

Aus der Tierexperimentellen Einrichtung der Charité - Universitätsmedizin Berlin

Arbeitsgruppe „Normotherme Hämoperfusion isolierter
Schweinenieren“

DISSERTATION

Unilaterale Reimplantation von Schweinenieren nach normothermer
isolierter Hämoperfusion mit und ohne vorangehender
Kältekonservierung: Ablauf der postoperativen Nierenfunktion

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der
Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin
von
Stefan Wiegert
aus der Stadt Essen

Gutachter/in: 1. Priv. – Doz. Dr. Chr. Große-Siestrup
 2. Prof. Dr. Dr. h.c. mult. D Groneberg
 3. Prof. Dr. med. S. Dittrich

Datum der Promotion: 19.11.2010

1	EINLEITUNG	1
2	AUFGABENSTELLUNG	3
3	LITERATURÜBERSICHT	4
3.1	Organprotektion	4
3.1.1	Hypotherme Lagerung	4
3.1.2	Isolierte normotherme Hämoperfusion	6
3.2	Akutes Nierenversagen (ANV)	8
3.2.1	Definition, Terminologie und Stadien des ANV nach Ischämie	8
3.2.2	Renale Vasokonstriktion im ANV	9
3.2.3	Auswirkung einer Ischämie auf den Sauerstoffbedarf und Blutfluss in der Niere	10
3.2.4	Auswirkungen Tubulärer Faktoren auf das ANV	11
3.2.4.1	Apoptose	11
3.2.4.2	Tubular leakage	14
3.2.4.3	Dislokalisierung der Na ⁺ K ⁺ -ATPase	14
3.2.5	Biochemische Mechanismen der Zellschädigung	15
3.2.6	Reperfusion nach Ischämie und kalter Organlagerung	15
4	VERSUCHSTIERE, MATERIAL UND METHODE	17
4.1	Vorperiode	18
4.1.1	Vorbereitende Eingriffe: Implantation des subkutanen Portsystems, Anlegen der Eigenblutkonserven	18
4.2	Organentnahme, normotherme isolierte Hämoperfusion	20
4.2.1	Operatives Vorgehen zur Organentnahme	20
4.2.1.1	Narkose	20
4.2.1.2	OP-Überwachung	21
4.2.1.3	Kanülierung der V. jugularis externa und der A. carotis communis	21
4.2.1.4	Organentnahme	22
4.2.1.5	24 h Kältekonservierung	22
4.2.2	Normotherme isolierte Organperfusion	23
4.2.2.1	Perfusionstechnik	23
4.2.2.2	Normotherme Hämoperfusion	24
4.2.2.3	„Vorsichtige Spülung“ zur Konservierung der Niere	24

4.3	Autologe Reimplantation nach Kältelagerung und isolierter Hämoperfusion	26
4.3.1	Reimplantation nach normothermer Hämoperfusion	26
4.3.2	Überwachung der Tiere	26
4.3.2.1	Intensivnachsorge	26
4.3.2.2	Langzeitnachsorge	27
4.3.2.3	Euthanasie	27
4.4	Labormethoden	28
4.4.1	Hämatologie	28
4.4.1.1	Erythrozyten	28
4.4.1.2	Hämatokrit.....	28
4.4.1.3	Hämoglobinkonzentration	28
4.4.1.4	Leukozyten	29
4.4.2	Klinische Chemie	29
4.4.2.1	Kreatinin	29
4.4.2.2	Harnstoff.....	29
4.4.2.3	Natrium und Kalium.....	29
4.4.2.4	Anorganisches Phosphat.....	29
4.4.2.5	Kalzium	30
4.4.2.6	Gesamt Eiweiß	30
5	ERGEBNISSE	31
5.1	Vorperiode	32
5.2	Normotherme Isolierte Hämoperfusion nach 24h-Kältekonservierung	34
5.2.1	Renale Hämodynamik	35
5.2.1.1	Afferenter Blutdruckverlauf	35
5.2.1.2	Afferenter Blutfluss	35
5.2.1.3	Hämodynamischer Widerstand.....	37
5.2.1.4	Vergleich der Nierenfunktion: Vorperiode und normotherme Hämoperfusion	38

5.3	Autologe Reimplantation mit Verlaufsdarstellung der Ergebnisse aus Vorperiode und Hämoperfusion	38
5.3.1	Glomeruläre Funktion	39
5.3.1.1	Kreatinin-Konzentration im Serum	39
5.3.1.2	Kreatinin-Clearance/10 kg	40
5.3.1.3	Harnstoff-Konzentration im Serum	41
5.3.1.4	Harnstoff-Clearance/10 kg	42
5.3.1.5	Protein-Konzentration im Urin	43
5.3.1.6	Proteinkonzentration im Serum	44
5.3.1.7	Harnstoff-Ausscheidung/10 kg	45
5.3.2	Tubuläre Funktion: Elektrolyte	46
5.3.2.1	Resorptionsfraktion-Natrium (RF_{Na^+})	46
5.3.2.2	Natriumkonzentration im Urin	47
5.3.2.3	Natriumausscheidung im Urin	48
5.3.2.4	Kaliumkonzentration im Urin	49
5.3.3	Renale Osmoregulation	50
5.3.3.1	Diurese	50
5.3.3.2	Plasma-Osmolalität	51
5.3.3.3	Urin-Osmolalität	52
5.4	Reimplantation isolierter perfundierter Schweinenieren ohne vorangehende Kältekonservierung (Dissertation U. Hennen)	53
5.4.1	Renale Hämodynamik während Hämoperfusion	53
5.4.2	Nierenfunktion während Hämoperfusion	54
5.4.3	Autologe Reimplantation	55
6	DISKUSSION	57
6.1	Diskussion der Methodik	58
6.1.1	Versuchsbedingungen und Datenauswertung	58
6.1.2	Vorperiode (Messwerte vor Versuchsbeginn als Kontrolldaten)	58
6.1.3	Normotherme isolierte Hämoperfusion	59
6.1.4	Autologe Reimplantation	59
6.2	Diskussion der Ergebnisse	60
6.2.1	Hämoperfusion	60
6.2.1.1	Renale Hämodynamik	60
6.2.1.2	Glomeruläre Funktion	60
6.2.1.3	Tubuläre Funktion	60
6.2.1.4	Renale Osmoregulation	61

6.2.2 Vergleich der Hämo-perfusion mit und ohne Kältelagerung	62
6.2.2.1 Renale Hämodynamik	62
6.2.2.2 Glomeruläre Funktion	62
6.2.2.3 Tubuläre Funktion	62
6.2.2.4 Renale Osmoregulation	63
6.2.3 Autologe Reimplantation nach Kältelagerung und isolierter Hämo-perfusion	64
6.2.3.1 Renale Hämodynamik	64
6.2.3.2 Glomeruläre Funktion	65
6.2.3.3 Tubuläre Funktion	66
6.2.3.4 Renale Osmoregulation	67
6.2.3.5 Phasen des akuten Nierenversagens	68
6.2.4 Vergleich der Autologen Reimplantation mit und ohne Kältelagerung	72
6.2.4.1 Glomeruläre Funktion	72
6.2.4.2 Tubuläre Funktion	73
6.2.4.3 Renale Osmoregulation	74
6.2.4.4 Phasen des akuten Nierenversagens	74
6.3 Pathophysiologie -Ischämie/Reperfusion- der reimplantierten Niere nach Kältelagerung: Möglichkeiten der Beeinflussung	77
6.4 Schlussfolgerung	78
7 ZUSAMMENFASSUNG	81
8 LITERATURVERZEICHNIS	83
Abkürzungsverzeichnis	87

1 EINLEITUNG

Die Nierentransplantation stellt heute ein etabliertes Therapieverfahren bei terminaler Niereninsuffizienz dar. 1947 scheiterte David M. Hume [1] in Boston mit der ersten Nierentransplantation an einer jungen Frau aufgrund der folgenden Abstoßungsreaktion. Die erste erfolgreiche Transplantation von einem Lebendspender führte der Chirurg Jean Hamburger 1953 in Paris [2] durch. Es dauerte jedoch einige Jahre, bis die Probleme, speziell die Abstoßungsreaktionen, dieser Technik soweit gelöst worden waren, dass eine breitere klinische Anwendung erfolgen konnte. In den USA werden jährlich 25.000 Nieren – in Deutschland über 2.000 transplantiert.

Ein weiteres großes Problem stellt die adäquate Konservierung der zu transplantierenden Niere dar. In der Zeit von der Explantation bis zur Wiederherstellung der Blutversorgung im Empfänger ist die Niere von der Zufuhr jeglicher Nährstoffe sowie vom Abtransport der anfallenden toxischen Stoffwechselprodukte abgeschnitten.

Um dieses Problem zu lösen, wurden im Laufe der Jahre verschiedene Verfahren und Konservierungslösungen entwickelt.

Die heutzutage am weitesten verbreitete Methode ist die sogenannte Single Flush-Perfusion. Dabei wird die Niere über die Arteria renalis mit einer Konservierungslösung gespült.

Durch die Konservierungslösungen soll in der ischämischen Phase die intra- und extrazelluläre Azidose vermindert werden, die Volumenverhältnisse aufrechterhalten werden, die Energiereserven unter anaeroben Bedingungen ausgenutzt werden, Prozesse, die nicht der Aufrechterhaltung der Zellfunktion dienen reversibel gehemmt werden und die Integrität der Zellstrukturen, die für die Funktionsaufnahme des Implantats nach Reperfusion verantwortlich sind, gewährleistet werden.

Bei der Zusammensetzung dieser Lösung fand in den letzten Jahren eine deutliche Entwicklung statt. Die am häufigsten benutzte Lösung ist die Euro-Collins-Lösung, welche eigens für die Konservierung der Niere entwickelt wurde. Hierbei konnten Transplantate nach kalter Ischämiezeit von bis zu 30 Stunden mit großem Erfolg eingesetzt werden.

Eine weitere Lösung ist die University of Wisconsin-Lösung (UW), die 1988 vorgestellt wurde. Dabei wurde Hydroxyethylstärke als Kolloid zur Verhinderung von

Einleitung

Zellödemem sowie Glutathion als Radikalfänger zur Neutralisation entstehender freier Radikale hinzugefügt. Im Vergleich zu Euro-Collins konnten damit bessere Ergebnisse erzielt werden.

Eine technisch komplexe Konservierungsmethode wurde Ende der 90er Jahre von der Charité-Arbeitsgruppe „Normotherme Hämoperfusion isolierter Schweinenieren“ (H. v. Baeyer, K. Affeld, C. Grosse-Siestrup) vorgestellt: Hierbei wurden Schlachthofnieren normotherm mit autologem Blut perfundiert.

Heutzutage wird die Technik der isolierten Organperfusion zur Organprotektion von der Industrie angeboten. Das Transplantat wird, um die wichtigsten Organfunktionen aufrechtzuerhalten, in dem sog. „Organ Care System“ mit oxigeniertem, nährstoffreichem Blut versorgt. Demzufolge sind längere Transportwege möglich und es werden bessere Outcome-Daten nach Transplantation erzielt.

Diese Technik wurde neben der Möglichkeit zur Organkonservierung als Ersatzmethode zum Tierversuch und zur Testung von Pharmaka entwickelt.

Alle Konservierungsmethoden lösen durch ischämische und hypotherme Zellschädigung ein akutes Nierenversagen des Transplantates aus. Diesbezüglich gilt es die genannten von alloimmunogenen Einflüssen abzugrenzen, gerade in Hinblick auf die Zukunft der Transplantationsmedizin, die sicherlich in der Xenotransplantation liegt. Unter diesem Begriff versteht man die Transplantation von Organen einer Spezies auf eine andere. Neben dem Verständnis auf molekularbiologischer Ebene müssen die Kenntnisse der Pathomechanismen, die den Ablauf des postoperativen Nierenversagens ohne alloimmunogene Einflüsse hervorrufen, vertieft werden. Unser Forschungsprojekt ist in diesem Sinne eine Arbeit zur Entwicklung der Xenotransplantation.

2 AUFGABENSTELLUNG

Innerhalb des Forschungsprojektes „Normotherme Hämoperfusion isolierter Schweinenieren“ soll geprüft werden, ob eine ausreichende Organfunktion nach einer unilateralen Reimplantation der warm hämoperfunden und zuvor 24 h kältekonservierten Nieren besteht. Dazu soll in der ersten Operation (Spenderorganentnahme) eine Niere entnommen werden und in einer zweiten Operation diese Niere nach Kältekonservierung und warmer Hämoperfusion reimplantiert und die zweite Niere entfernt werden.

Durch den Vergleich mit früheren Ergebnissen der Arbeitsgruppen -normotherme isolierte Organperfusion- und -Autologe Reimplantation nach isolierter Perfusion ohne Kältelagerung- soll herausgearbeitet werden, welchen Einfluss die hypotherme Lagerung auf das Nierenversagen hat.

Die besondere Aufmerksamkeit gilt dem Ablauf des postoperativen Nierenversagens ohne alloimmunogene Einflüsse. Im Einzelnen sollen:

- Fünf Versuche mit 24 stündiger Kältekonservierung, und 1,5 stündiger Hämoperfusion und der anschließenden Reimplantation durchgeführt und ausgewertet werden
- die relevanten Nierenfunktionsparameter protokolliert werden
- die Nachsorge bei fünf Einzelversuchen, inklusive der Pflege der vollständig implantierten Kathetersysteme über einem Zeitraum von fünf Wochen übernommen werden
- vorhergehende Versuche mit sechs Nieren ohne Kältekonservierung direkt hämoperfunden und reimplantiert zu Vergleichsuntersuchungen herangezogen werden

3 LITERATURÜBERSICHT

3.1 Organprotektion

3.1.1 Hypotherme Lagerung

Ziel einer Konservierung ist es Organfunktionen, Energiereserven und morphologische Strukturen des Organs möglichst zu erhalten. Vorteile der kalten Konservierung sind die einfache Durchführbarkeit, die geringen Kosten und der wiederholbare Einsatz.

Während der hypothermen Phase haben unterschiedliche Konservierungslösungen unterschiedliche protektive Qualitäten. Die Stoffwechselfunktionen sind auf ein Minimum beschränkt. In der anaeroben Phase sind die Energiereserven limitiert. Von herausragender Bedeutung ist dabei die Erhaltung eines physiologischen pH-Wertes. Die Konservierung eines Organs beginnt mit der Perfusion des Organs im Spender durch die Konservierungslösung und Kühlung bis auf 4°C des Organs.

Bei der Euro-Collins-Lösung handelt es sich um eine Konservierungslösung, die in ihrer Zusammensetzung der intrazellulären Elektrolytverteilung ähnelt. Durch den Zusatz von Glukose findet allerdings bei hypothermen Bedingungen eine gesteigerte Laktatproduktion statt, wodurch der pH-Wert sinkt und der Entstehung von Zellödemen Vorschub geleistet wird[3].

Die Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung ist eine „extrazelluläre“ Konservierungslösung. Histidin und Histidinhydrochlorid haben die Funktion eines Puffers. Die Zellmembranen behalten ihr normales Ruhepotential. Ein Na⁺ und Ca²⁺-Einstrom wird verhindert. Die Zellen werden nicht aktiviert. Mannitol fungiert hierbei als Antioxidans und verhindert durch seine onkotischen Eigenschaften Zellödeme[3].

Die University of Wisconsin-Lösung (UW) ist die heute am häufigsten gebrauchte Konservierungslösung für die kalte Lagerung von Organtransplantaten [4].

Die osmotische Konzentration der UW-Lösung wird durch metabolisch inerte Substanzen wie Laktobionat und Raphinose erhalten. Hydroxy-Ethyl-Stärke (HES) minimiert durch onkotische Eigenschaften Zellödeme. Glutathion, Allopurinol und Adenosin werden als Radikalfänger zugegeben[3].

In der Baeyer II-Konservierungslösung, eine intrazelluläre Lösung, verhindert eine hohe K⁺-Konzentration den K⁺-Ausstrom aus der Zelle. Die Zugabe von Mg²⁺-Ionen verhindert den Ca²⁺-Strom Zell einwärts und SO₄ blockiert den Cl⁻ - und Bikarbonat-Transport. Polyethylenglykol (PEG) mit einem molekularen Gewicht von 4000 Dalton ermöglicht Flüssigkeitsbewegungen innerhalb der kapillären Gefäße und dichtet

verletzte Gefäße ab. Zusätzlich geht PEG eine Verbindung mit der Superoxid-Dismutase ein, wodurch sowohl der initial hohe ATP-Verbrauch als auch die Lipidoxid-Produktion reduziert werden [5]. PEG verhindert eine osmotische Schwellung in kalt konservierten Nieren und schützt die renalen Tubuli vor Kälteschäden [6, 7].

Bei 4 °C ist der Stoffwechsel in einem Organ auf unter 5 % der Normalaktivität reduziert. Dafür ist die kalte Konservierung hinsichtlich des Sauerstoffangebotes ausreichend. Allerdings ist die Erhaltung des Zellvolumens und der Ionen-Zusammensetzung ein energieraubender Prozess, der physiologischer Weise über die Atmungskette bewirkt wird. Außerdem sind die Lipide in den Zellmembranen derart durch die Kälte beeinträchtigt, dass sie einen erfolgreichen Sauerstoff- und Energietransport in die Zelle zu Nichte machen. Auch das prinzipielle Ansteigen des Verhältnisses von Laktat zu Pyruvat während der kalten Konservierung weist auf einen ungenügenden oxidativen Metabolismus bei dieser Konservierungsform hin[8]. In der Klinik werden aktuell die unten angegebenen Lösungen mit folgernden Zusammensetzungen routinemäßig eingesetzt:

Tabelle 1

Inhaltsstoffe	Einheit	Eigenschaft	B II	UW	EC	HTK
Na ⁺	[mmol/l]	Kation	22	30	10	150
K ⁺	[mmol/l]	Kation	150	125	115	
Sulfat	[mmol/l]	Puffer	85	5		
Bicarbonat	[mmol/l]	Puffer			10	
Phosphat	[mmol/l]	Puffer	6	25	58	
Lactobionat	[mmol/l]	Puffer		100		
Glucosio	[mmol/l]	Zucker			194	
Raffinose	[mmol/l]	Zucker		30		
HES	[g/dl]	Kolloid		50		
PEG	[mmol/l]	Kolloid	25			
Mannitol	[mmol/l]	Kolloid			30	
Histidin	[mmol/l]	Radikalfänger				198
Adenosin	[mmol/l]	Energie quelle		5		
Allopurinol	[mmol/l]	Radikalfänger		1		
Gluthation	[mmol/l]	Radikalfänger		3		

Tabelle 1. Zusammensetzung verschiedener Konservierungslösungen (**B II**: Baeyer-II-Konservierungslösung; **UW**: University of Wisconsin-Lösung; **EC**: Euro-Collins-Lösung, **HTK**: Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung) aus Fehrenberg 2004[5]

3.1.2 Isolierte normotherme Hämoperfusion

Isolierte Organperfusionen werden u. a. an Rattennieren durchgeführt und dienen z. B. der Grundlagenforschung bezüglich der Druckverhältnisse in der Niere [9]. 1989 wurden Untersuchungen an der Rattenniere zu Mannitol durchgeführt, um herauszufinden, welche Ursachen dem vasodilatativen Effekt des Mannitols zugrunde liegen [10].

Es besteht auch die Möglichkeit, einzelne Nephrone isoliert zu perfundieren [9, 11]. In den 60er Jahren finden die ersten isolierten Perfusionen an Hundenieren statt. Auch hier wurden Fragestellungen im Zusammenhang mit dem Zusatz von Mannitol bearbeitet, aber auch transplantationsrelevante Untersuchungen durchgeführt [12]. Neben der Grundlagenforschung und der Beantwortung klinischer Fragestellungen sind isolierte Organperfusionen von Nutzen für die Verbesserung von Therapieformen in der Transplantationsmedizin und zur Optimierung von Konservierungslösungen [4].

