollenpumpen erzeugen prinzipiell eine nicht-pulsatile Perfusion, die pneumatischen Herzpumpen ermöglichen eine pulsatile Durchblutung.

Bei jedem Versuch werden die Daten des Tieres aufgezeichnet. Dazu gehören das Gewicht, das Geschlecht und Besonderheiten im klinischen Erscheinungsbild.

Festgehalten werden weiterhin der Zeitpunkt des Beginns der Organentnahme, der Heparin-Injektion, des Verschlusses der Aorta, bzw. der Nierenarterien, Zeitpunkt der Nierenexplantation, des Beginns und des Endes der Blutgewinnung, die Menge des erhaltenen Blutes, das Nierengewicht direkt nach der Explantation, nach der Konservierung und nach der Perfusion, Beginn und Ende der Kaltperfusion und die Menge des verwendeten Blutes.

Die Daten, die bei der Perfusion selbst aufgenommen werden, sind zu jedem Messzeitpunkt (alle 20 bzw. 30 min) der arterielle (und venöse) Blutfluss (bei den Versuchen mit nicht-pulsatilem Aufbau), bzw. die Pulsrate (bei den Versuchen mit pulsatilem Aufbau).

Außerdem werden der Dialysatfluss, die Temperatur des Blutes und des Wasserbades der Niere, systolischer und diastolischer arterieller Druck, der arterielle (berechnete) Mitteldruck, der venöse Druck, O₂- und CO₂-Flow, das Urinvolumen und die jeweilige Sammelzeit des Urins erhoben.

Ebenso wird der Zeitpunkt der jeweiligen Messabnahme des arteriellen und venösen Blutes, des Dialysates und des Urins notiert.