Das Modell der isolierten Organperfusion stellt außerdem eine Ersatzmethode zum Tierversuch dar (BMELV 2005) [13]. Pharmakologische und toxikologische Substanzen können anhand ihrer Wirkung auf einzelne Organsysteme getestet werden [13].

Um die Vorgänge im isolierten Organ möglichst nahe an die physiologischen Verhältnisse anzupassen, ist es nötig, körperwarm zu perfundieren. Enzyme und Membranlipide haben hier ihr Funktionsmaximum [8].

Im Vergleich zu Perfusionen mit zellfreien Medien ermöglicht die Blutperfusion die Untersuchung von Nierenparametern unter nahezu physiologischen Bedingungen [13, 14].

1998 wird das normotherme Perfusionsmodell erstmals mit Schweinenieren aus dem Schlachtprozess und mit Hilfe eines Dialyse-Hohlfasermoduls zur Perfusataufbereitung beschrieben [15]. Voraussetzung hierfür ist das Vorhandensein der logistischen Bedingungen für diese Variante, ein Schlachthof muss sich innerhalb eines gewissen räumlichen Radius befinden, da für bestimmte Versuche die warme und kalte Ischämiezeit zeitlich begrenzt werden müssen.

Bisherige Methoden der isolierten Organperfusion konnten sich wegen funktionaler Defizite nicht als Tierversuchersatzmethoden durchsetzen. Die ansteigende bakterielle Besiedlung von Organ und Apparatur, sowie das Fehlen von

Korrekturmöglichkeiten der Zusammensetzung des Blutes in Bezug auf niedermolekulare Solute, schließt Langzeitexperimente aus.

In der isolierten normothermen Hämoperfusion mit einem Dialyse-Hohlfasermodule wird das Blut sowohl durch Gasaustausch arterialisiert als auch durch Dialyse entgiftet.

Bei der isolierten Perfusion wird nach einem anfänglichen Abfall des Organwiderstandes nach etwa 45 min ein steady state erreicht. Die Nieren werden für 139 ± 45 min perfundiert. Die Filtrationsfraktion ist nahezu normal, die GFR gering reduziert, im Urin ist die Na^+ -Konzentration erhöht und die K^+ - Konzentration erniedrigt. Vermindert ist außerdem die fraktionelle Na^+ - Absorption. Bei einem Anstieg des Hämatokrits auf 39 (l/l) besteht eine stark veränderte Filtrationsdynamik. Die Filtrationsfraktion, die glomeruläre Filtrationsrate, der Na^+ - Transport und der Sauerstoffverbrauch sind stark reduziert [15].

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt wird die Technik der isolierten Organfunktion von der Firma „TransMedics“ angewandt. Hierbei wird das Transplantat in dem „Organ Care System“ während des Transportes an einen künstlichen Blutkreislauf mit nährstoff- und sauerstoffreichem Blut angeschlossen. Dadurch, daß das Spenderorgan von der Entnahme bis zur Transplantation mit warmen, oxigeniertem, nährstoffreichem Blut perfundiert wird können längere Zeitintervalle außerhalb des Körpers überbrückt werden. Durch die Methode werden postoperative Komplikationen, wie Transplantatfehlfunktionen oder die verspätete Funktionsaufnahme des Transplantates vermindert. An dem perfundiertem Organ können ausgiebige Funktionstests sowie Tests zur Gewebekompatibilität durchgeführt werden. [16]

Zusätzlich werden Kosten im Gesundheitswesen, welche für aufwendige Brückentherapien benötigt werden, durch ein verkürztes Zeitintervall bis zur Transplantation des Spenderorgans gesenkt. Der Aufenthalt im Krankenhaus wird durch das sofort funktionierende Organ verkürzt. Weniger Medikamente zur Behandlung der Komplikationen müssen eingesetzt werden. Zuletzt nimmt die Zahl der Retransplantationen ab.

3.2 Akutes Nierenversagen (ANV)

3.2.1 Definition, Terminologie und Stadien des ANV nach Ischämie

Ausgelöst wird das Akute Nierenversagen durch ischämische und nephrotoxische Insulte [17]. Für unsere Versuchsreihe ist die Entstehung durch kühle Organlagerung im Sinne einer kalten Ischämie von Bedeutung. Je länger das Transplantat kühl gelagert wird, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit einer Fehlfunktion [18].

Das prärenale Nierenversagen, welches mit 60 % die häufigste Form darstellt, wird durch Flüssigkeitsverluste nach anhaltenden Diarrhoen, Erbrechen, Flüssigkeitsmangel oder einem hypovolämischen Schock hervorgerufen.

Fällt die renale Durchblutung ab, ohne dass ein Zellschaden daraus resultiert, wird das Zwischenstadium, die prärenale Azotämie, erreicht. Charakteristischerweise liegt die Osmolarität im Urin zwischen 300 und 500 mosm/l [19].

Die Urinmengen und Elektrolytkonzentrationen unterliegen dabei Schwankungen. Häufig wird die volle Funktionalität in 1-3 Tagen wieder erreicht. Grundsätzlich ist die Natriumresorption später als die Fähigkeit zur Urinkonzentrierung betroffen.

Das ANV tritt in oligurischer (<400 ml/ d) und nicht oligurische (>400ml/ d) Form auf [19]. Entscheidend sind im Wesentlichen die Dauer und das Ausmaß der Mangeldurchblutung.

Kommt es zu einem tubulärem Schaden im Sinne einer Nekrose (Akute Tubuläre Nekrose, ATN) ist die Konzentrationsfähigkeit der Niere aufgehoben [17]. Die Urinosmolarität beträgt hier beim Erwachsenen unter 300 mosm/l.

Unabhängig von Ätiologie und Ausmaß wird das ANV in Stadien eingeteilt. Dies ist in Hinblick auf die Bewertung unserer Ergebnisse von Bedeutung. Klassischerweise werden 3 Stadien unterschieden [20]: Eine Induktions-, eine Erhaltungs- und eine Regenerationsphase [21].

In der Induktionsphase ist die Nierendurchblutung vermindert. Es resultiert ein intrazellulärer ATP-Mangel mit folgender Zellschädigung vor allem in den S₃ – Segmenten der proximalen Tubuli [21]. Konsekutiv nimmt die GFR ab. Morphologisch zeigt sich ein Blutstau im Bereich der Medulla [17]. In diesem Stadium schlägt sich der Zellschaden in einer Schwellung, einem Abbau von Membranphospholipiden, sowie einem Verlust der Zellpolarität und der Bildung von Detritus durch Abschilferung von Bürstensaummembranen der proximalen Tubuli mit konsekutiver Obstruktion nieder [17, 21].

In der Erhaltungsphase [21] tritt die anhaltende Ischämie und die Aktivierung des

Entzündungssystems in den Vordergrund. Beide Prozesse laufen vorwiegend im äußeren Mark ab. Hier unterliegen die Zellen der Nekrose [21, 22]. In der Nierenrinde findet zu diesem Zeitpunkt schon wieder ein normaler Blutfluss statt.

Die Erhaltungsphase kennzeichnet eine persistierende Vasokonstriktion und damit verminderte GFR, eine Rückdiffusion von Filtrat aus den geschädigten Nephronen in den Blutstrom (back leak), die Obstruktion einer Vielzahl der Tubuli durch nekrotisches Zellmaterial, das sog. „no-reflow“-Phänomen; Eine Minderung der Oberfläche bzw. Permeabilität der Glomerula und eine Erhöhung des onkotischen Druck innerhalb der Kapillaren, sowie die Aktivierung des tubuloglomerulären Feedback (Thurau-Mechanismus). Die Erhaltungsphase ist durch eine stabile GFR gekennzeichnet. Der Blutfluss normalisiert sich in dieser Phase [21].

In der Reparaturphase kommt es zur Regeneration der Zellschäden. Die Zellpolarität wird wieder hergestellt. Zell und Organfunktion normalisieren sich. Hier spielen lokale Wachstumsfaktoren eine entscheidende Rolle [18, 23]

3.2.2 Renale Vasokonstriktion im ANV

Auf der vaskulären Ebene wird die renale Hämodynamik durch das Konzept des „no Reflow“, unter dem verschiedene endothelschädigende Mechanismen und eine davon ausgelöste Vasokonstriktion subsummiert werden, beeinträchtigt [21]. Das Endothel hat neben einer natürlichen Barriere zwischen Blut und Gewebe eine Vermittlerfunktion in der Pathogenese von renalen Erkrankungen [24]. Die Konstriktion resultiert aus einem Ungleichgewicht zwischen konstriktiven und dilatativen Faktoren zu Gunsten der Vasokonstriktoren.

Das Renin Angiotensin System hat in der Initial- und Erhaltungsphase einen entscheidenden Einfluss auf die Vasokonstriktion. Renin wird im juxtaglomerulären Apparat infolge des geminderten RBF vermehrt ausgeschüttet, was eine erhebliche Angiotensin 2 Konzentration und damit intrarenale Vasokonstriktion zur Folge hat [25].

Es liegt ein Ungleichgewicht zwischen Endothelin und NO nach Ischämie vor. Eine Aktivierung der Endothelin Rezeptoren führt zu einer prolongierten Konstriktion der glatten Muskelzellen durch Anstieg von intrazellulärem Calcium. In niedriger Konzentration wird durch diesen Mechanismus bei Blutdruckabfall die glomeruläre

Mikrozirkulation aufrecht erhalten. Bei hoher Konzentration im Falle einer Ischämie nehmen der renale Blutfluss, die GFR, die Diurese und Natriurese ab [24]. Endothelin begünstigt zusätzlich die Leukozytenadhäsion im äußeren Mark [22].

Weiterhin ist nach Ischämie die Reaktion der Gefäße auf vasodilatierende Substanzen wie Bradikinin und Acetylcholin sowie die Freisetzung der NO-Synthetase deutlich herabgesetzt [17].

Die Autoregulation des renalen Blutflusses ist nach Ischämie aufgehoben [26].

Eine Erhöhung des Gefäßwiderstandes wird ebenso durch den tubulo-glomerulären Feedbackmechanismus erzeugt [22]. Dieser wird durch zwei Prozesse aktiviert. Zum einen wird durch die mangelnde Rückresorption von Natrium, Kalium und Chlorid und zum anderen durch den mangelhaften Abfluss eine hohe Konzentration von Elektrolyten in den distalen Tubuli erreicht. Durch die hohe E-lyte-Konzentration im frühdistalen Tubulus, welcher in unmittelbarer Nachbarschaft zur Macula densa liegt, wird der Feedback Mechanismus ausgelöst. Dieser hat eine Drosselung der GFR über die Vasokonstriktion der vas afferenz zur Folge [17, 25].

Eine eingeschränkte GFR und RBF sollen den Verlust der Resorptionsfähigkeit des Tubulusepithels ausgleichen, um den Körper vor einem hohen Natrium und Wasser Verlust zu schützen [17].

3.2.3 Auswirkung einer Ischämie auf den Sauerstoffbedarf und Blutfluss in der Niere

Für das Verständnis der Pathophysiologie im akuten Nierenversagens ist der unterschiedliche Sauerstoffbedarf und davon abhängige RBF von Bedeutung. Dieser nimmt von der Rinde über das äußere zum inneren Mark hin ab [17]. Der größte RBF Rückgang ist im äußeren Mark zu verzeichnen [21, 22]. Hier liegen die S₃ – Segmente der proximalen Tubuli und der „aufsteigende Dicke Teil der Henleschen Schleife“. In den proximalen Tubuli werden insgesamt 99 % der Na⁺ - Ionen rückresorbiert. In dem „aufsteigenden Dicken Teil der Henleschen Schleife“ ist der 2Na⁺Cl⁻Kotransporter lokalisiert. Für die Resorptionsleistung in beiden Tubuli Abschnitten ist ein hoher Sauerstoffbedarf erforderlich [17, 25]. Im Falle einer Ischämie steht dieser aber wegen des geminderten RBF nicht zur Verfügung und es kommt zu einer relativen Sauerstoffunterversorgung mit der daraus resultierenden Zellschädigung [22, 25]. Die proximalen Tubuli sind gegenüber einer Hypoxie ganz

besonders störanfällig, da in diesen Zellen keine Energiegewinnung bzw. – Regeneration aus dem anaeroben Stoffwechsel der Glykolyse erfolgen kann.

3.2.4 Auswirkungen Tubulärer Faktoren auf das ANV

Die renale Ischämie führt zu folgenden morphologischen Veränderungen der Tubuli, wodurch das ANV aufrechterhalten wird.

3.2.4.1 Apoptose

Die Apoptose stellt im Gegensatz zur Nekrose einen geordneten und programmierten Zelltod dar. Beide Formen des Zellunterganges besitzen eigene morphologische Kennzeichen. Die Nekrose ist durch eine rasche Zellschwellung und Vergrößerung der Mitochondrien charakterisiert. Die Zellmembrane wird zerstört. Cytosol tritt in das Interstitium aus und ruft eine Entzündungsreaktion hervor. Im Gegensatz dazu zeichnet sich die Apoptose durch einen langsameren Zelluntergang aus. Es kommt zu einer Ablösung der Zellen von der Basalmembran. Der Zellverbund wird aufgelöst. Die Mitochondrien scheinen weiterhin intakt. Der Zellkern kondensiert zu einer unspezifischen Chromatinmasse, welche dann in Einzelteile zerfällt [27-29]. Schließlich zerfällt die Zelle in membrangebundene Einzelkörper, welche Zellorganellen, Zytosol und Zellskelett enthalten. Die apoptotischen Fragmente werden rasch phagozytiert [28].

Reize, welche eine Apoptose auslösen, bestehen in Mangel an Wachstums Faktoren (dem sog. default pathway), Ischämie, hoher Oxidationsrate, Fas-Ligand und Tumor Nekrose Faktor (TNF- α)[18, 23].

Die Stoffwechselwege, welche in eine Apoptose münden, werden in eine Commitment (Zuordnung-) und Execution (Ausführung-) Phase unterteilt. Ist eine Zelle einem apoptotischen Reiz ausgesetzt entscheidet die Commitment Phase über das Schicksal der Zelle. In dieser Phase ist die Zelle einer Reihe pro- und antiapoptotischer Faktoren gegenübergestellt. Überwiegen hierbei die proapoptotischen Faktoren mündet die Zelle in der Execution (Ausführung-) Phase, welche den Zelltod über eine Reihe spezifischer Mechanismen zur Folge hat [25].

Die Zelle ist in der **Commitment Phase** [30] einer Reihe von Faktoren wie den Bcl-2 Proteinen, Transcription Faktoren und Kinasen gegenübergestellt, die über eine mögliche Apoptose entscheiden.

Bcl-2 Proteine können Membranen direkt perforieren, so dass proapoptotische Stoffe wie beispielsweise das Cytochrom-c aus den Mitochondrien austreten kann [18].

Pro- und antiapoptotische Proteine können sich neutralisieren indem sie aneinander andocken und Dimere bilden. Ob pro- oder antiapoptotische Faktoren überwiegen hängt im Wesentlichen von der Konzentration der einzelnen Proteine ab.

Die **Execution Phase** [30] ist durch die Aktivierung der Caspasen gekennzeichnet. Caspasen sind Proteasen, welche in der Zelle als inaktive Precursoren (Procaspasen) vorliegen. Die Enzyme sind Teil einer komplexen proteolytischen Kaskade, die nach Aktivierung irreversibel an die ihnen zugeordneten Substrate binden[18, 27, 28, 31, 32]. 14 Caspasen werden in drei Hauptgruppen eingeteilt. Die Caspasen der 1. Gruppe haben in der Apoptose nur eine untergeordnete Bedeutung. Die Gruppe 2 stellt die „executioner Caspasen“ und Gruppe 3 die „Initiator Caspasen“ dar.

Die Executioner Caspasen bewirken die klassischen morphologischen und biochemischen Merkmale der Apoptose [27]. So degradiert Caspase 6 [33], Matrixproteine des Zellkerns. Weitere Angriffsziele sind das Zytoskelett, sowie Transkriptionsfaktoren und Bcl-2 Proteine [18].

Ein bestimmtes Kontingent intakter **Mitochondrien** ist Voraussetzung für den Prozess der Apoptose, welcher speziell nach kalter Organlagerung in Kraft tritt.

Die Apoptose ist ein energieverbrauchender Prozess für den ATP bereitgestellt werden muss [28, 34, 35]. Zudem können Mitochondrien Stoffe freisetzen, die direkt in den Prozess eingreifen oder diesen auslösen. Insbesondere konnte eine Öffnung der mitochondriellen Membranporen, hervorgerufen durch die erhöhte Calciumkonzentration während der kühlen Organkonservierung, nachgewiesen werden [36].

Bcl-2 Proteine liegen unter physiologischen Bedingungen in geringer Konzentration an der mitochondriellen Membran vor. Bei Kältelagerung steigt die Konzentration der Proteine. Das Bcl-2 Protein, welches unter Normalbedingungen in höherer Konzentration vorliegt, antagonisiert die membranzerstörende Wirkung des Bax-Protein. Das Verhältnis ändert sich bei kühler Organkonservierung zugunsten des Bax-Protein [18].

Durch die entstandenen Poren tritt Cytochrom-c, welches eine initiierende Wirkung auf die Apoptose hat, aus. Dieses bildet mit einem Protein dem sog. **Apoptose-protease-activating factor-1 (Apaf-1)**[18]. Die Zelle tritt in die Executionphase erst nach Reperfusion durch die Aktivierung der Caspase 3 ein [31].

Eine Änderung des Redox-Potential sowie der ATP-Mangel können ebenfalls die Apoptose auslösen. Speziell die Kältekonservierung der Organe hat eine Schwellung und Verletzung der Mitochondrien mit daraus resultierender Förderung der Apoptose zur Folge [18].

Es gibt weitere Möglichkeiten, welche die Apoptose auslösen. Die sog. „**death Receptors**“ gehören in die Familie der TNF Rezeptoren und beinhalten Fas- Ligand (FasL) und den TNF-Rezeptor-1 (Ligand $TNF\alpha$)[18]. Der intrazelluläre Anteil der Rezeptoren tritt nach Aktivierung mit einem Protein in Verbindung und bildet den „death inducing signaling complex“ DISC. Beide Faktoren lösen die Apoptose durch Aktivierung der Initiator Caspasen 8 und 10 aus. Zusätzlich initiiert die Caspase 8 die Perforation der mitochondrialen Membran.

Renale Tubulus Zellen exprimieren beide Rezeptortypen an Ihrer Oberfläche. Es besteht jedoch physiologischerweise eine relative Resistenz gegenüber einer Aktivierung durch die Liganden Fas und $TNF\alpha$. Ob bei kühler Organlagerung die Konzentration der „death“-Rezeptoren und ihrer Liganden zunimmt ist bis zum jetzigen Zeitpunkt unklar [36]

Mit dem Begriff „**default Pathway**“ wird das Fehlen von Wachstumsfaktoren der Verlust von Zell-Zell- und Zell- Matrix Kontakten gekennzeichnet.

Die Komponenten zur Initiierung einer Apoptose werden von den meisten Zellen in einer inaktiven Form exprimiert. Diesbezüglich benötigt die Zelle einen konstanten Fluss an extrazellulären Überlebenssignalen und Faktoren, welche die Apoptose in „Schach“ halten [18, 23, 27, 31]. Es gibt zwei große Gruppen an Überlebensfaktoren 1. die löslichen- und 2. adhäsive Wachstumsfaktoren (Anheftung von Zellen an der Matrix und Zell-Zell Kontakte).

Wachstumsfaktoren inhibieren die Apoptose. Ein Mangel an Wachstumsfaktoren mündet auch ohne weitere Reize über den sog. „default pathway“ in der Apoptose. Wachstumsfaktoren wie Epidermal -, Insulin like- und vascular endothelial growth Faktor schützen vor einer stress- und verletzungsbedingten Apoptose [18, 23].

Ein Verlust von Zell-Zell Kontakten und Zell- Matrix Kontakten (Anoikis) hat ebenso über den „Default Pathway“ eine Apoptose zur Folge [17].

Zusammenfassend zeigt sich während der kalten Organlagerung ein Zelluntergang durch Nekrose, während die Apoptose subletal verletzter Zellen in hohem Maße nach Reperfusion des kältekonservierten Organes stattfindet [18]. Deshalb ist davon auszugehen, dass eine antiapoptotische Behandlung vor Reperfusion des kältekonservierten Transplantates z.B. mit Caspase-Inhibitoren zu einer deutlichen Verbesserung der Organfunktion führt [28, 33].

3.2.4.2 Tubular leakage

Die schwerste Form der tubulären Zellschädigung ist die Tubulusnekrose mit Unterbrechung der Kontinuität der Tubuli. Die Folge ist eine Rückfiltration von Tubulusharn ins Blut („tubular leakage“). Dieses Phänomen wird durch eine tubuläre Obstruktion in den Sammelrohren unterstützt. Die tubuläre Obstruktion entsteht durch Konglomerate aus abgestoßenen Bürstensäumen. Bei noch normaler glomerulärer Filtrationsrate stromaufwärts wird dadurch der intratubuläre Druck erhöht [25, 37, 38]. Die daraus resultierende transtubuläre Druckdifferenz ist die treibende Kraft für diesen transtubulären isotonen Soluten und Wasser Transport ohne Verbrauch von renaler Stoffwechselenergie. „Tubular leakage“ [39] ist in den intakten Nephren mit normaler RF_{Na^+} ausgeschlossen. Ein Beitrag von obstruierten „Leaky Nephrons“ zur Endharnbereitung ist ausgeschlossen.

3.2.4.3 Dislokalisierung der $Na^+ K^+ -ATPase$

Nach einem ischämischen Insult wurden morphologische Veränderungen in den proximalen Tubuli durch Elektronen mikroskopische Studien aufgezeigt. Hierbei konnte schon nach kurzer Ischämie eine Verlagerung der $Na^+ K^+ -ATPase$ von der basalen in die apikale Membrane der Endothelzelle nachgewiesen werden [17, 21, 22, 25, 26]. Die korrekte Lage der $Na^+ K^+ -ATPase$ im Bereich der basolateralen Membrane ist für den unidirektionalen Transport bzw. die Reabsorption von Stoffen essentiell, was eine Vielzahl von Transport-Defekten erklärt. Die Intrazelluläre Na^+ -Konzentration ist aber nachgewiesener Maßen gleichbleibend. Na^+ wird durch die Dislokation resorbiert, anstatt ins Tubuluslumen sezerniert, was zudem die hohe Na^+ -Konzentration in den proximalen Tubuli erklären könnte [17].

3.2.5 Biochemische Mechanismen der Zellschädigung

Im Falle eines Sauerstoffdefizit tritt sofort ein ATP-Mangel auf [17, 21, 38]. Hält die Sauerstoffminderversorgung an, wird ATP zu den Nukleotiden Adenosin, Inosin und Hypoxanthin über Adenosin 5-Diphosphat (ADP) und Adenosin 5-monophosphat (AMP) verstoffwechselt. Die Abbauprodukte können aufgrund ihrer Membrangängigkeit wegdiffundieren und stehen nach Wiederaufnahme der O₂ - Versorgung nicht mehr zur ATP-Resynthese zur Verfügung. Eine ATP Neusynthese ist wegen des dafür erforderlichen hohen Energiebedarfs nicht möglich. Es kommt also zu einem „Biochemischen Kollaps“ [17, 25, 38, 40]. Ob es zu einem Zelluntergang kommt, hängt im von der vorhandenen ATP Menge und den Abbauprodukten (Precursoren) in der Zelle ab.

3 Faktoren bestimmen die Empfindlichkeit einer Zelle gegenüber einer Ischämie:

1. Die benötigte Energie, 2. die Glykolyse Kapazität und 3. das Ausmaß der Hypoxie. Zellen mit einer hohen Glykolyse Kapazität sind weniger anfällig gegenüber einer Hypoxie als Zellen, welche nahezu ausschließlich von der Atmungskette abhängig sind [38].

Dies erklärt auch die verschiedene Empfindlichkeit der Zellen in der Niere gegenüber einer Hypoxie. Hier liegt in verschiedenen Regionen eine unterschiedliche Sauerstoffspannung vor. Die Energiegewinnung aus der Glykolyse ist zum Mark hin bedeutend höher [17, 25, 38, 40].

3.2.6 Reperfusion nach Ischämie und kalter Organlagerung

Ein ischämischer Gewebeschaden wird maßgeblich durch reduzierte Sauerstoffradikale, Anstieg der Calcium Konzentration im Zytosol und Aktivierung proteolytischer Enzyme hervorgerufen [22, 27, 41]. Günstige Voraussetzungen für diese Pathomechanismen werden durch die Reperfusion nach Ischämie und kalter Organlagerung geschaffen [14, 18, 22, 27, 31].

Zusätzlich wurden eine weitere Klasse gewebverletzender Substanzen sog. Nitrogen Radikale, welche aus NO-Derivaten entstehen, entdeckt [17, 22, 24, 38, 42].

Reaktive Sauerstoffradikale haben einen wesentlichen Bestandteil an dem Gewebsschaden durch Reperfusion nach Ischämie und kühler Organlagerung und weisen eine hohe Zelltoxizität auf. Ihr Einfluss während der kühlen Transplantatlagerung ist jedoch unklar. Sinn und Zweck einer kühlen Organlagerung

ist ein herabgesetzter Stoffwechsel und daraus folgend eine geminderte Enzymaktivität [43].

Die warme Ischämie hat durch eine Aktivitätssteigerung der 5`Nukleotidase einen raschen Abfall der ATP-Konzentration zur Folge. Daraus resultiert ein Anstieg von Adenosin und Inosin. Im Gegensatz zu den Nukleotiden können Adenosin, Inosin und Hypoxanthin durch die Zellmembranen diffundieren. Inosin wird zu Hypoxanthin und durch die Xanthinoxidase weiter zu Xanthin und Harnsäure metabolisiert[17, 18, 22, 25, 38, 43].

Während der Ischämie fallen durch ATP-Hydrolyse erhebliche Mengen an Hypoxanthin an. Sauerstoff, der bei einer anschließenden Reperfusion dann in ausreichender Menge neben einer hohen Hypoxanthin-Konzentration zu Verfügung steht wird dann in freie Sauerstoffradikale umgewandelt.

4 VERSUCHSTIERE, MATERIAL UND METHODE

Die Tierversuch wurde am 27.08.1992 unter der Versuchsnummer GO1114/ 92 von der zuständigen Behörde genehmigt. Versuchsleiter: Professor E. S. Bücherl, Dr. Christian Grosse-Siestrup. Als Versuchstiere dienen fünf weibliche Läuferschweine der deutschen Landrasse, welche 3 Monate alt sind. Die Schweine hatten zum Zeitpunkt der Operation ein Körpergewicht von 27 bis 41 kg. Die Tiere werden in einer 3 qm großen Einzelbox, unter der ein Urinauffangbecken installiert ist, gehalten. Wasser erhalten sie über eine in die Box integrierte Selbsttränke. Die Lufttemperatur beträgt 18 -21°. Das Licht wird im Tag -Nacht -Rhythmus reguliert. Pro Tag erhielten sie etwa 1700 g eines pelletierten Standardalleinfutters (Sniff MS-Haltung^R (4mm)). Wasser stand zur freien Verfügung.

Ablaufplan

1. Woche	Vorperiode	
	I a	I b
	Eingewöhnung	Eingewöhnung
	Voruntersuchungen	Voruntersuchungen
	Port-System	Port-System
	Eigenblutkonserven	Eigenblutkonserven
	Organentnahme	Organentnahme
		24 h Kältelagerung
7.Tag	Normotherme isolierte Hämoperfusion	
	II a	II b
	Explantation der kontralateralen Niere	Explantation der kontralateralen Niere
	Intensiv-Nachsorge	Intensiv-Nachsorge
Ab 2. Woche	Autologe Reimplantation	
	III a (bis 21. post Op-Tag)	III b (bis 43. post Op-Tag)
	Reimplantation	Reimplantation
	Orthotope in vivo Perfusion	Orthotope in vivo Perfusion
	Überwachung der Tiere	Überwachung der Tiere
	Langzeitnachsorge	Langzeitnachsorge
	Euthanasie	Euthanasie

Die Vorperiode I enthält die Parameter unter Normalbedingungen. Den Tieren wurde Blut am 7. und 1. Tag vor dem Eingriff abgenommen. **I a** ohne Kältekonservierung, **I b** mit Kältekonservierung Vorperiode

Die Perfusion II enthält die Daten einer Niere während der Hämoperfusion.

II a ohne vorangehende Kältekonservierung, **II b** mit vorangehender Kältekonservierung

Die Autologe Reimplantation III zeigt den Verlauf der Versuchstiere von Tag 1 bis Tag 43 bzw. 21. **III a** ohne Kältelagerung, **III b** mit Kältelagerung

4.1 Vorperiode

Von der Einstellung im Forschungshaus, bis zum Operationstermin, wurde jedes Tier zweimal einer klinischen Untersuchung unterzogen. Es wurden Körpertemperatur, Herz-, Atemfrequenz, Futter und Wasseraufnahme sowie Harnabsatz kontrolliert. Blutentnahmen fanden am 7. und am 1. Tag vor Operation statt

4.1.1 Vorbereitende Eingriffe: Implantation des subkutanen Portsystems, Anlegen der Eigenblutkonserven

Operiert wurde unter sterilen Bedingungen im Tier-OP der Tierexperimentellen Einrichtung des Universitätsklinikums Rudolf Virchow.

Die Blutkonserven dienen als Perfusionsmedium für die isolierte Niere und als Reserve für eventuelle Blutverluste während der Operation.

Es wurden 300 ml autologes, zitratantikoaguliertes (ACD-A) Blut über einen Jugularvenenkatheter gewonnen, das in einem mit ACD-A Vorlage (50 ml) versehenen Biopack 500 ml Beutel im Kühlschrank aufbewahrt wurde. Fremdblut wurde wegen möglicher Unverträglichkeiten nicht verwendet. Den Tieren sollte durch eine frühe Blutentnahme eine Regeneration vor der Operation ermöglicht werden.

Es wurde ein Portsystem implantiert, mit dessen Hilfe postoperativ Blutproben gewonnen und Medikamente verabreicht werden können.



Abb.1 Ansicht des Intraportsystems¹

¹ Portsystem Pharmacea Schlauchinnendurchmesser 1,25 mm, Kammerdurchmesser 7 mm, Höhe 12,5 mm

Dieses vollständig implantierbare Kathetersystem hat gegenüber dem durch die Haut geleiteten Kathetern, oder solchen, die zwar „versenkt“, aber zu jeder Nutzung wieder freigelegt werden müssen, entscheidende Vorteile, die gerade bei langzeitinstrumentierten Versuchstieren nützlich sind. Die wiederholte Kanülierung bzw. Punktion von Gefäßen entfällt, weil der Port an einem im Blutgefäß liegenden Katheter angeschlossen ist. Die Kammer, der sog. Port, kann nach Rasur, Reinigung und Sterilisation der Haut mit sterilen Huber Nadeln punktiert werden, um Blutproben zu gewinnen, Arzneimittel zu verabreichen oder den Blutdruck zu messen. Die Funktionsfähigkeit des Systems wird gewährleistet, indem zur Antikoagulation des von retrograd in den Katheter diffundierenden Blutes nach jedem Gebrauch 2000 I. E. Heparin in 4 ml NaCl entsprechend dem Füllungsvolumen des Katheters eingefüllt werden.

Das Intraportsystem ist einfach zu implantieren, gewährleistet monatelangen Gefäßzugang und senkt die Gefahr von Infektionen auf ein Minimum, während transkutane Katheter die Sepsis begünstigen und vom Tier beschädigt oder diskonnektiert werden können. Ein weiterer, und bei dieser Versuchsreihe sehr wichtiger Punkt, ist der Umstand, dass die Tiere das System problemlos tolerieren, es nicht beschädigen oder zu entfernen versuchen.

Die Punktion ist nur mit einem minimalem Trauma verbunden [44, 45]. Sie kann nach einiger Zeit sogar am schlafenden Tier vorgenommen werden, so dass die Probeentnahme keinen Einfluss auf die gemessenen Parameter hat.

Es wurden kommerziell erhältliche Systeme verwendet.

Die Katheter haben einen inneren Durchmesser von 1,25 mm und einen äußeren Durchmesser von 2,1 mm. Sie bestehen aus Silikon für medizinische Zwecke. Das Kathetermaterial enthält Bariumsulfat zur strahlenoptischen Darstellung. Die festen Kapseln des eigentlichen Ports bestehen aus Polysulfon-Kunststoff oder Titan. Die die Kapsel verschließende Membran besteht aus Silikon. Das freie venöse Ende des Katheters wird in die V. jugularis interna mit nichtresorbierbarem Nahtmaterial eingeknüpft.

Die Punktionskammer wird etwa in Höhe des Schnittpunktes der Mm. Omotransversarius und cleidooccipitalis subcutan mit nicht resorbierbarem Nahtmaterial fixiert. Damit ist der Port unter der Haut leicht palpierbar und zu

punktieren. Von Bedeutung ist auch ob der Probennehmer Links- oder Rechtsänder ist.

Zum gleichen Termin wurden im Rahmen der Vorsorgeuntersuchung Blutproben gewonnen und auf ihren Gehalt an Elektrolyten, Glucose, Harnstoff, Kreatinin, Harnsäure und Protein untersucht. Daneben wird ein Blutbild erstellt und die Osmolalität bestimmt. Außerdem wurde via Blasenkatheter eine Harnprobe genommen und ihr Gehalt an Elektrolyten, Glucose, Harnstoff, Kreatinin, Harnsäure und Protein bestimmt. Weiterhin wird die Osmolalität bestimmt. Etwa 8 Tage später wird die Explantation und Perfusion der Niere durchgeführt.

4.2 Organentnahme, normotherme isolierte Hämoperfusion

4.2.1 Operatives Vorgehen zur Organentnahme

4.2.1.1 Narkose

Die Tiere wurden eine Stunde vor OP-Beginn mit 3-4 mg Azaperon/kg Kgw i. m.¹ sediert. Zusätzlich enthielt die Prämedikation 0,5 mg Atropinsulfat². Anschließend konnte eine Venüle in die Ohrtrandvene gelegt werden, worüber die Tiere zur Einleitung der Inkubationsnarkose 100 mg Metomidate³ und bei noch vorhandenem Schluckreflex zusätzlich 10-15 mg/kg Körpergewicht Thiopental⁴ erhielten. Die weiterer führende Narkose verlief als Neuroleptanalgesie mit 25 mg/ml Metomidate sowie 0,05 mg/ml Fentanyl^R⁵ alle 30 Minuten als Dauerinfusion zur Analgesie und 0,1 mg/kg Pancuronium^R⁶ bei Narkosebeginn und repetitiven Dosen Pancuronium^R nach Bedarf zur Muskelrelaxierung.

Die Beatmung erfolgte volumengesteuert mit einem Servo-Ventilator⁷ bei einem Atemminutenvolumen von 120-150 mg/kg Körpergewicht und einer Atemfrequenz von 10-15/min.

Die inspiratorische Sauerstoffbeimischung lag bei 40 %.

¹ Stresnil^R, Fa. Janssen

² Fa. Braun

³ Hypnodil^R, Fa. Jansen

⁴ Trapanal^R, Fa. Byk Gulden

⁵ (Fa. Janssen)

⁶ Fa. Organon-Teknika

⁷ (Fa. Siemens-Elementa)

4.2.1.2 OP-Überwachung

Zur Überwachung der Kreislaufsituation diente ein EKG. Die Körpertemperatur wurde über eine rektale Temperatursonde gemessen. Ein Blasenkatheter zur Harngewinnung während der Vorperiode wurde gelegt und an eine Urinsammelbox angeschlossen.

Der Zeitraum von der Blasenentleerung bis zur Ligatur der A. renalis wurde als Vorperiode definiert.

Die in dieser Zeit gesammelte Urinmenge wurde gemessen und folgende Parameter bestimmt bzw. berechnet:

Kreatininausscheidung und –clearance, Harnstoffausscheidung und –clearance, Natrium- und Kaliumausscheidung, -resorption und Natriumresorptionsfraktion, Proteingehalt des Urins und seine Osmolalität.

4.2.1.3 Kanülierung der V. jugularis externa und der A. carotis communis

Nach entsprechender Vorbereitung des Operationsgebietes durch Rasur, Hautdesinfektion und sterilem Abdecken wurde dann die Haut entlang der Drosselrinne auf ca. 5 cm durchtrennt, am lateralen Rand des M. omohyoideus und lateral vom M. sternomastoideus stumpf in die Tiefe präpariert, die V. jugularis externa aufgesucht, angeschlungen, eröffnet und ein steriler Venenkatheter vorhofnah eingebracht und eingeknüpft. Über diesen Katheter wurde der zentralvenöse Druck gemessen und die nötige Substitution mit Flüssigkeit durchgeführt.

Die A. carotis communis wurde in der gleichen Weise unter Schonung des N. vagus kanüliert. Über den arteriellen Katheter wurden der mittlere arterielle Blutdruck und die Herzfrequenz gemessen, an einem Monitor angeschlossen und mit Hilfe eines Brush-Schreibers fortlaufend registriert.

4.2.1.4 Organentnahme

Die Haut wurde in der Medianlinie handbreit oberhalb des Nabels bis zum cranialen Beckenrand mit einem Elektrokauter durchtrennt. Subkutanes Fettgewebe sowie die Fascia tunica superficialis wurden durchschnitten und das Peritoneum in der Linea alba eröffnet.

Die linke Niere wurde wegen der größeren Länge der Nierenvene bevorzugt. Falls das Organ durch mehrere Gefäße versorgt wurde, mußte die rechte Niere für die Autotransplantation herangezogen werden, weil die Ischämiezeit durch die Kanülierung jedes weiteren Gefäßes verlängert wird.

Die Präparation des Nierenhilus erfolgte von der V. renalis bis zur V. cava caudalis. Es folgte die Präparation der A. renalis bis zu ihrem Ursprung in der Aorta.

Der Ureter wurde präpariert, unter Erhaltung eines möglichst langen Stückes abgetrennt und mit einem abgeschnittenen Katheter ¹ kanüliert. Bevor A. und V. renalis abgeklemmt, durchgetrennt und kanüliert wurden, wurde dem Tier Heparin in einer Menge von 10.000 I. E verabreicht. Die Vene wurde unverzüglich mit einem Katheter kanüliert ², dessen Größe dem jeweiligen Venendurchmesser angepaßt ausgewählt wurde. Die Arterie wurde je nach Kaliber mit einer abgesetzten Injektomat-Leitung, einer Heidelberger Verlängerung oder mit dem sehr dünnen Katheter¹ kanüliert.

Nach der Entnahme wurde die Niere gewogen und 24 h kältekonservert.

4.2.1.5 24 h Kältekonservertierung

Vor der 24 h Kältekonservertierung wurde eine Spülung der Niere mit 4 °C kalter Euro-Collins Lösung bei einem Druck von 80 mm Hg durchgeführt. Die Niere wurde dann in einen Transplantatbeutel verpackt und in einer Styroporbox für 24 h kältekonservertiert bei 4 ° C.

¹Pharmaseal^R

²W. HTM Pediatric Cannulae

4.2.2 Normotherme isolierte Organperfusion

4.2.2.1 Perfusionstechnik

Das Perfusionsmedium war 300 ml autologes, max. 8 Tage vor der Organentnahme abgenommenes und zitratantikoaguliertes (ACD-A) Blut, das in einem mit ACD-A Vorlage (50 ml) versehenem Biopack 500 ml Beutel im Kühlschrank aufbewahrt wurde. Kreatinin als Markersubstanz der GFR-Messung wurde zu einer Endkonzentration von 10 mg/dl zugesetzt. Dem Blutkreislauf wurde zur Kompensation des Albuminverlustes 20 %iges Humanalbumin mit einer Rate von 1 g/h zugeführt. Zu Versuchsbeginn wurde mit 7500 I. E. Heparin eine zusätzliche Antikoagulation vorgenommen, die an Stelle der Zitrat-Antikoagulation trat, welche durch Dialyse gegen das calciumhaltige Dialysat unwirksam wird. Durch Perfusion wurden ein Blut- und ein Dialysatkreislauf hergestellt.