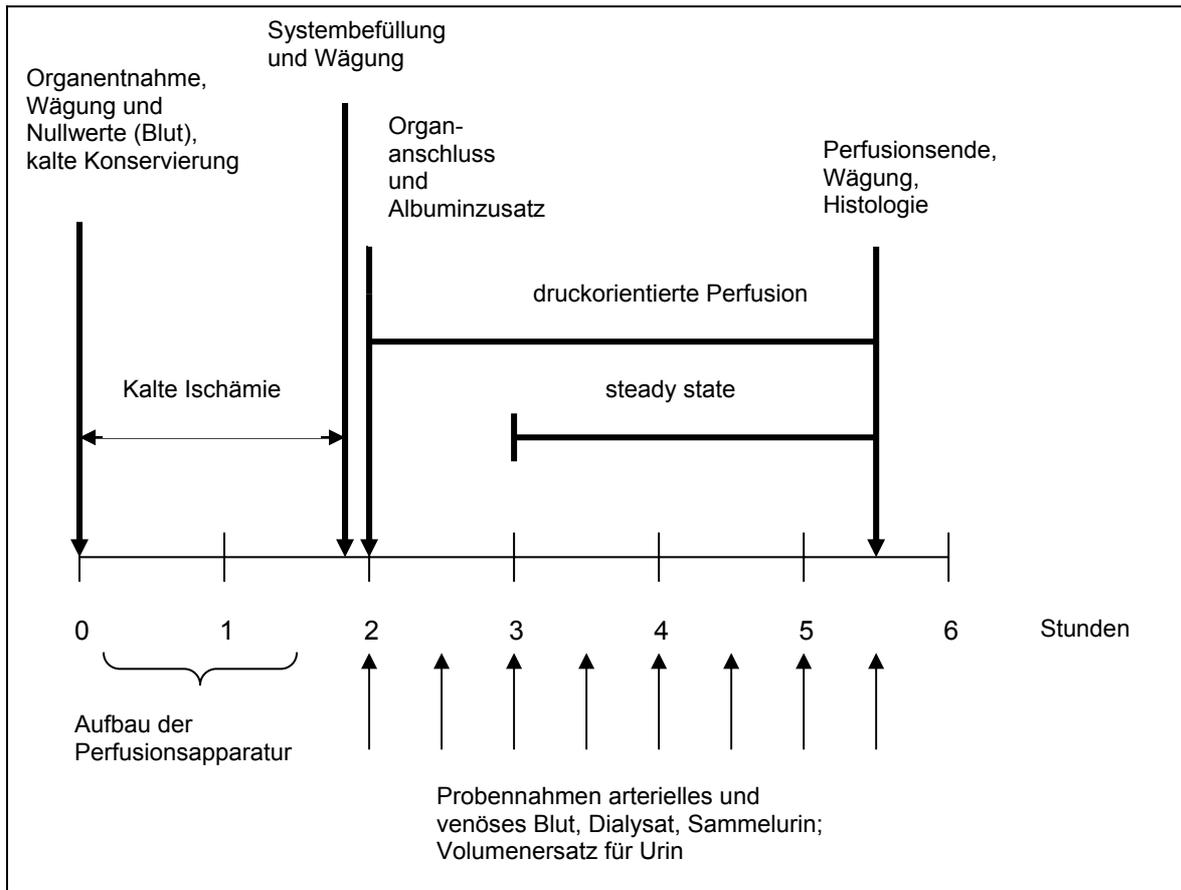


Abbildung 2: Versuchsablauf (systematisch)

1.5. Perfusionsaufbauten

Nach der Organgewinnung, dem „flushing“ (Durchspülen des Organs für drei Minuten mit kalter Konservierungslösung) und der eigentlichen Konservierung (s. 3.1.2.) folgt der Anschluss der Niere an das Perfusionssystem (s. 3.1.3.).

Die Versuchsreihen werden mit zwei unterschiedlichen Perfusionsaufbauten durchgeführt, mit Rollenpumpenantrieb¹ und mit dem Antrieb mittels pneumatischer Pumpen².

Das Nierenperfusionssystem des **Rollenpumpenaufbaus** besteht aus zwei separaten Kreisläufen, die über ein Dialysem modul³ miteinander verbunden sind. Der Blutkreislauf besitzt ein Volumen von 500 – 700 ml heparinisierten (10000 IE/l) und mit Verapamilhydrochlorid⁴ (2 ml/l) versetzten autologen Blutes. Heparin⁵ wurde als Antikoagulans gewählt, da durch die Dialyse gegen ein calciumhaltiges Dialysat eine Zitratantikoagulation mit der Zeit unwirksam würde.

Die Zirkulation des Blutes wird durch eine Doppel-Rollenpumpe¹ vorangetrieben. Das Blut gelangt aus einem Blutbeutel über diese Pumpe in das Dialysem modul³. Über den zweiten Rollenkopf gelangt das arterialisierte und dialysierte Blut aus dem Dialysem modul über eine Luftfalle⁶ in die isolierte Niere im Wasserwärmebad (38 ° C).

Aus der Niere fließt das nun venöse Blut aufgrund einer hydrostatischen Druckdifferenz zurück in das Blutreservoir. Der Blutbeutel⁷ hängt an einer elektronischen Waage⁸.

Der Dialysatkreislauf enthält 5000 ml Dialysatflüssigkeit, die über eine einfache Rollenpumpe¹ aus dem Dialysatreservoir in das Dialysem modul gepumpt wird. Das Dialysat ist eine physiologische Elektrolytlösung, die permanent angereichert ist mit 97,5 % O₂ und 2,5 % CO₂, was zu einer arteriellen Sauerstoffsättigung von 98 ± 2 % führt. Der Zusatz von D-Glukose versorgt das isolierte Organ energetisch.

Die Ultrafiltration im Dialysem modul wird über die Pumpeneinstellung so gesteuert, dass Flüssigkeitsverschiebungen zwischen Dialysat und Perfusat ausgeglichen werden. Die Menge des gebildeten und abgegebenen Urins/Zeiteinheit wird mit der gleichen Menge angewärmter Elektrolytlösung ersetzt.

Ein Wärmeaustauscher⁹ hält die Bluttemperatur bei 38 ° C.

-
- 1 Duo- (Typ 10-20-00) bzw. Einfach-Rollenpumpe (Typ 10-10-00), Fa. Stöckert, München
 - 2 pneumatische Blutpumpen mit Polyurethan-Segelklappen der Fa. Berlin-Heart, Berlin
 - 3 Hemoflow F-7, High Performance Steam von Fresenius Medical Care
 - 4 Isoptin®, Abbott GmbH&Co.KG Wiesbaden
 - 5 Liquemin®, Fa. Hoffmann – La Roche AG, Grenzach.Wyhlen
 - 6 Luftfalle, Fa. Braun, Melsungen
 - 7 Leerbeutel Compoflex der Fa. Fresenius Home Care, Bad Homburg
 - 8 Stativwaage Sartorius 5000 der Fa. Sartorius, Göttingen
 - 9 Wärmeaustauscher CSC 14 der Fa. Sorin Biomedicas

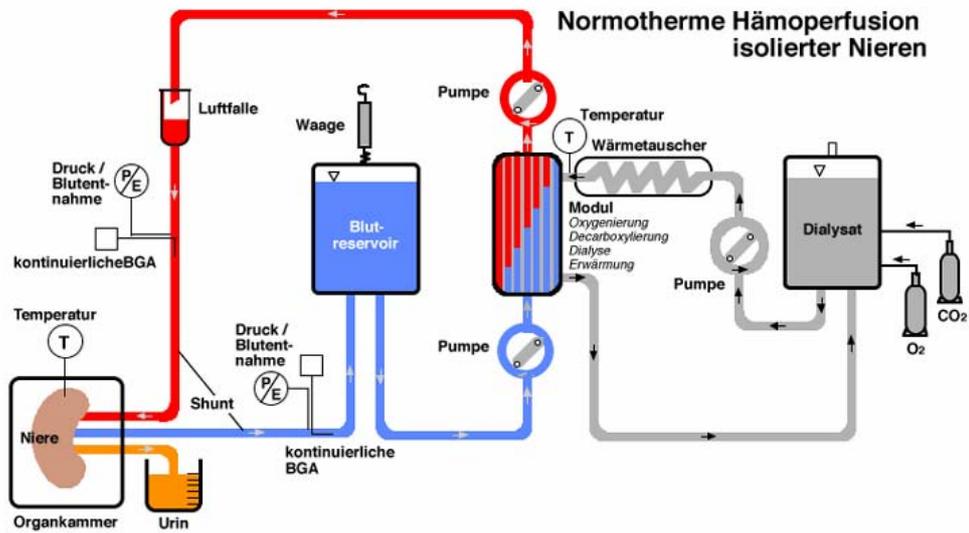


Abb. 3a: Schematischer Aufbau des Perfusionssystems



Abbildung 3b: Perfusionsaufbau mit Rollenpumpen, Organbad und Blutauflbereitungseinheit

Der Aufbau mit den **pneumatischen Blutpumpen** besteht ebenfalls aus einem Blut- und einem Dialysatkreislauf, die miteinander über das Dialysemodul¹ verbunden sind.

Aus dem Blutreservoir gelangt hier das Blut über die erste (venöse) pneumatische Blutpumpe² in das Dialysemodul, dort findet der Gasaustausch statt, das arterialisierte Blut wird über die zweite (arterielle) Blutpumpe in eine Luftfalle³ und weiter in das ebenfalls in einem Wasserwärmebad befindliche isolierte Organ gepumpt.

Im Dialysatkreislauf befindet sich eine Einfach-Rollenpumpe. Über diese wird das Dialysat (6000 ml) angesaugt und dem Oxygenator⁴ zugeführt, von dort aus gelangt das mit Sauerstoff angereicherte Blut in das Polysulfon-Dialysemodul.