Blut aus dem Blutbeutel, der das vorher gewonnene Blut erhielt, wurde über eine Rollerpumpe einem „low flux“ Polysulfon Dialysem modul (Modell F6, Fresenius AG) durchgeführt. Das im Dialysem modul arterialisierte Blut wurde über eine zweite Rollerpumpe der Niere zugeführt. Es wurde in die A. renalis eingelegte Katheter verwendet. Das Nierenvenenblut floß über den eingelegten Nierenkatheter auf Grund einer hydrostatischen Druckdifferenz in den Blutbeutel (800 ml) zurück (s. Abb.2).

Der Blutbeutel wurde an einer elektronischen Waage (Fa. Sartorius) aufgehängt.

Die Ultrafiltration im Dialysem modul wurde über die Pumpeneinstellung so gesteuert, daß keine Nettoflüssigkeitsverschiebungen stattfanden. Das Beutelgewicht blieb dabei konstant. Der Dialysatkreislauf wurde durch eine Rollerpumpe (Doppelkopfrollerpumpe Stöckert 10-20-00) aufrechterhalten, die das Dialysat mit einem Volumenstrom von 1 l/min dem Dialysem modul dialysatseitig zuführte.

Das aus dem Dialysem modul abfließende Dialysat wurde zuerst einem Wärmetauscher (Omnitherm) zugeführt, der durch einen Thermostaten (Stöckert 16-21-00) eine Temperatur von 37 °C einstellte.

Danach wurde das Dialysat einem Reservoir zugeführt, das aus einem Plexiglaszylinder von 10 l Füllvolumen bestand. Im Dialysatreservoir befanden sich 6 l Ringer-Lactatlösung mit einem Zusatz von 10 ml 8.4 % NaHCO₃ pro Liter. Durch Einleiten eines Gasgemisches von 97.5 % O₂ und 2.5 % CO₂ fand eine Äquilibrierung des Dialysates statt. Das Gasgemisch wurde durch ein Ventil im Deckel des Plexiglaszylinders gegen Raumdruck abgeführt.

4.2.2.2 Normotherme Hämoperfusion

Der Aufbau ermöglicht eine Perfusion mit körperwarmem Vollblut, das in einem einstufigen Verfahren sowohl arterialisiert (künstliche Lunge) als auch entgiftet wird (künstliche Niere). Zum Gas-, Solvenz- und Solutentransport wurde ein Dialyse-Hohlfasermodule benützt, durch das Blut hindurch geleitet wurde und dabei gegen ein, unter Atmosphärendruck mit einem O₂/CO₂ Gasgemisch begastetes Dialysat, dialysiert wurde. Diese Verfahrensweise ist der Funktion der Kiemen der elasmobranchen Fische nachgeahmt.

Die Versorgung des isolierten Organes mit Energiesubstrat erfolgte über das Angebot von Milchsäure, wobei die Fähigkeit der Säugerorgane, in Anwesenheit von Sauerstoff draus aerob Energie zu gewinnen, ausgenutzt wurde.

Die Dissoziation der Milchsäure wurde gleichzeitig als Puffersystem benutzt, wobei allerdings die Bicarbonatkonzentration unphysiologisch niedrig gehalten werden mußte. Das Dialysat hatte folgende Zusammensetzung an chemisch gelösten Substanzen:

NA⁺ 140 mM, K⁺ 5 mM, Ca²⁺ 2 mM, Cl⁻ 112 mM, HCO₃⁻ 10 mM, Lactat 27 mM.

Die Niere wurde während der Perfusion in einer dickwandigen Plexiglaskammer aufbewahrt, die vorher auf 37 °C angewärmt wurde und während der Perfusion mit einer Infrarotlampe bestrahlt wurde. Über eine Sonde wurde die Innentemperatur der Kammer gemessen und auf 37 °C durch Veränderung der Strahlungsintensität gehalten. Die Harnproduktion während der Perfusionszeit wurde über einen gelegten Ureterkatheter¹ abgeleitet, gesammelt und gemessen. Es wurden die Kreatininausscheidung und -clearance, die Harnstoffausscheidung und -clearance, Natrium- und Kaliumausscheidung, -resorption und -resorptionsfraktion gemessen, bzw. berechnet. Nach Beendigung der Perfusion wurde die Niere erneut gewogen. Die zur Kanülierung benutzten Katheter und Schläuche wurden gewogen und von dem Gesamtgewicht abgezogen, weil sie nach der Organentnahme mit gewogen worden waren.

4.2.2.3 „Vorsichtige Spülung“ zur Konservierung der Niere

Vor der Replantation der Niere wurde eine Spülung des Organes mit 4 °C kalter Ringer-Laktat Lösung bei einem Druck von 80 mm Hg durchgeführt, um eine weitere warme Ischämie während der Anastomosierung zu vermeiden

¹ Abgesetzte Parmaseal[®]-Leitung

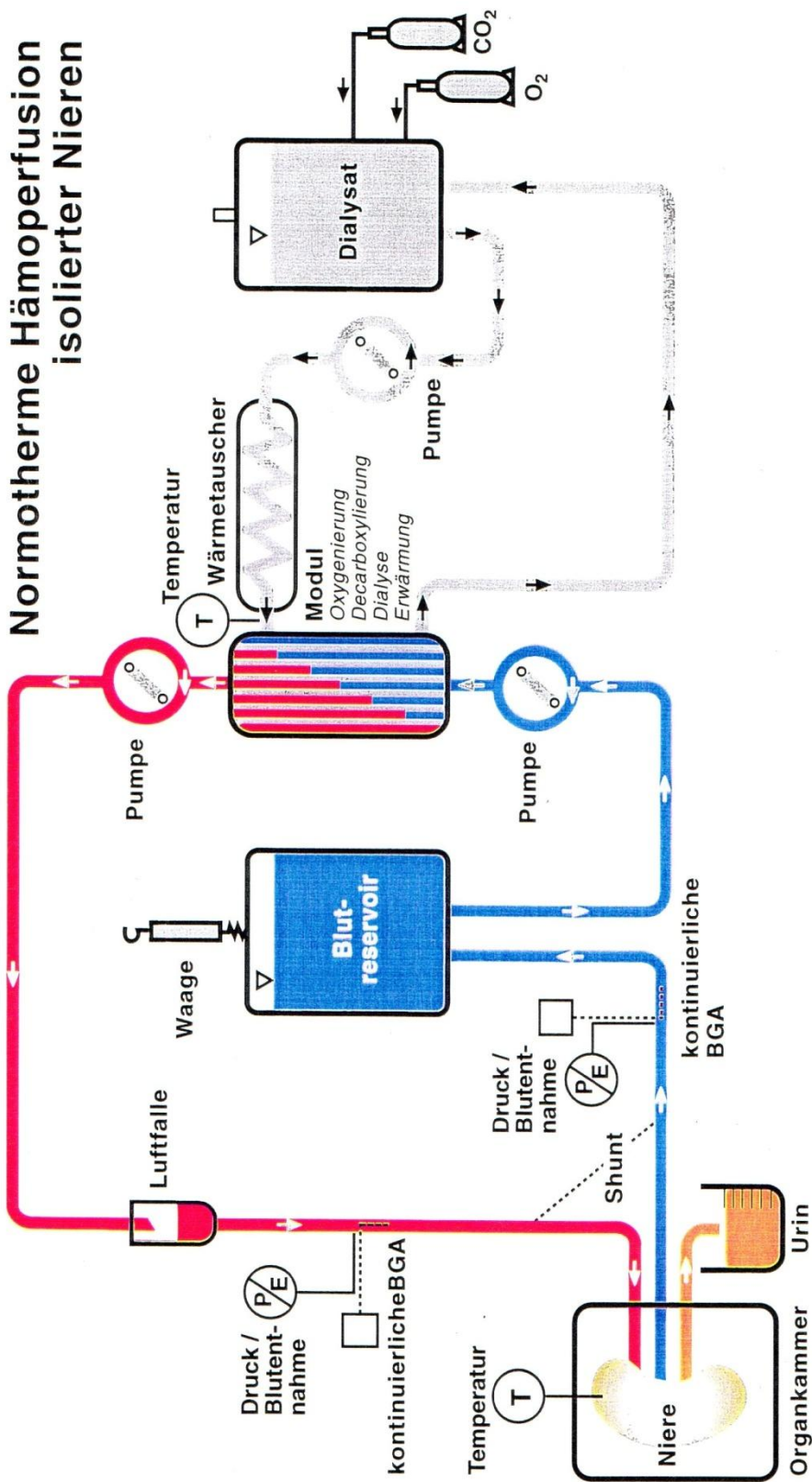


Abb. 2 Schema des Perfusionssystems

4.3 Autologe Reimplantation nach Kältelagerung und isolierter Hämoperfusion

4.3.1 Reimplantation nach normothermer Hämoperfusion ¹

Die A. iliaca externa und die V. iliaca communis wurden mittels vessel-loops angeschlossen, nachdem sie auf einer Strecke von 4-5 cm freipräpariert worden waren. Gefäßäste wurden ligiert. Es folgte die End-zu-Seit-Anastomosierung zwischen V. renalis und V. iliaca communis und anschließend End-zu-Seit-Anastomosierung zwischen A. renalis und A. iliaca externa. Als Nahtmaterial wurde Prolene^R 7/0 verwendet.

Nach Freigabe des Blutstroms erfolgte die Inzision der Blase und Ureteroneocystostomie unter Bildung eines submucösen Tunnels. Der Ureter wurde in der Blase mit Einzelheften fixiert. Anschließend wurde die Blase zweischichtig verschlossen. Das Abdomen wurde in der üblichen Weise verschlossen. Der Blasenkatheter wurde nach Operationsende entfernt.

4.3.2 Überwachung der Tiere

Während der normothermen Hämoperfusion und bis zum OP-Ende wurden Herzfrequenz, Blutdruck und Körpertemperatur überwacht.

4.3.2.1 Intensivnachsorge

Die Tiere wurden 6-8 Stunden nach Operationsende intensiv überwacht, bis ihr Zustand stabil war, sie stehen und Wasser aufnehmen konnten.

Arterieller Blutdruck, Herzfrequenz und Blutgase wurden kontrolliert und Elektrolytlösungen, Plasmaexpander, Mannitol und Pufferlösungen nach Bedarf infundiert. Zur Schmerzstillung wurden 15-30 mg pro Tier Dipidolor^R bei Bedarf verabreicht.

¹ Die Operation wurde durch OA Dr. med. K. de Jonge† durchgeführt

4.3.2.2 Langzeitnachsorge

Im Gegensatz zu vergleichbaren Untersuchungen, wurde aus Gründen der größtmöglichen Schonung der Tiere darauf verzichtet, in der postoperativen Phase einen Blasenkatheter zu verwenden oder die Tiere zur sauberen Harnsammlung Zwangsmaßnahmen zu unterwerfen.

Die unter dem perforierten Käfigboden schräg angebrachten Wannen lassen eine weitgehend saubere und mengenmäßig exakte Urinsammlung zu, weil abgesetzter Harn nicht in der Wanne stehenbleibt, sondern abfließt. Dies trägt dazu bei, daß aus eventuell vorhandenen Verunreinigungen keine die Urinuntersuchung verfälschenden Inhaltsstoffe herausgelöst werden. Eine Verschmutzung des Urins mit Kot oder Futter konnte weitgehend ausgeschlossen werden, weil Kot nicht durch den Gitterrost fallen konnte und außerdem die Wannen mehrfach täglich gereinigt und getrocknet wurden.

Nach der Operation wurden 42 Tage lang in 3 tägigem Rhythmus die Diurese und im Urin Natrium, Kalium, Osmolalität, Glucose, Harnstoff, Kreatinin, Harnsäure und Protein bestimmt.

Etwa in der Mitte der Sammelperiode wurde ebenfalls täglich über das Intraportsystem eine Blutprobe entnommen und darin Natrium, Kalium, Kalzium, anorg. Phosphat, Glucose, Harnstoff, Kreatinin, Harnsäure und Protein bestimmt. Außerdem wurden WBC, RBC, Hb, Hkt, MCV, MCH, MCHC und die Thrombozytenzahl bestimmt.

Es wurden die Kreatininausscheidung und –clearance, die Harnstoffausscheidung und –clearance, Natrium- und Kalciumausscheidung, und –resorptionsfraktion gemessen bzw. berechnet.

4.3.2.3 Euthanasie

Nach 6 Wochen wurden die Tiere durch intravenöse Injektion von 1.5-2 g Thiopental-Natrium¹ und 40 mval KCl schmerzlos getötet.

¹ Trapanal[®], BYK Gulden

4.4 Labormethoden

Alle Blutuntersuchung wurden mit Ausnahme der Blutgasanalysen¹ durchgeführt. Die Blutgasanalysen erfolgten sofort nach Probeentnahme mit Hilfe des im OP bereitstehenden BGA-Gerätes².

4.4.1 Hämatologie

4.4.1.1 Erythrozyten

Die photoelektronische Zählung erfolgt mittels Streulichtverfahren nach Fixierung der Erythrozyten durch Glutaraldehyd.

4.4.1.2 Hämatokrit

Der Hämatokrit-Wert wird durch Zentrifugieren einer gerinnungsfreien Blutprobe in einem Röhrchen bestimmt. Die Gerinnung des Blutes wird dabei durch Zugabe von EDTA (Ethylendiamintetraacetat) verhindert. Die schwereren roten Blutkörperchen setzen sich vom Plasma ab und werden gemessen, wobei der Anteil der weißen Blutkörperchen an den zellulären Bestandteilen vernachlässigt werden kann. Das Verhältnis von Blutkörperchen zu Plasma lässt sich an diesem Röhrchen mit bloßem Auge ablesen

4.4.1.3 Hämoglobinkonzentration

Es wird hierzu die modifizierte Cyan- Hämoglobin-Methode angewendet. Die zweiwertigen Eisenionen des Hämoglobins werden durch Kaliumferricyanid zu dreiwertigen Eisenionen unter Bildung von Hämoglobin oxydiert. Hämoglobin reagiert unter Zusetzung von Kaliumcyanid mit den Cyanidionen zu Hämiglobincyanid, das 546 nm photometrisch bestimmt wird.

¹ Institut für klinische Chemie des Universitätsklinikums Rudolf Virchow Leitung Prof. Dr. Köttgen

² Corning 178

4.4.1.4 Leukozyten

Die photoelektronische Messung erfolgt mittels Streulichtmessung und Absorptionsmessung nach zytochemischer Reaktion. Nach Lyse der Erythrozyten erfolgt eine Fixation und Anfärbung der Leukozyten entsprechend ihrer Peroxidasekonzentration.

4.4.2 Klinische Chemie

Die Bestimmungen erfolgten mit dem Großanalyser¹.

4.4.2.1 Kreatinin¹

Kreatinin wird mit der Jaffe' - Reaktion bestimmt.

In alkalischer Lösung wird Kreatinin mit Pikrinsäure versetzt, was zu einer gelb-orangegefärbten Verbindung führt, deren Farbintensität der Kreatininkonzentration proportional ist und bei 500-550 nm photometrisch gemessen wird.

In gleicher Weise erfolgt die Bestimmung des Kreatinin im Urin.

4.4.2.2 Harnstoff¹

Die Bestimmung erfolgt photometrisch. Harnstoff wird durch Urease zu Ammoniak und CO₂ hydrolysiert. Durch GLDH wird unter Verbrauch von NADH Glutamat und NAD gebildet. Als Messgröße dient die Extinktionsabnahme von NADH, die der Ammoniak-Menge proportional ist.

4.4.2.3 Natrium und Kalium¹

Die Natrium- und Kaliumkonzentration wird potentiometrisch mit ionenselektiven Elektroden gemessen

4.4.2.4 Anorganisches Phosphat¹

In saurer Lösung mit Ammoniummolybdat und Ammoniumvanadat bildet anorganisches Phosphat einen gelbgefärbten Komplex, dessen Farbintensität der Phosphatkonzentration proportional ist und zwischen 400 und 420 gemessen wird.

¹Technicon DAX 72 der Firma Technicon/Bayer

4.4.2.5 Kalzium¹

O- Kresolphthalein- Komplexen bildet mit Kalzium in alkalischer Lösung einen violetten Komplex, dessen Farbintensität der Kalziumkonzentration direkt proportional ist. Mit dem Test wird das Gesamt- Kalzium im Serum erfasst. der Messbereich liegt zwischen 550 und 600 nm.

4.4.2.6 Gesamt Eiweiß¹

Die Bestimmung erfolgt photometrisch. Eiweiß bildet mit Kupfer- Ionen in alkalischer Lösung (Biuret- Reagens) einen blau- violett- gefärbten Komplex, dessen Farbintensität der Eiweißkonzentration proportional ist und zwischen 530 und 570 nm gemessen wird.

5 ERGEBNISSE

Tabelle 5

Tier	1	2	3	4	5	Mittelwert
Warme Ischämie	19	6	6	5	6	8.5 min
Explantation	29	27	22	28	29	27 min
Kalte Ischämie	----- 24 Stunden -----					
Isolierte Hämoperfusion	90	100	60	84	88	84 min
Reimplantation	45	38	42	48	49	44 min
Post-Reimplantation	----- Sechs Wochen -----					

Tabelle 5 Dauer der einzelnen Versuchsabschnitte (warme Ischämie, Explantation, kalte Ischämie, isolierte Hämoperfusion, Reimplantation, Post-Reimplantation) der Tiere 1-5. Errechnet wurden die Mittelwerte.

Die warme Ischämie reichte von 6 bis 19 min, Mittelwert 8.5 min. Die Dauer der Explantation unter Narkose betrug zwischen 225 und 298 min. Im Mittel lag die Zeit bei 274 min. Die Kältekonservierung wurde bei allen 5 Versuchstieren 24 h lang nach Perfusion mit EuroCollins Lösung durchgeführt. Die isolierte Organperfusion hatte eine Zeitspanne von 60 bis 90 min. Im Mittel betrug sie 84 min. Bei der Reimplantation lag die Dauer der Operation zwischen 38 und 49 min mit einem Mittelwert von 44 min. Die Post-Reimplantationsperiode betrug einheitlich 6 Wochen. Danach wurden die Versuchstiere getötet.

Tabelle 6

Tier	1	2	3	4	5	Mittelwert (S.D.)
Körpergewicht	31.5 kg	33.9 kg	28.5 kg	35 kg	37 kg	33 (±3.25)
Nierengewicht	109 g	142 g	225 g	130 g	200 g	161.2 (±49)

Tabelle 6 Körper und Nierengewichte der Tiere 1-5. Errechnet wurden die Mittelwerte mit Standard Abweichung.

5.1 Vorperiode

Die in der Vorperiode gemessenen Daten sind in Tabelle 7 dargestellt. Die Daten sind auf 10 kg Körpergewicht normiert. Die Literaturwerte wurden auf 10 kg Körpergewicht umgerechnet und vergleichbar gemacht. Das Durchschnittsgewicht betrug in unserer Kohorte 33.0 kg, in der Kohorte von Waldmann [46] 22.5 kg,.

Da die Versuchstiere eine Anpassungszeit an die Haltung im metabolischen Käfig benötigten, werden als Kontrolldaten nur die Messwerte des letzten präoperativen Tages verwendet.