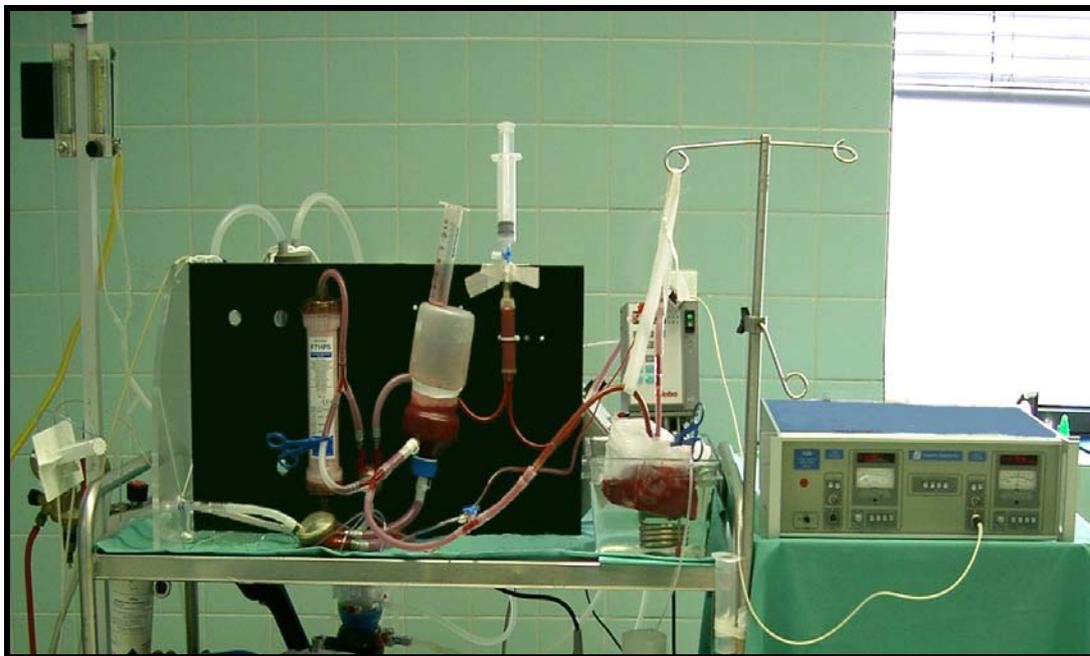


Abbildung 4: Perfusionsaufbau mit pneumatischen Blutpumpen, Organbad und Blutaufbereitungseinheit

-
- 1 Hemoflow F-7, High Performance Steam von Fresenius Medical Care, Bad Homburg, Deutschland
 - 2 pneumatische Blutpumpen mit Polyurethan-Segelklappen der Fa. Berlin-Heart, Berlin
 - 3 Luftfalle, Fa. Braun, Melsungen
 - 4 Oxygenator, D 901 Lilliput 1, Fa. DIDECO

1.6. Messparameter und Messmethoden

1.6.1. Hämodynamische Parameter und Nierengewichte

Der renale Blutfluss wird mit dem Flussmesser¹ bestimmt. Die Nieren werden direkt nach der Entnahme aus dem Tierkörper mit der Feinwaage² gewogen. Dies wird wiederholt nach der kalten Konservierungszeit und nach Abschluss der Perfusion.

1.6.2. Hämatologische Parameter

Die Bestimmung der Blutzellen erfolgt mittels Durchflusszytometrie.

Aus dem arteriellen EDTA-Blut werden Erythrozyten, Hämoglobin und Hämatokrit bestimmt.

Zur photoelektronischen Zählung der Erythrozyten nach deren Fixierung mit Glutaraldehyd wird das Streulichtverfahren verwendet.

Der Hämatokrit wird berechnet.

Zur Bestimmung des Hämoglobingehaltes wird die modifizierte Cyan-Hämoglobin-Methode angewendet.

1 Flussmesser T206, Transonic Systems Inc.

2 Feinwaage Sartorius BP 3100, Fa. Sartorius Göttingen

1.6.3. Klinisch-chemische Parameter

Die Untersuchungen des Blutes, des Dialysates und des Urins werden bis auf die Blutgasanalysen¹, die Elektrolytwerte¹ und die Bestimmung des kolloidosmotischen Druckes² im Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie der Charité³, durchgeführt.

Natrium, Kalium, Kreatinin, Harnstoff, Harnsäure, anorganisches Phosphat, Glucose, Gesamteiweiß, Albumin und Osmolalität werden aus dem arteriellen und venösen Blut und dem Urin bestimmt.

Die Blutgasanalysen werden unverzüglich nach der Probenentnahme vor Ort durchgeführt.

Mit Hilfe des Blutanalysegerätes können die Blutgase, der Säuren-Basen-Status, die Oximetrie-Ergebnisse, sowie die Na⁺-, K⁺- und Ca²⁺-Werte bestimmt werden.

Kreatinin wird mit der Jaffé-Reaktion bestimmt. Es wird in alkalischer Lösung mit Prikrinsäure versetzt. Daraus resultiert eine gelb-orange Färbung, deren Intensität proportional zur Kreatininkonzentration ist und photometrisch gemessen wird.

Photometrisch erfolgt ebenso die Bestimmung des Harnstoffes. Durch das Enzym Urease wird Harnstoff zu NH₃ und CO₂ hydrolysiert. Durch Glutamat-Dehydrogenase (GLDH) entsteht Glutamat und NAD⁺, dabei wird NADH verbraucht. Dieser Verbrauch von NADH dient als Messgröße, sie verhält sich proportional zur Ammoniakmenge.