Tabelle 7

Parameter [Dimension]	Median	Literaturwerte [46]
Kreatinin-Konzentration i.S. [mg/dl]	1.0	[0.82 ± 0.25]
[Kreatinin-Clearance [ml/min/10 kg]	47.1	[37.0 ± 6.0]
Harnstoff-Konzentration i.S. [mg/dl]	22	[29.0 ± 17.8]
Harnstoff-Clearance [ml/min/10kg]	25	[21.3 ± 1.5]
Protein-Konzentration i. Serum [g/dl]	6.7	[5.4 ± 0.1]
Protein-Konzentration im Urin [mg/dl]	0.16	[0.04 ± 0.1]
RF _{Natrium}	0.997	[0.998]
Na ⁺ Konzentration im Urin [mmol/l]	26	[38.5 ± 25.7]
Na ⁺ Ausscheidung im Urin [mmol/24h/10 kg]	22.7	[19.4 ± 12.9]
K ⁺ Konzentration im Urin [mmol/l]	62	[57.8 ± 46.6]
Diurese [ml/min/10 kg]	0.61	[0.35 ± 0.26]
Plasma-Osmolalität [mosm/kg]	285	[293 ± 17]
Urin-Osmolalität [mosm/kg]	500	[572 ± 265]

Tabelle 7 Gegenüberstellung Parameter der Nierenfunktion gemessen am Ende der In-vivo Vorperiode und Literaturwerte (K.H. Waldmann[46]). Errechnet wurden die Mittelwerte. Bei den Mittelwerten der Literaturwerte wurden die Standard Abweichungen angegeben.

Ergebnisse

Die gemessenen Parameter der glomerulären Funktion am Ende der Vorperiode sowie die Literaturwerte sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Dabei beträgt am Ende der Vorperiode die Kreatinin-Konzentration im Serum 1.0 [mg/dl] im Vergleich dazu der Literaturwert 0.82 ± 0.25 [mg/dl]. Die Kreatinin-Clearance/10 kg beträgt am Ende der Vorperiode 47.1 [ml/min/10 kg] der Literaturwert 37.0 ± 6.0 [ml/min/10 kg]

Die Harnstoff-Konzentration im Serum beträgt am Ende der Vorperiode 22 [mg/dl] der Literaturwert 29.0 ± 17.8 [mg/dl]. Die Harnstoff-Clearance/10 kg beträgt am Ende der Vorperiode 25 [ml/min/10kg] der Literaturwert 21.3 ± 1.5 [ml/min/10kg].

Die Protein-Konzentration im Serum beträgt am Ende der Vorperiode 6.7 [g/dl] der Literaturwert 5.4 ± 0.1 [g/dl]

Die Protein-Konzentration im Urin beträgt am Ende der Vorperiode 0.16 [mg/dl] der Literaturwert 0.04 ± 0.1 [mg/dl]

Die gemessenen Parameter der glomerulären Funktion am Ende der Vorperiode verglichen mit den Literaturwerten sind größenordnungsmäßig gleich.

Die gemessenen Parameter der tubuläre Funktion sind ebenfalls in Tabelle 7 aufgeführt

Die Resorptionsfraktion-Natrium (RF_{Na^+}) beträgt am Ende der Vorperiode 0.997 der Literaturwert 0.998. Die Natriumkonzentration im Urin beträgt am Ende der Vorperiode 26 [mmol/l] der Literaturwert 38.5 ± 25.7 [mmol/l]. Die Natriumausscheidung im Urin beträgt am Ende der Vorperiode 22.7 [mmol/24h/10 kg] der Literaturwert 19.4 ± 12.9 [mmol/24h/10 kg]

Die Kaliumkonzentration im Urin beträgt am Ende der Vorperiode 62 [mmol/l] der Literaturwert $[57.8 \pm 46.6]$ [mmol/l].

Ebenfalls haben die gemessenen Parameter der tubulären Funktion am Ende der Vorperiode verglichen mit den Literaturwerten die gleiche Größenordnung.

Die renale Osmoregulation bestehend aus Diurese, Plasma- und Urin-Osmolalität sind ebenfalls aufgeführt. Die Diurese beträgt am Ende der Vorperiode 0.61 [ml/min/10 kg] der entsprechende Literaturwert ist mit 0.35 ± 0.26 [ml/min/10 kg] nur halb so groß. Die Plasma-Osmolalität beträgt am Ende der Vorperiode 285 [mosm/kg] der entsprechende Literaturwert 293 ± 17 [mosm/kg]. Die Urin-Osmolalität beträgt am Ende der Vorperiode 500 [mosm/kg] der entsprechende Literaturwert 572 ± 265 [mosm/kg]. Die gemessenen Parameter haben am Ende der Vorperiode die gleiche Größenordnung wie die Literaturwerte.

5.2 Normotherme Isolierte Hämoperfusion nach 24h-Kältekonservierung

Tabelle 8

Parameter [Dimension]	Hämoperfusion Endwert
Zirkulierendes Blutvolumen [ml]	300
Renovasculärer Widerstand [kPa sec ml ⁻¹]	9.60
Kreatinin-Clearance* [ml/ min]	5.75
Resorptionsfraktion Na ⁺ RF _{Na⁺}	23.4
Na ⁺ -Konzentration im Urin [mmol/l]	134
K ⁺ -Konzentration im Urin [mol/l]	6
U/P _{Kreatinin}	3.5
U/P _{osmol}	1.0
Diurese [ml/ min]	20

Tabelle 8. Parameter der Ex-vivo-Nierenfunktion aus dem Versuchsprotokoll mit 24 h Kältekonservierung II b am Ende der isolierten Hämoperfusion mit autologem dialysierten und durch Gasaustausch arterialisiertem Vollblut. Errechnet sind die Medianwerte der Nierenfunktion. Zahl der Tiere N = 5.

* Ermittelt ist der Median aus der Kreatinin-Clearance jeder einzelnen Niere als Absolutwert. D.h. der Clearance-Wert ist unabhängig von dem Körpergewicht des Spendertier angegeben.

5.2.1 Renale Hämodynamik

5.2.1.1 Afferenter Blutdruckverlauf

Die Perfusion setzt bei stark unterschiedlichen Druckwerten zwischen 15 [mmHg] Niere von Tier 4 und 120 mmHg Niere von Tier 5. Der Median begann bei 120 mmHg und endete bei 95 [mmHg]. Die bei der Niere von Tier 4 gemessenen Werte verlaufen zunächst deutlich unter dem Median und steigen ab der 30. Minute stärker an. Alle weiteren Nieren der Tiere 1, 2, 3 und 5 haben einen zum Median parallelen Verlauf auf etwa gleichem Niveau. Im weiteren Verlauf der Perfusion konnte eine weitgehende Angleichung des Perfusionsdruckes bei den einzelnen Nieren erreicht werden.

Der zeitliche Verlauf des afferenten Blutdruckes bei den einzelnen Nieren sowie der errechnete Median ist in Abb. 3 dargestellt.

5.2.1.2 Afferenter Blutfluss

Zu Beginn der Perfusion wurden Flußraten zwischen 10.00 [ml/ min/100g] Niere von Tier 5 und 45.87 [ml/min/100g] Niere von Tier 1 gemessen. Der Median begann bei 20 [ml/min/100g] und stieg im Verlauf auf 80 [ml/min/100g]. Die Niere von Tier 3 hatte mit 124.44 [ml/ min/100g] die höchste Flußrate am Ende der Perfusion. Die Flußrate der Niere von Tier 1, welche mit 45.87 [ml/min/100g] und 91.74 [ml/min/100g] endete lag deutlich über dem Niveau der Medianwerte.

Der zeitliche Verlauf des afferenten Blutflusses bei den einzelnen Nieren sowie der errechnete Median ist in Abb. 4 dargestellt.

Ergebnisse

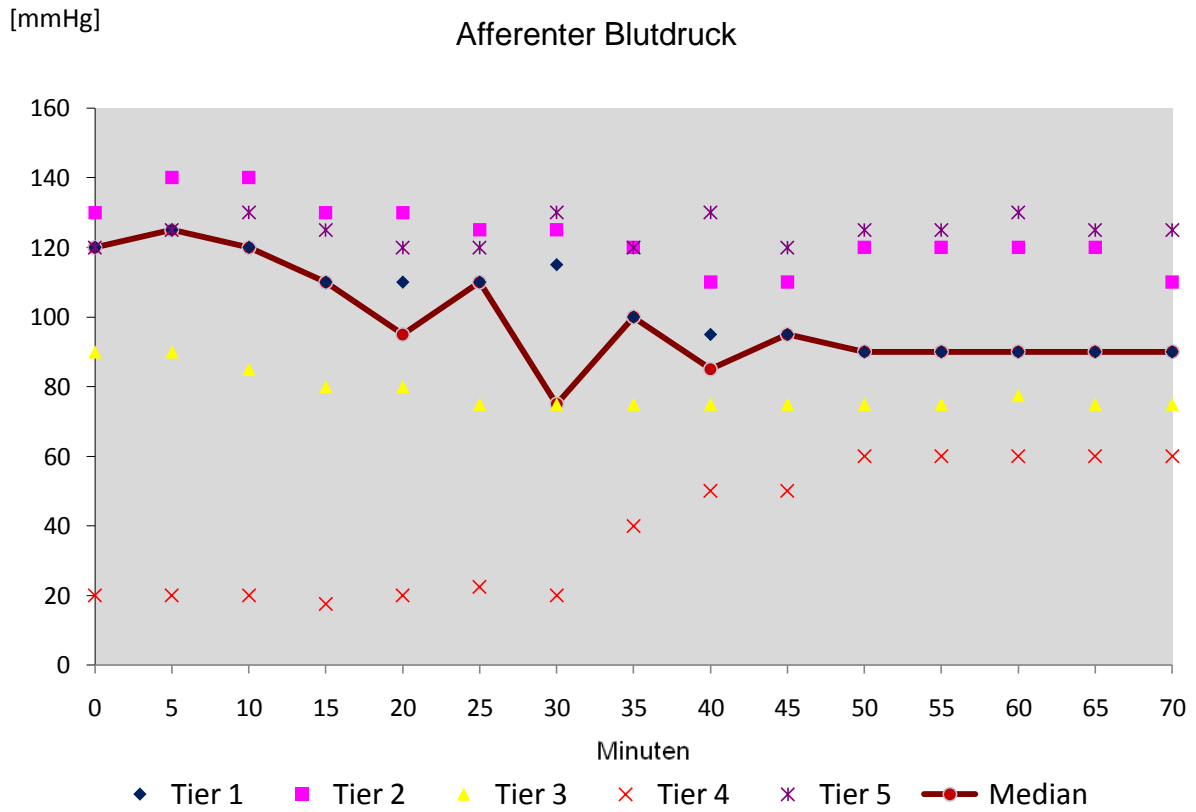


Abb. 3 Verlauf des afferenten Blutdruckes und der Medianwerte während der Hämoperfusion

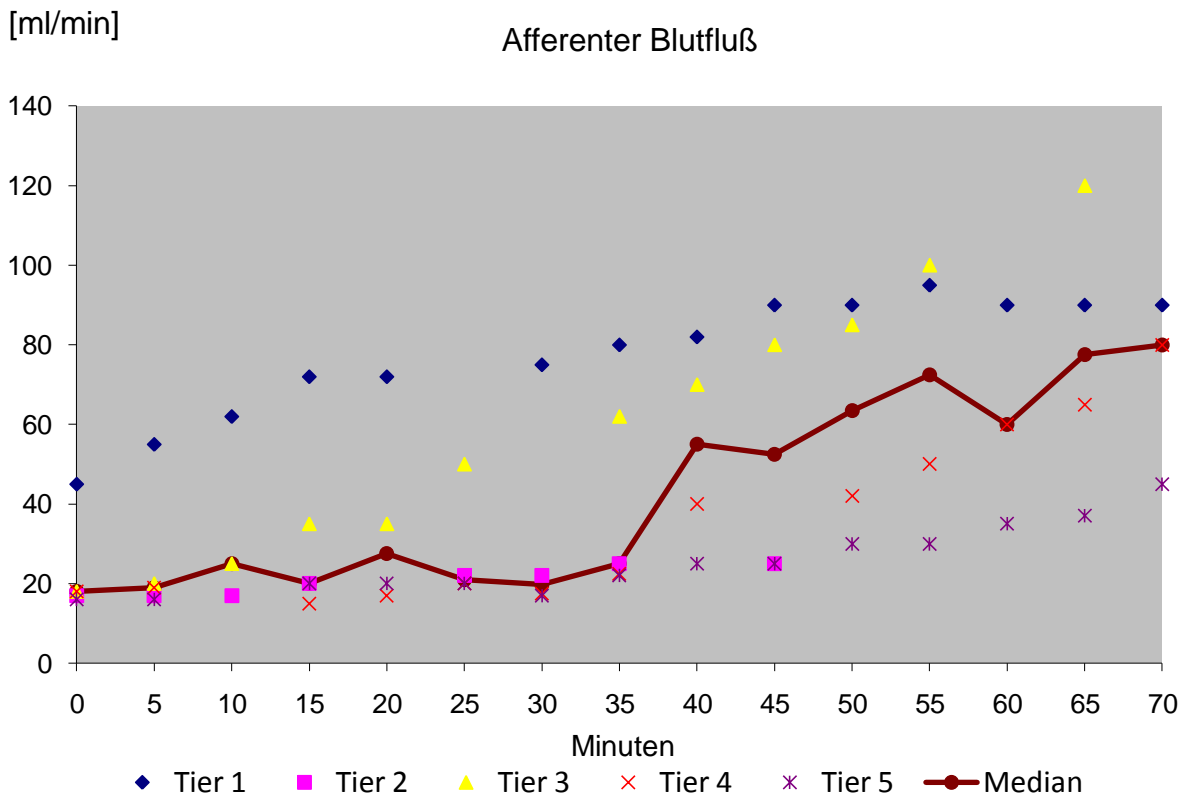


Abb. 4 Verlauf des afferenten Blutfluß und der Medianwerte während der Hämoperfusion

5.2.1.3 Hämodynamischer Widerstand

Die zu Beginn der Perfusion gemessenen Organwiderstände der Niere zeigten große Unterschiede, Niere von Tier 2 87.62 [kPa sec ml⁻¹] und Niere von Tier 4 18.91 [kPa sec ml⁻¹]. Der Median begann bei 28 [kPa sec ml⁻¹] und endete bei 10 [kPa sec ml⁻¹]. Auffallend waren die die sehr hohen Widerstände der Nieren von Tier 2 und 5. Diese lagen deutlich über dem Mediankurvenverlauf. Die Kurvenverläufe der Tiere 1, 3 und 4 hatten insbesondere zum Ende der Perfusion einen ähnlichen Kurvenverlauf.

Der zeitliche Verlauf der hämodynamischen Widerstände der einzelnen Nieren während der Perfusion ist in Abb. 5 dargestellt.

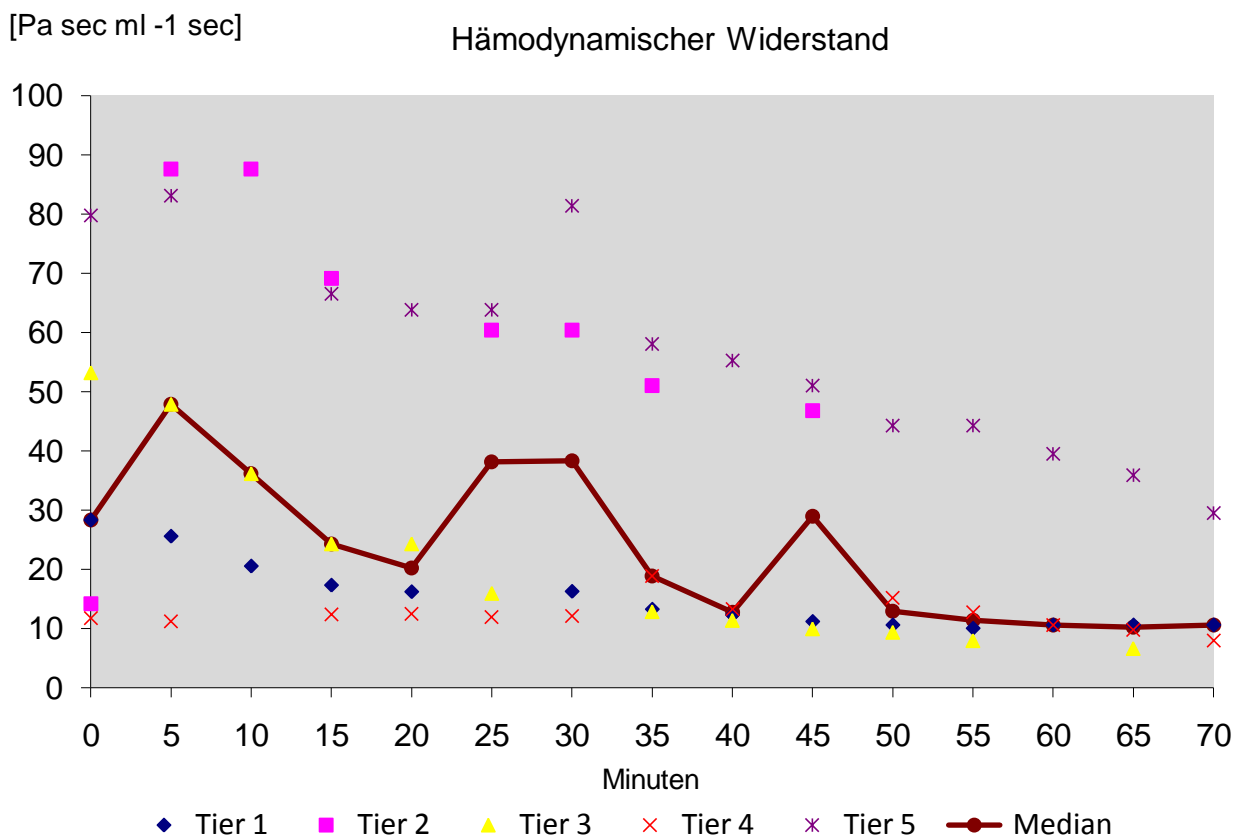


Abb. 5 Verlauf des Hämodynamischen Widerstandes und der Medianwerte während der Hämoperfusion

5.2.1.4 Vergleich der Nierenfunktion: Vorperiode I b und Hämoperfusion II b

Tabelle 9

Parameter [Dimension]	Vorperiode	Hämoperfusion Endwert	Relation zur Vorperiode
Zirkulierendes Blutvolumen [ml]		300	
Renovasculärer Widerstand [kPa sec ml ⁻¹]	3.02	9.60	3.2 fache
Kreatinin-Clearance* [ml/ min]	36.7	5.75	15.7 %
Resorptionsfraktion Na ⁺	99.8	23.4	23 %
Na ⁺ -Konzentration im Urin [mmol/l]	26	134	5.1 fache
K ⁺ -Konzentration im Urin [mol/l]	62	6	9.7 %
U/P _{Kreatinin}	91	3.5	3.8 %
U/P _{osmol}	1.75	1.0	64 %
Diurese [ml/ min]	2.00	20	10 fache

Tabelle 9. Parameter der Nierenfunktion aus dem Versuchsprotokoll mit 24 h Kältekonserverung I und II b während der Vorperiode und am Ende der Hämoperfusion. Mit Angabe der Relation zwischen Vorperiode und Endwert der Hämoperfusion. Errechnet sind die Mediane der Nierenfunktion. Zahl der Tiere N = 5.
* Absolutwert für eine Niere

5.3 Autologe Reimplantation mit Verlaufsdarstellung der Ergebnisse aus Vorperiode und Hämoperfusion

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt graphisch.

In den einzelnen Diagrammen wurde aus den erhobenen Daten der 5 Versuchstiere der resultierende Median gebildet. Zusätzlich sind neben dem Median die Werte der einzelnen Tiere in den Diagrammen durch Punkte ohne Verbindungslinie dargestellt. Die x - Achse ist in die 3 Abschnitte Vorperiode I b, Perfusion II b und Autologe Reimplantation III b unterteilt (s. Material und Methoden).