Die Natrium- und Kaliumkonzentrationen werden potentiometrisch durch ionenselektive Elektroden gemessen.

Das Gesamteiweiß wird photometrisch mit Kupfer-Ionen in alkalischer Lösung bestimmt. Die Farbintensität der blau-violett gefärbten Lösung verhält sich proportional zur Eiweißkonzentration.

1 Blutanalysegerät ABLTM505+OSM3 der Fa. Radiometer Copenhagen, Brønshøj (Dänemark)

2 Onkometer BMT 921, Fa. BMT

3 Campus Virchow Klinikum Berlin (Leiter Prof. Dr. med. E. Köttgen)

1.6.4. Nierenfunktionsparameter

Die Kreatinin-Clearance (Cl_{Krea}), der Organwiderstand (R), die fraktionelle Natrium-Reabsorption (RF_{Na}), der Natriumtransport (T_{Na}) und der Hämatokrit (Hkt) werden mit Standardformeln (s. Anhang) berechnet. Ebenso wie der Sauerstoffverbrauch und der Volumenstrom Urin (V_U) sind diese Werte (mit Ausnahme des Hkt) auf je 100 g Niere bezogen.

1.6.5. Histologische Parameter

Die histologischen Schnitte wurden im pathologischen Institut¹ des Fachbereichs der Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin (Leitung Prof. Rudolph) hergestellt. Gefärbt wird mit der Hämatoxylin-Eosin- (HE-) Färbung. Zellkerne stellen sich blau und Zytoplasma blassrot dar. Hämatoxylin ist ein (bei niedrigem pH) positiv geladener Farbstoff, daher färbt er negativ geladene Strukturen blau. Eosin ist ein negativ geladener Farbstoff, der zur Gegenfärbung dient. Er färbt alle übrigen Strukturen in verschiedenen Rot-Tönen („Azidophilie“).

Zur Untersuchung kommen exemplarisch zwei Nieren aus *Gruppe 1* und zwei Nieren aus *Gruppe 2*. Histologische Schnitte werden jeweils aus der perfundierten Versuchsniere angefertigt.

1 Institut für Tierpathologie beim Fachbereich Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin (Leitung Prof. Rudolph)

1.7. Computer und Programme

Für die Auswertung und Bearbeitung der Daten werden ein Notebook¹ und die Programme Microsoft Word Office 2000 zur Textverarbeitung und das Tabellenkalkulationssystem Microsoft Excel Office 2000 zur Datenerfassung und Verarbeitung verwendet, für Graphiken Powerpoint Office 2000.

Das World Wide Web (hier besonders PubMed) wird zur Literatursuche ausgewählt.

SPSS² wird zur statistischen Auswertung, Erstellung der Boxplots und der Regression verwendet.

1.8. Statistik und statistische Auswertung

Zur Darstellung der Daten wird die Berechnung des Median gewählt. Der Median bezeichnet den mittleren Wert einer nach Größe geordneten Reihe, 50 % der Daten sind größer, 50 % der Daten sind kleiner als der Median. Prinzipiell sind die aufgeführten Ergebniszahlen immer als Mediane zu verstehen, auch ohne explizite Benennung.

Der Interquartilabstand ($IQR = Q_3 - Q_1$) wird als Maß für die Streuung verwendet.

Zur Veranschaulichung dient die „Box-and-Whisker-Plot“-Grafik, aus der die Lage der Mediane und die Streuungsverhältnisse (IQR) auf einen Blick ersichtlich sind.

Zur Erstellung der Signifikanzen wird der Mann-Whitney-U-Test für zwei unabhängige Stichproben eingesetzt. Eine Signifikanz wird angenommen bei $p < 0,05$.

Zusätzliche grafische Auswertungen erfolgen durch Linien-Diagramme.

Zur Überprüfung der Korrelation von Sauerstoffverbrauch und Natrium-Reabsorption wird die Regressionsanalyse gewählt und im Streudiagramm mit der Regressionsgeraden, Achsenabschnitt, Inkrement und Bestimmtheitsmaß (r^2) dargestellt.

Dabei wird die Methode der kleinsten Quadrate nach Gauss verwendet.

Außerdem werden die jeweiligen 95%-Konfidenzintervalle für beide Parameter angeführt.

1 Notebook, Fa. IPC

2 SPSS 11.5 für Windows, Fa. Microsoft