Ebenso sind die Zeiten der Kältekonservierung und der Autotransplantation markiert.

5.3.1 Glomeruläre Funktion

5.3.1.1 Kreatinin-Konzentration im Serum

Der Median beträgt am 7. und am 1. Tag während der Vorperiode 1.2 respektive 1 mg/dl.

Während der Perfusion II b betrug der Median bei 0 Min. 3.9 nach 60 Min 5.2 und nach 90 Min. 5.2 mg/ dl.

Nach autologer Reimplantation III b stieg der Verlauf der Mediane bis zum 5. post-Op Tag auf 15.9 mg/dl. Die Werte fallen auf 3.5 mg/dl schnell ab. Bis zum 23. post-Op Tag kommt es zu einem langsamen Abfall auf 1.8 mg/dl. Ab diesem Zeitpunkt ist der Beginn der Anpassungsphase anzunehmen, die im Beobachtungszeitraum nicht abgeschlossen wird. Der Endwert liegt bei 1.9 mg/dl. Auffällig waren die Werte von Tier 3, welche ab dem 24. Tag auf 17.2 mg/dl wieder angestiegen waren. Die Verläufe der Tiere 3, 4 und 5 entsprechen dem des Medianes.

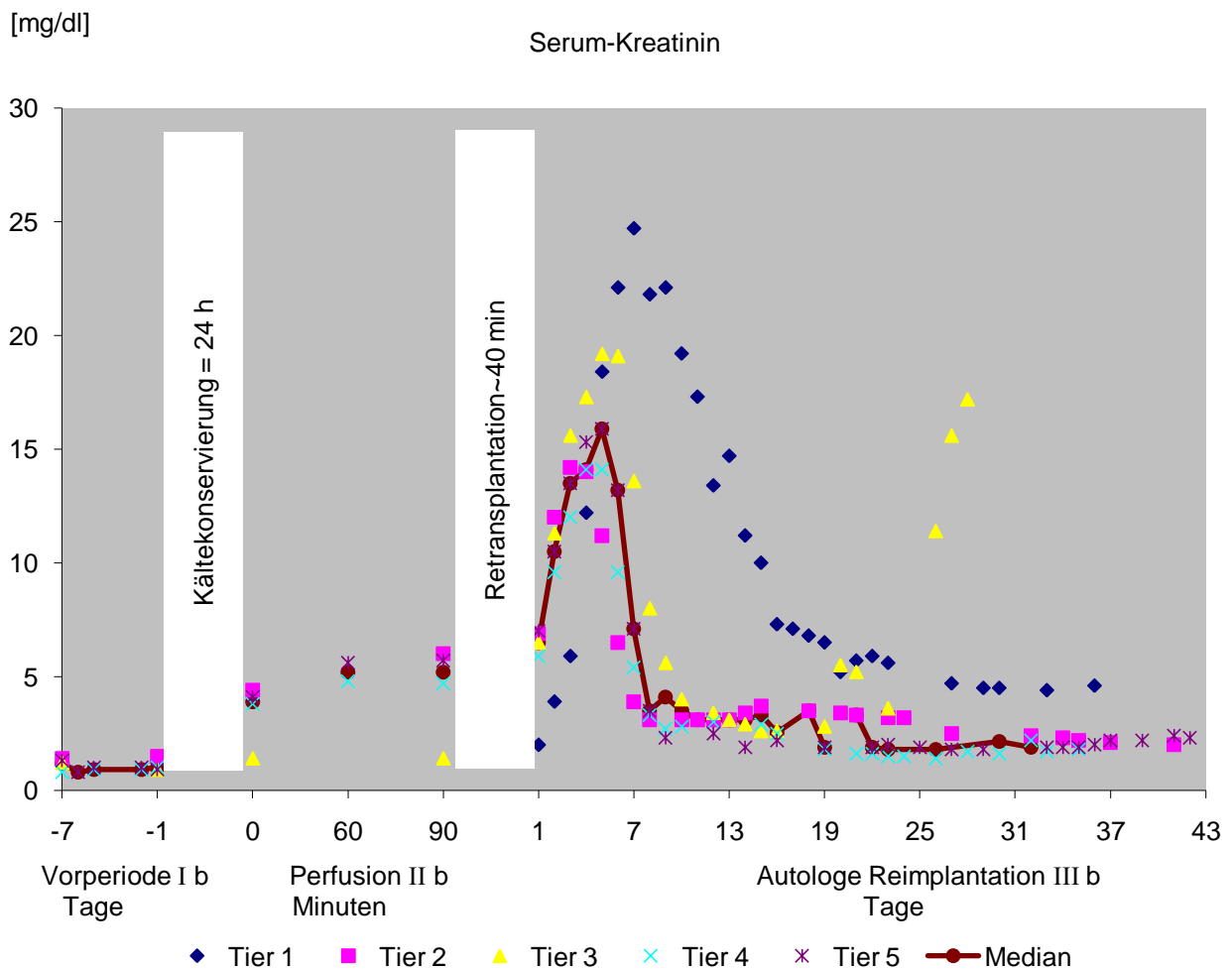


Abb. 6 Verlauf der Kreatininkonzentration im Serum während der Vorperiode I b,

Ergebnisse

Perfusion II b und Autologen Reimplantation III b

5.3.1.2 Kreatinin-Clearance/10 kg

In der Vorperiode I b wurde für die renale Kreatinin-Clearance am 7. ein Median 41.3 und am 1. von 47.1 ml/ min/ 10 kg gemessen. Während der Perfusion II b betrug der Median bei 0 Min. 0 nach 60 Min 0.43 und nach 90 Min. 5.75 ml/ min. Nach autologer Reimplantation III b steigt die Clearance ab dem 2. post-Op Tag von 0.27 ml/min/10 kg bis zum 9. post-Op Tag auf 10.2 ml/min/10 kg an. Auffällig ist ein Abfall auf 4.9 ml/min/10 kg am 12. post-Op Tag. Der folgende Anstieg auf 29.5 ml/ min/ 10 kg dauert zum 32. post-Op Tag ein. Mit der reimplantierten Einzelniere kann damit der physiologische Ausgangswert gemessen in der Vorperiode bezogen auf eine Niere ($47.1 \text{ ml/min/10kg} \times \frac{1}{2}$) erreicht werden. Auffällig ist, daß bei Tier 1 die Kreatinin-Clearance am 7. post-Op Tag mit einem Wert von 0.79 ml/ min/10 kg einsetzt und die Werte deutlich unterhalb des Median verlaufen. Die Werte der Tiere 2, 3, und 4 nehmen den gleichen Verlauf wie die Mediane ein. Von Tier 3 liegen ab dem 28. post-Op Tag keine Werte mehr vor

[ml/min]

Kreatininclearance /10kg

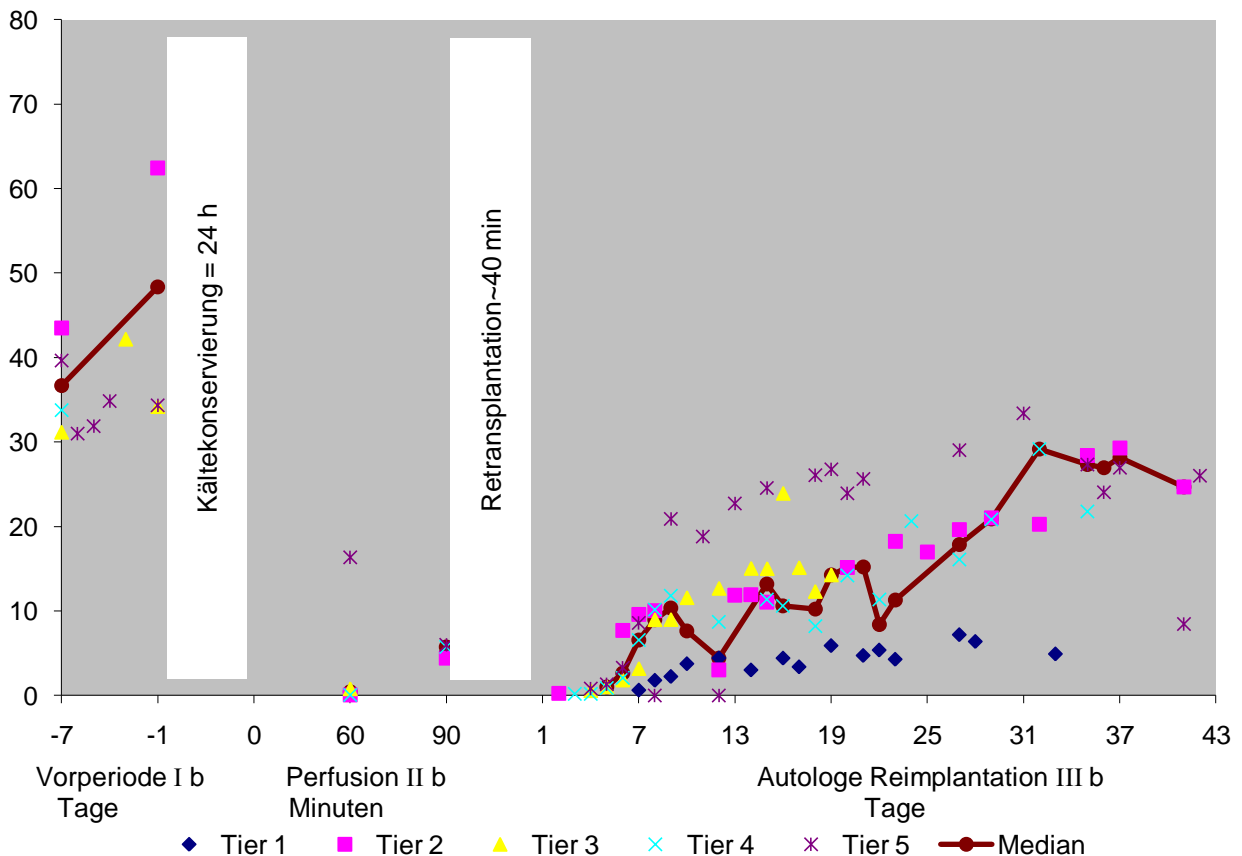


Abb. 7 Verlauf der Kreatinin-Clearance/10 kg während der Vorperiode I b,

Ergebnisse

Perfusion II b und Autologen Reimplantation III b 5.3.1.3 Harnstoff-Konzentration im Serum

Während der Vorperiode I wurde am 7. und am 1. Tag ein Median von 21 und 23 mg/dl gemessen. Während der Perfusion II b betrug der Median bei 0 Min. 7 nach 60 Min 2 und nach 90 Min. 3 mg/ dl.

Nach autologer Reimplantation III b steigt die Konzentration bei allen Tieren (5. post-Op Tag auf 236 mg/dl). Bis zum 27. post-Op Tag fallen die Konzentrationen dann auf 45 mg/dl ab. Ab diesem Zeitpunkt ist die Anpassungsphase anzunehmen. Der Medianwert an diesem Tag beträgt 19 mg/dl und erreicht damit auch den physiologischen Ausgangswert der Vorperiode.

Auffällig ist, daß Tier 1 das Maximum erst am 7. post-Op Tag mit 236 mg/dl, zwei Tage später als der Median, erreicht.

Die Verläufe der Tiere 3, 4 und 5 entsprechen ungefähr dem des Median. Die Harnstoffwerte von Tier 3 steigen ab dem 24. Tag auf 400 mg/dl wieder an.

[mg/dl]

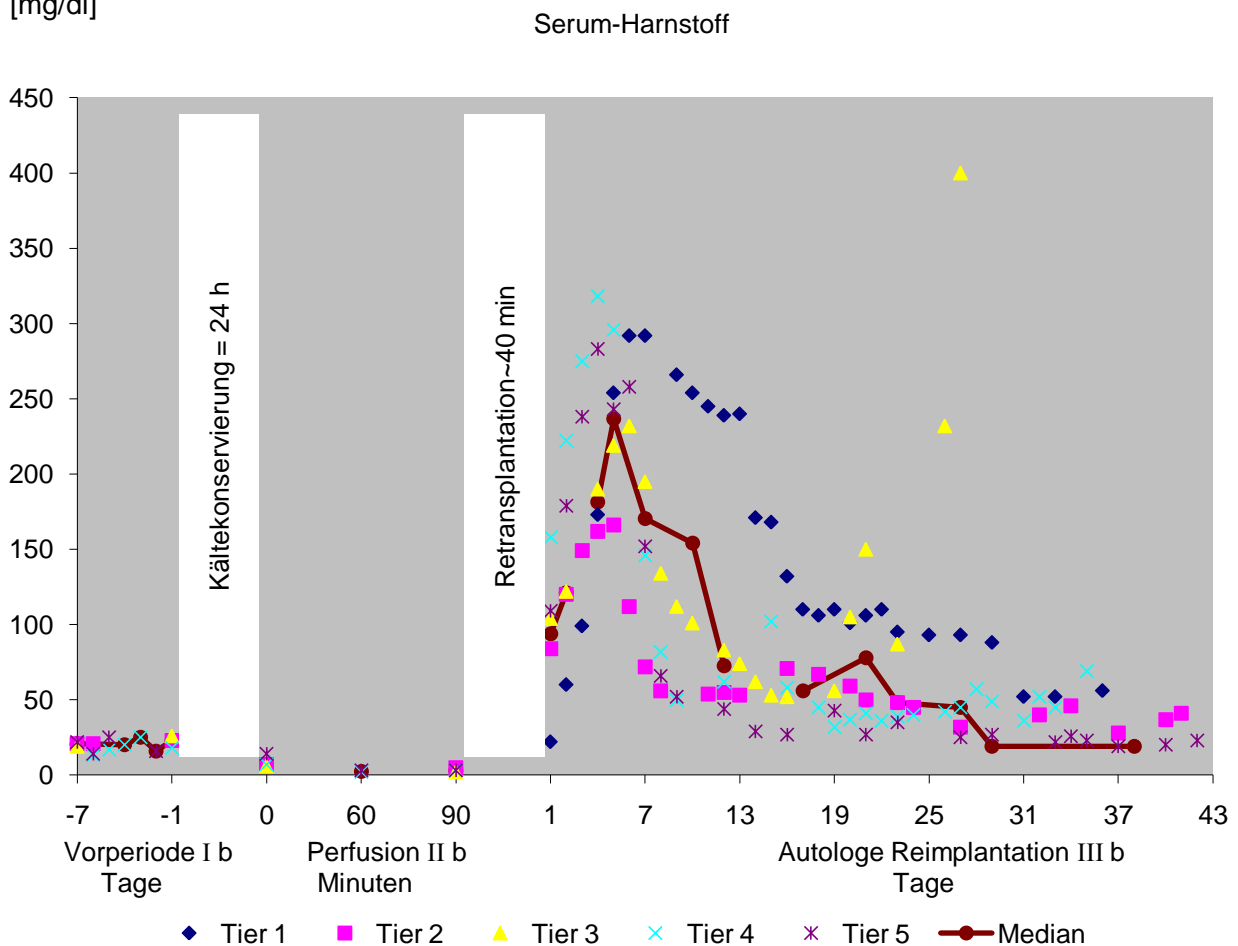


Abb. 8 Verlauf der Harnstoffkonzentration im Serum während der Vorperiode I b, Perfusion II b und Autologen Reimplantation III b

5.3.1.4 Harnstoff-Clearance/10 kg

Während der Vorperiode I b liegt der Median am 7. bis zum 1. Tag zwischen 20 und 29 ml/min. Während der Perfusion II b fand keine Harnstoffclearance statt.

Nach autologer Reimplantation III b beginnt der Verlauf der Mediane am zweiten Tag nach mit einem Wert von 0.37 ml/min und steigt bis zum 23. post-Op Tag auf 12 ml/min an. Dieser Anstieg unterliegt erheblichen Schwankungen die durch einen wechselnden postoperativen Proteinmetabolismus bedingt sind (Maximum 11 ml/min 21. post-Op Tag und Minimum, 4 ml/min, 8. post-Op Tag). Die Anpassungsphase wird offensichtlich ab dem 29. post-Op Tag erreicht. Mit der reimplantierten Einzelniere können physiologische Werte in der Beobachtungszeit nicht erreicht werden. Auffällig ist, daß bei Tier 1 die Harnstoff-Clearance erst am 7. post-Op Tag mit einem Wert von 0.56 ml/min einsetzt. Die Werte liegen deutlich unterhalb den Medianen. Die Tiere 2, 3, und 4 nehmen einen dem Median ähnlichen Verlauf ein. Von Tier 3 liegen ab dem 28. post-Op Tag keine Werte mehr vor.

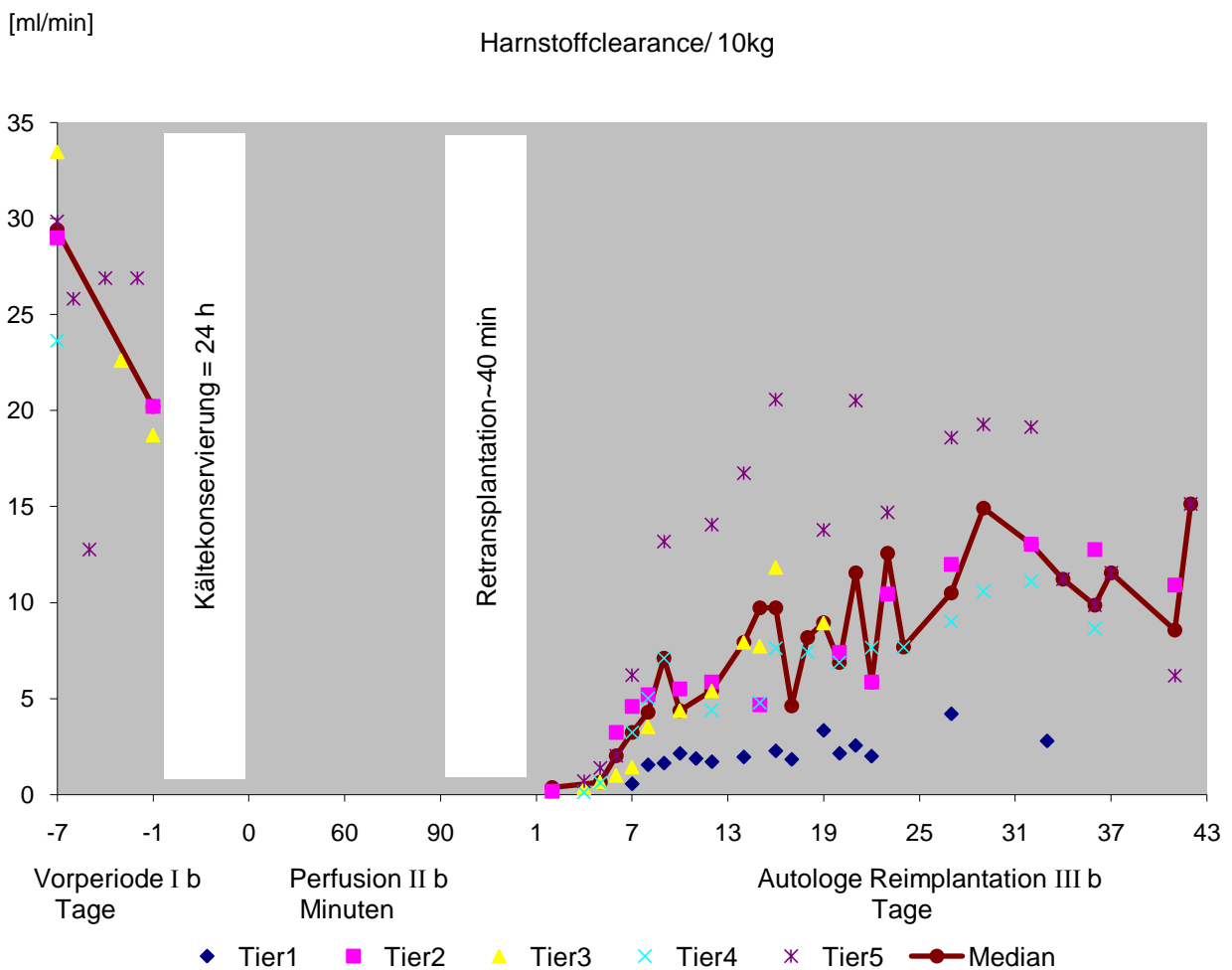


Abb. 9 Verlauf der Harnstoff-Clearance/10 kg während der Vorperiode I b, Perfusion II b und Autologen Reimplantation III b

5.3.1.5 Protein-Konzentration im Urin

Während der Vorperiode I b beträgt der Median am 7. 0.45 und am 1. Tag und 0.16 g/dl. Während der Perfusion II b beträgt der Median bei 0 Min. 7 nach 60 Min 2 und nach 90 Min. 3 mg/ dl.

Nach autologer Reimplantation III b beginnt der Median am 2. Tag mit 0.88 mg/dl und fällt bis zum 13. post-Op Tag auf 0.115 g/dl ab. Im anschließenden Zeitabschnitt pendeln die Werte zwischen 0.07 und 0.45 g/dl. Der physiologische Bereich wird ab dem 28. post-Op Tag erreicht. Der Endwert ist 0.26 g/dl.

Auffällig ist, daß Tier 1 am 6. post-Op Tag ein Maximum von 0.69 g/dl auf. Tier 3 weist am 6. post-Op Tag ein Maximum von 1.42 g/dl auf und fällt bis zum 14. Tag auf eine Konzentration von 0.12 g/dl ab.

Die Protein-Konzentrationen von Tier 4 und 5 verlaufen mit dem Median.

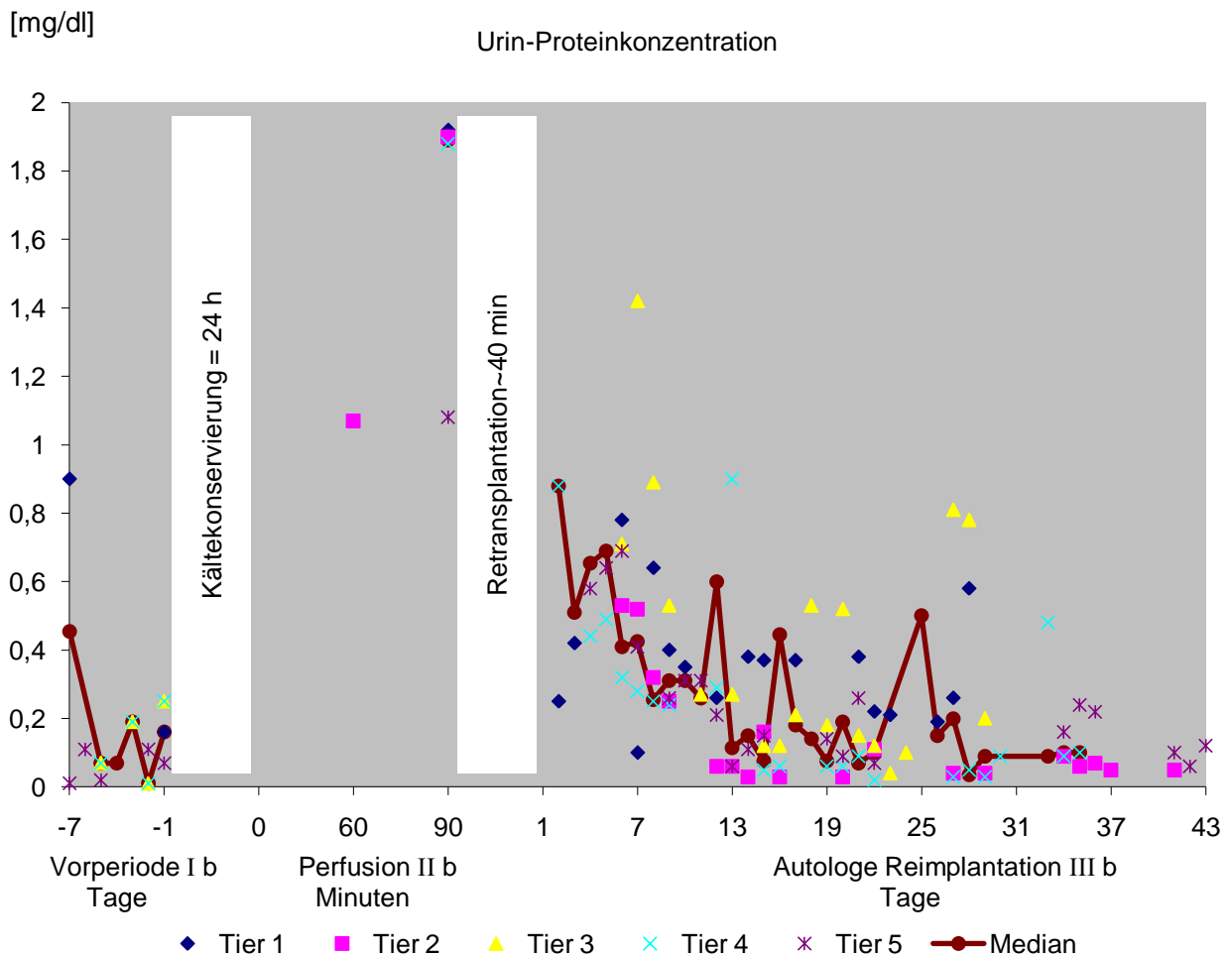


Abb. 10 Verlauf der Protein-Konzentration im Urin während der Vorperiode I b, Perfusion II b und Autologen Reimplantation III b

5.3.1.6 Proteinkonzentration im Serum

Während der Vorperiode I b beträgt der Median am 7. 6.1 und am 1. Tag und 5.9 g/dl.

Während der Perfusion II b beträgt der Median bei 0 Min. 3.9 nach 60 Min 3 und nach 90 Min. 3.3 g/ dl.

Nach autologer Reimplantation III b steigt die Konzentration bis zum 6. post-Op Tag auf 5.75 g/dl. Vom 7. bis zum 27. post-Op Tag erreichen die Protein-Konzentrationen im Serum die physiologischen Ausgangswerte von 6.1 g/dl bis 6.95 g/dl. Auffällig ist der Kurvenverlauf von Tier 3, welcher bis zum 23. Tag mit dem Median verläuft und dann bis zum 28. Tag auf 9.1 g/dl ansteigt. Der Verlauf von Tier 4 und 5 ist dem Median gleich.

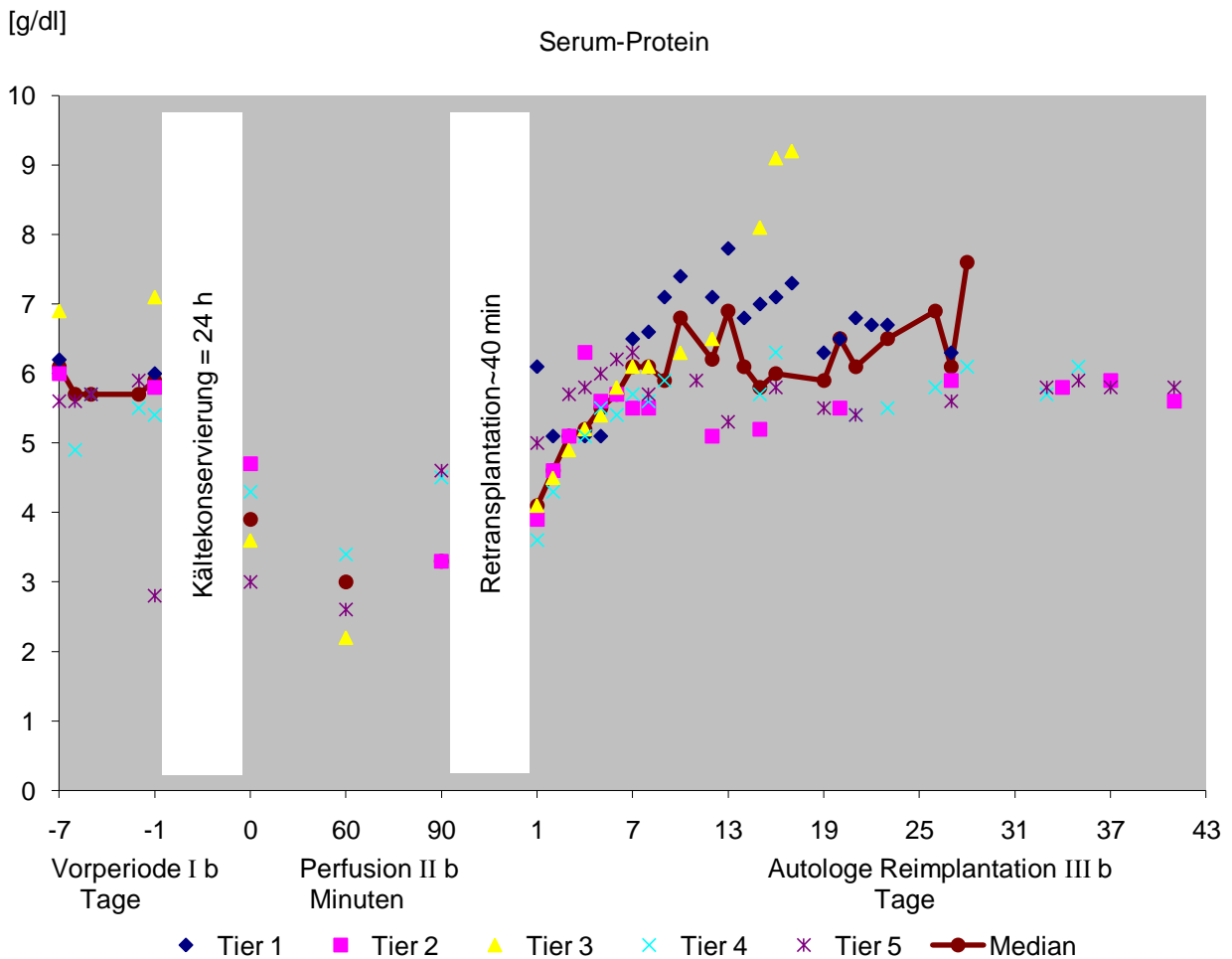


Abb. 11 Verlauf der Protein-Konzentration im Serum während der Vorperiode I b, Perfusion II b und Autologen Reimplantation III b

5.1.3.7 Harnstoff-Ausscheidung /10 kg

Während der Vorperiode I b liegt der Median am 7. bis zum 1. Tag zwischen 6 und 4.5 mmol/24h/10kg. Die Harnstoffausscheidung wurde während der Perfusion nicht bestimmt.

Nach autologer Reimplantation III b steigt die Ausscheidung bis zum 10. post-Op Tag auf 6.64 mmol/24 h/10kg. Der Endwerte des Median liegt bei 1.92 mmol/24h/10 kg. Der Wert liegt unterhalb der physiologischen Bandbreite.

Auffällig ist, daß die Harnstoff-Ausscheidung bei Tier 1 erst am 7. post-Op Tag mit einem Wert von 2.02 mmol/10kg/24h einsetzt. Die Werte liegen deutlich unterhalb den Medianen. Die Tiere 2, 3, und 4 nehmen einen dem Median ähnlichen Verlauf ein. Von Tier 3 liegen ab dem 28. post-Op Tag keine Werte mehr vor.

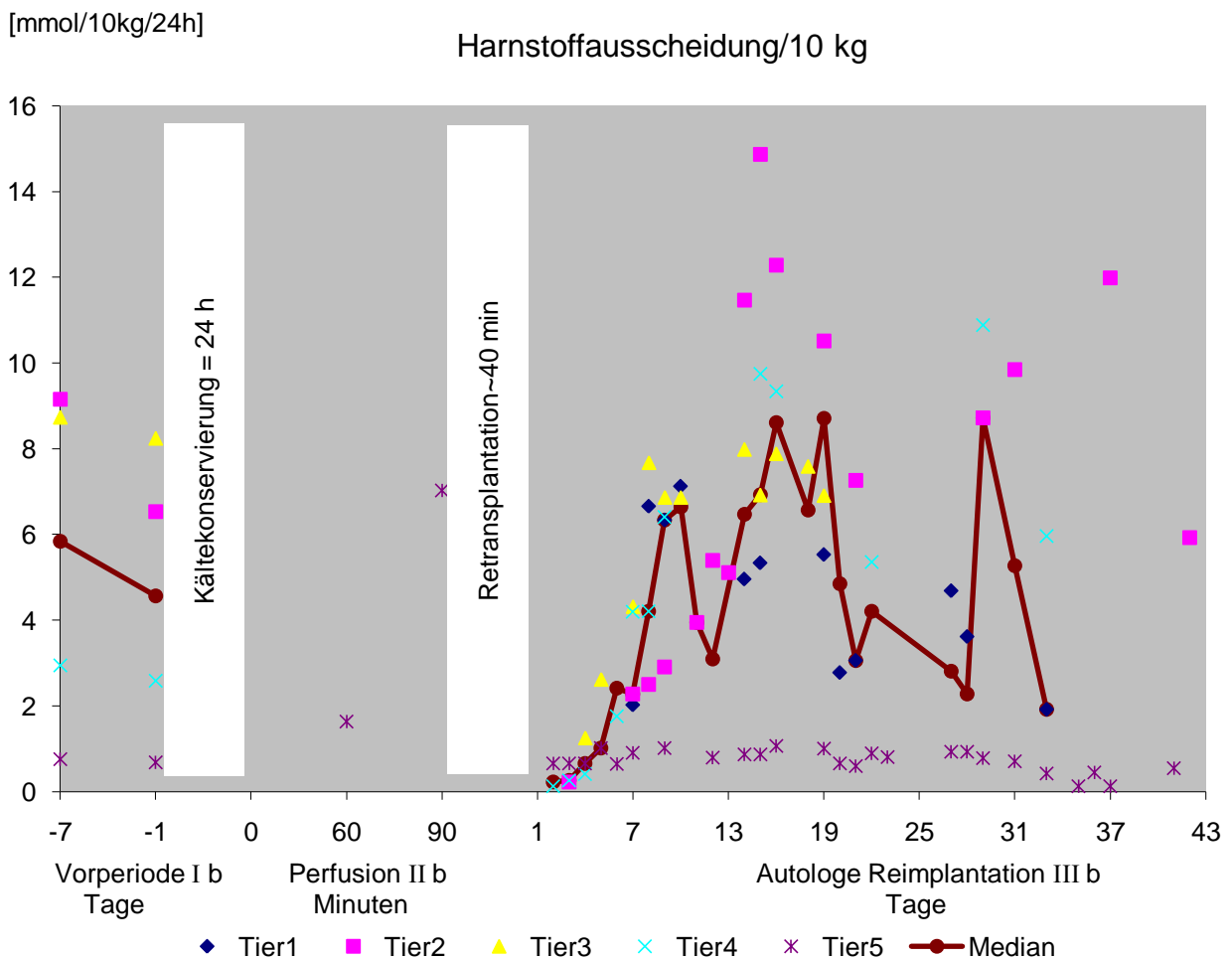


Abb. 12 Verlauf der Harnstoff-Ausscheidung /10 kg während der Vorperiode I b, Perfusion II b und Autologen Reimplantation III b

5.3.2 Tubuläre Funktion: Elektrolyte

5.3.2.1 Resorptionsfraktion-Natrium (RF_{Na^+})

Während der Vorperiode I b wurde ein Median der RF_{Na^+} am 7. und am 1. Tag von 0.998291 bzw. 0.9970 ermittelt.

Während der Perfusion II b beträgt der Median bei 0 Min. 0 nach 60 Min 0,4 und nach 90 Min. 0,3.

Nach autologer Reimplantation III b fallen die Werte im Vergleich zur Vorperiode deutlich ab. Der Wert liegt am dritten Tag bei einem Wert von 0.719 und steigt bis zum sechsten Tag auf 0.976. Danach ist die Reparaturphase anzunehmen. Vom 7. bis zum 37. Tag erfährt die RF_{Na^+} einen weiteren Anstieg von 0.993 auf schließlich 0.999. Der Endwerte der Mediane am 42. post-Op Tag hat mit 0.993 den physiologischen Bereich erreicht. Die Tiere 1, 3, 4, 5 nehmen einem dem Median ähnlichen Verlauf ein.

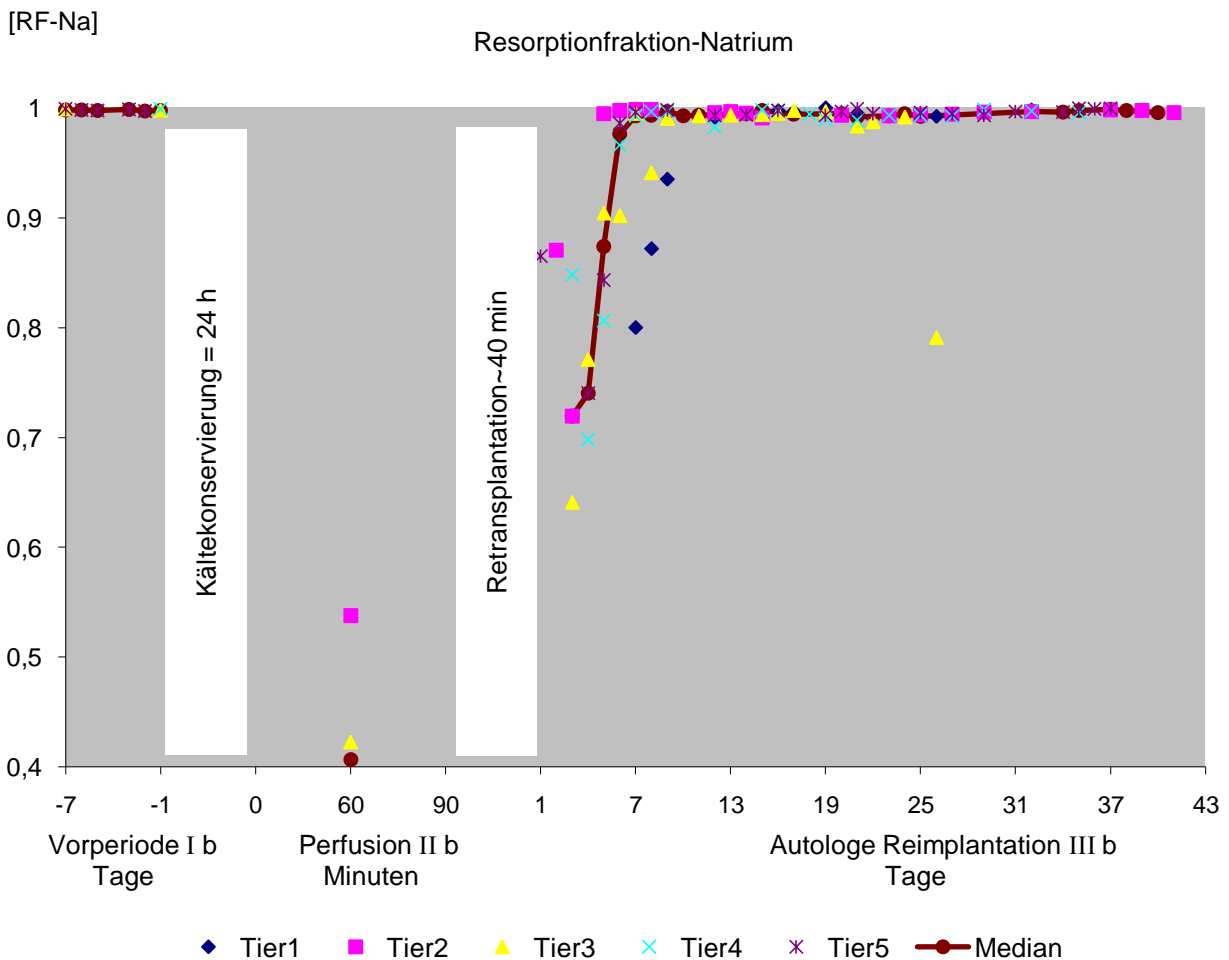


Abb. 13 Verlauf der Resorptionsfraktion-Natrium während der Vorperiode I b, Perfusion II b und Autologen Reimplantation III b

5.3.2.2 Natriumkonzentration im Urin

Während der Vorperiode I b beträgt der Median am 7. und am 1. Tag vor dem Eingriff 10 und 26 mmol/l.

Während der Perfusion II b beträgt der Median bei 60 Min. 118 nach 90 Min 134 mmol/l.

Nach autologer Reimplantation III b steigen die Konzentrationen im Vergleich zur Vorperiode bis zum 4. post-Op Tag auf 63 mmol/l stark an. Bis zum 8. post-Op Tag fallen die Werte auf 9 mmol/l ab. Der Beginn der Reparaturphase ist anzunehmen. Der physiologische Bereich der Natriumbilanz und damit eine Stabilität ist etwa ab dem 8. Post-Op-Tag anzunehmen. Der Endwert der Mediane am 42. post-Op Tag beträgt 14 mmol/l. Auffällig ist bei Tier 2 am 3. post-Op Tag ein Maximum der Na⁺-Konzentrationen von 80 mmol/l.

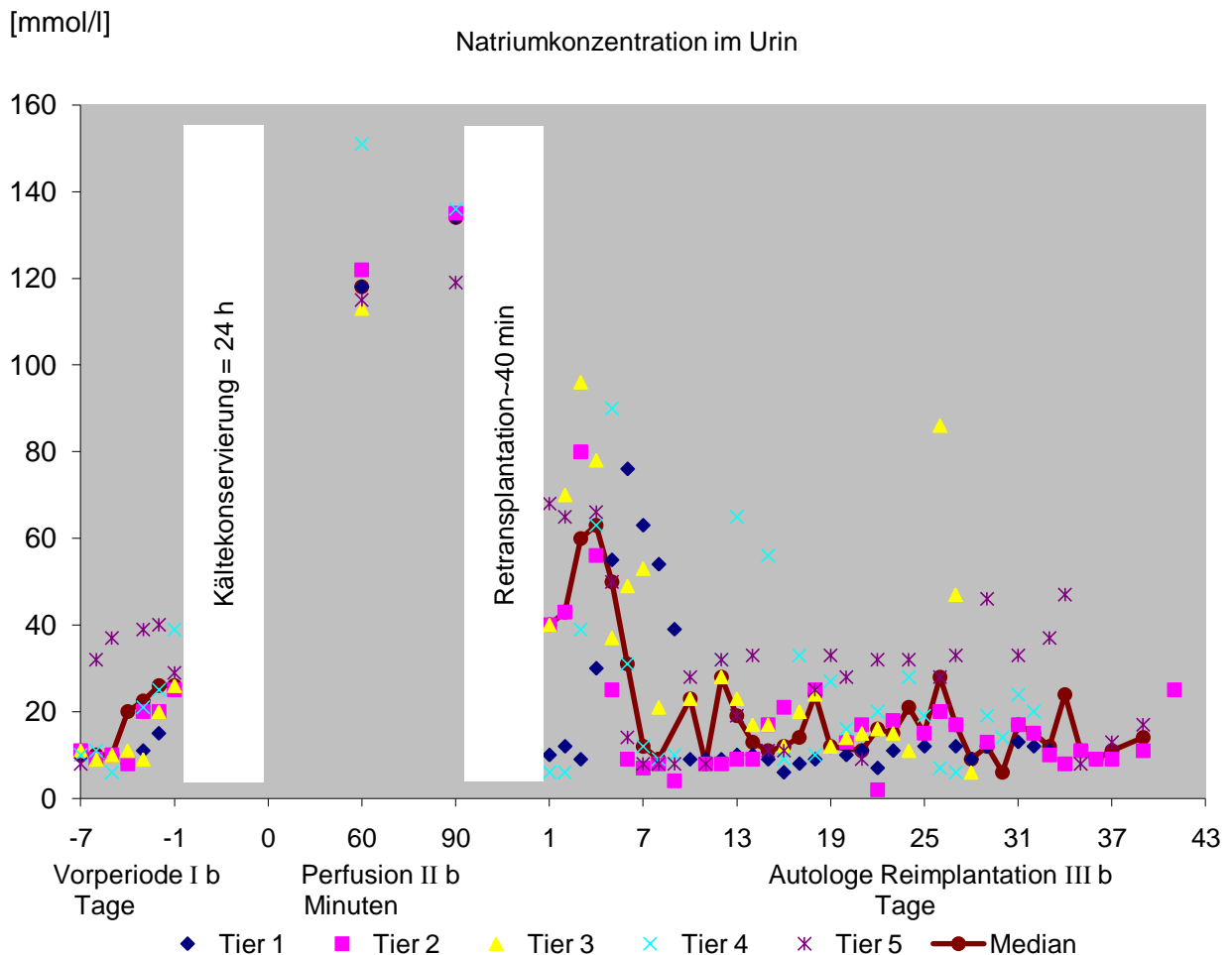


Abb. 14 Verlauf der Natriumkonzentration im Urin während der Vorperiode I b, Perfusion II b und Autologen Reimplantation III b

5.3.2.3 Natriumausscheidung im Urin

Während der Vorperiode I b beträgt der Median am 7. und am 1. Tag vor dem Eingriff 26.7 mmol/24h und 78.7 mmol/24h.

Während der Perfusion II b beträgt der Median bei 0 Min. 0 nach 60 Min 358 und nach 90 Min. 3427 mmol/24h. Auffällig waren hier die starken Schwankungen zwischen 21 mmol/24 h (Tier 2 nach 90 Min.) und 3916 mmol/24 h (Tier 5 nach 90 Min.) der Konzentrationen.

Nach autologer Reimplantation III b waren die Konzentrationen im Vergleich zur Vorperiode gefallen (3. post-Op Tag 33.46 mmol/24 h). Der Endwert am 42. post-Op Tag ist 25 mmol/24h und entspricht damit dem physiologischen Wert in der Vorperiode. Tier 1 verläuft mit 166.4 mmol/24h (8. post-Op Tag) zunächst deutlich oberhalb des Median, dann liegen die Werte unterhalb des Median. Die Kurvenverläufe der Tiere 2,3,4 und 5 sind dem Median angeglichen.

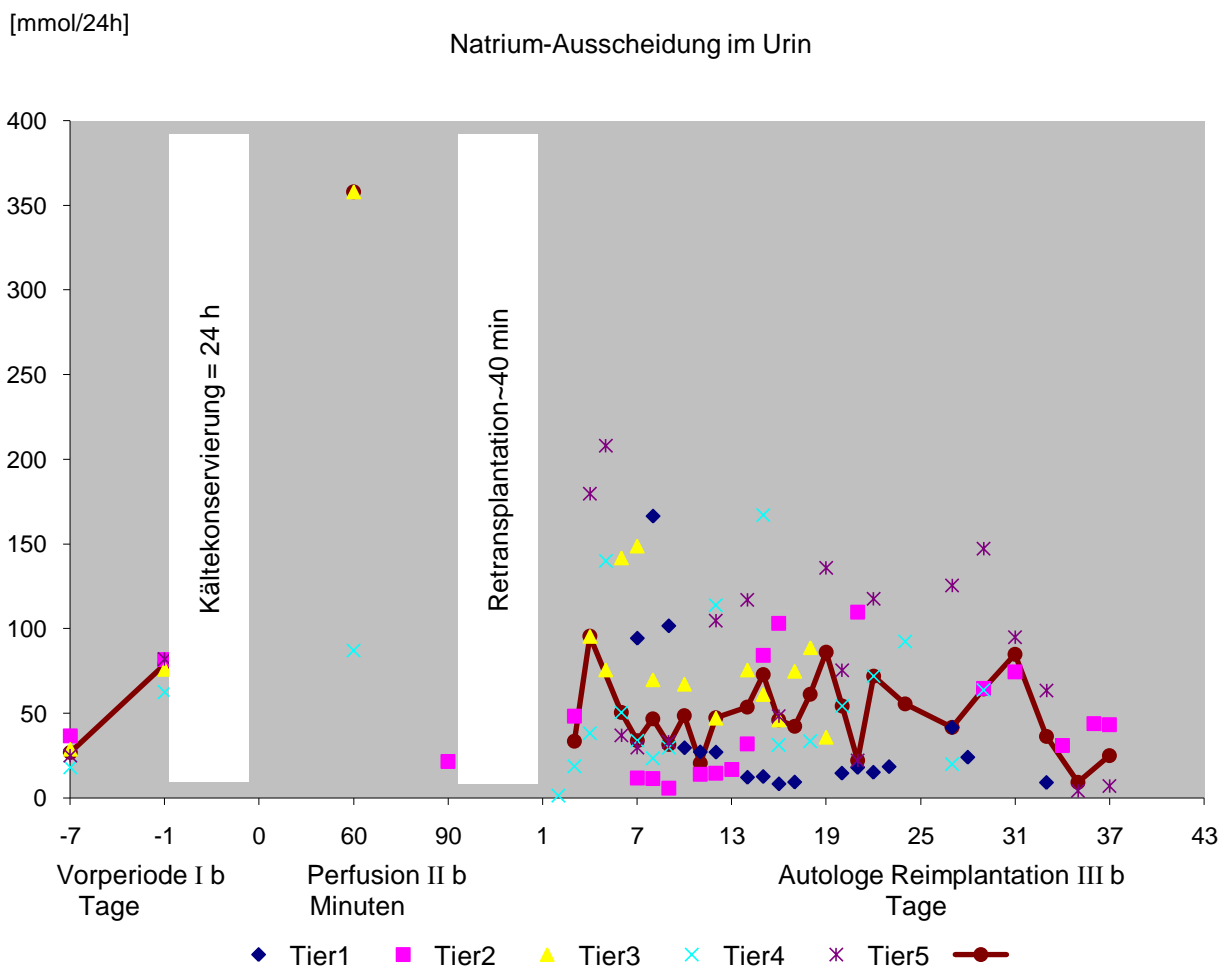


Abb. 15 Verlauf der Natriumausscheidung im Urin während der Vorperiode I b, Perfusion II b und Autologen Reimplantation III b

5.3.2.4 Kaliumkonzentration im Urin

Während der Vorperiode I b beträgt der Median am 7. und am 1. Tag vor dem Eingriff 110 und 62 mmol/l.

Während der Perfusion II b beträgt der Median nach 60 Min. 10 nach 90 Min 6 mmol/l. Nach autologer Reimplantation III b fällt die Konzentration bei allen Tieren stark ab. Der Verlauf der Mediane beginnt am zweiten Tag nach mit einem Wert von 25 mmol/l und steigt bis zum 32. post-Op Tag auf 77 mmol/l. Eine eigentliche Reparaturphase ist nicht abgrenzbar. Der Anstieg unterliegt starken Schwankungen. Der Endwert der Mediane am 42. post-Op Tag ist 77 mmol/l. Die physiologische K^+ -Konzentration im Urin wird damit am Ende der Beobachtungszeit erreicht.

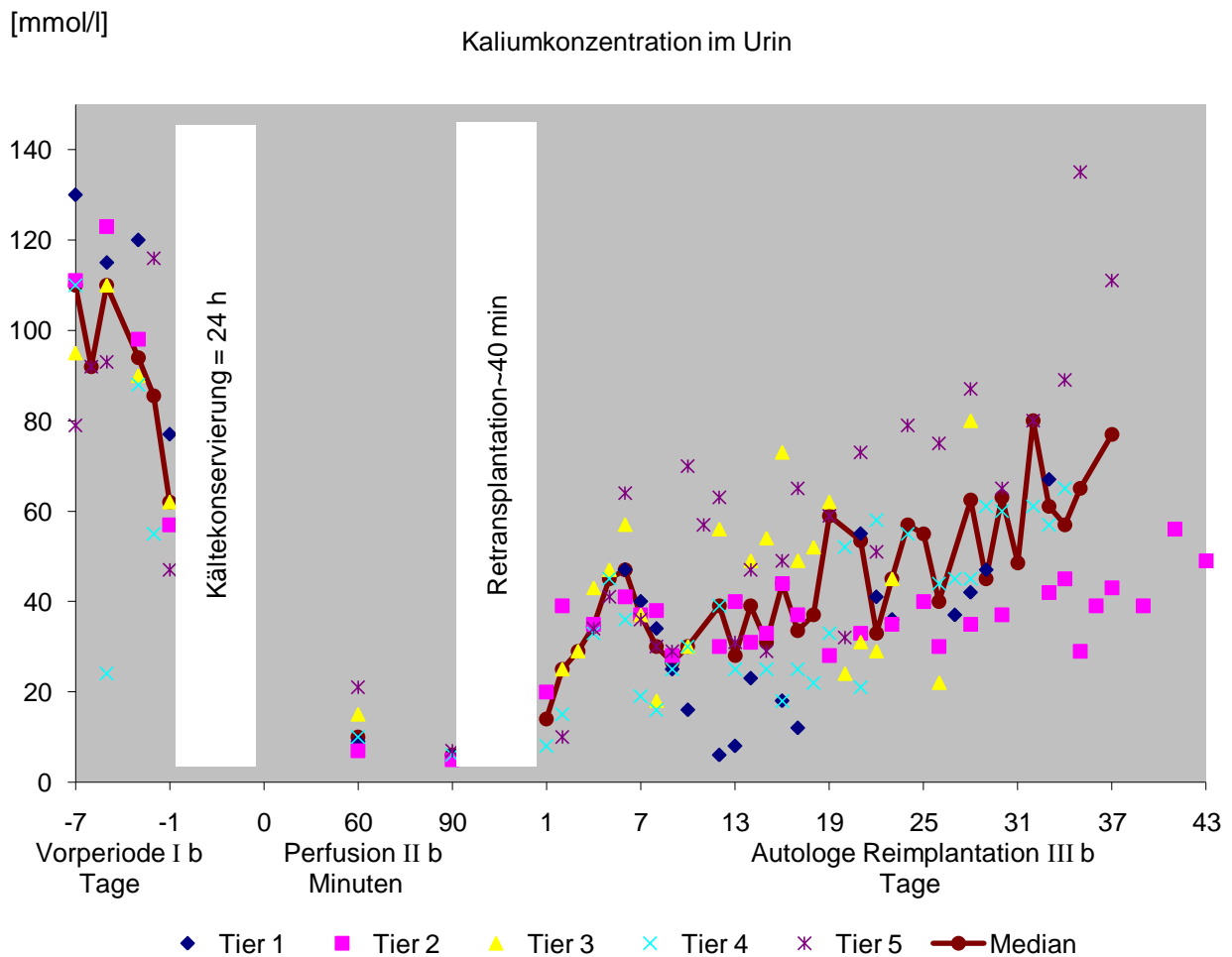


Abb. 16 Verlauf der Kaliumkonzentration im Urin während der Vorperiode I b, Perfusion II b und Autologen Reimplantation III b

5.3.3 Renale Osmoregulation

5.3.3.1 Diurese

Während der Vorperiode I b beträgt der Median am 7. und am 1. Tag vor dem Eingriff 2 ml/min.

Während der Perfusion II b beträgt der Median nach 60 Min. 1,3 nach 90 Min 21 ml/min. Auffällig ist die hohe Diureserate von 24 mmol/l bei Tier 3 nach 60 Min.

Nach autologer Reimplantation ist die Diurese für 3 Tage oligo-anurisch (3. post-Op Tag 0.85 ml/min). Ein Anstieg erfolgt dann bis zum 14. post-Op Tag auf 3.05 ml/min. Dieser Zeitraum entspricht der Reparaturphase. Danach ist eine Stabilität anzunehmen. Der Endwert ist 2.7 ml/min. Die Diurese am Ende der Beobachtungszeit ist im Vergleich zur Vorperiode leicht polyurisch.

Auffällig ist, daß die Diurese bei Tier 1 erst am 7. post-Op Tag einsetzt. Der Verlauf von Tier 2, 3, 4 und 5 ist dem Median gleich.

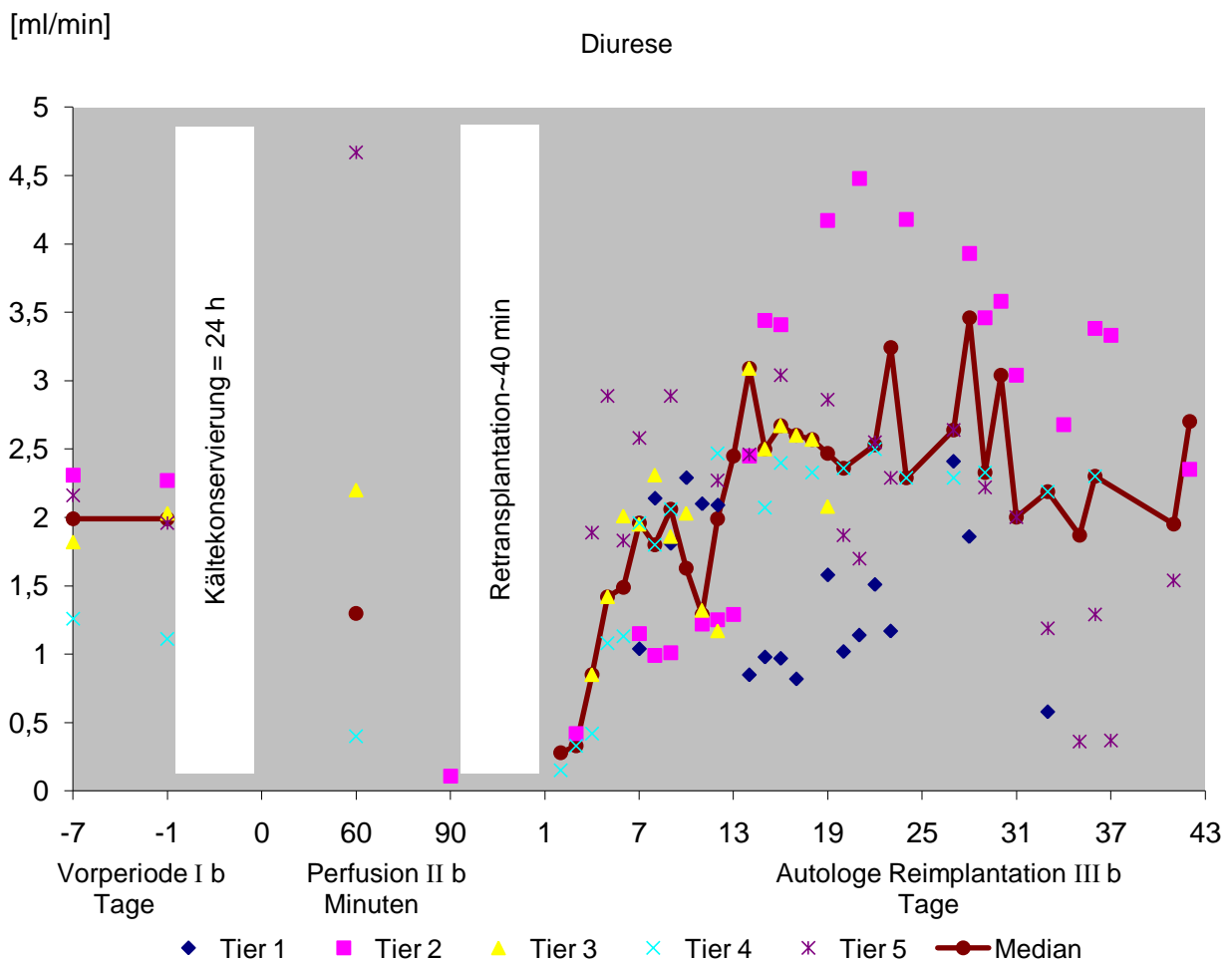


Abb. 17 Verlauf der Diurese während der Vorperiode I b, Perfusion II b und Autologen Reimplantation III b

5.3.3.2 Plasma-Osmolalität

Während der Vorperiode I b beträgt der Median am 7. und am 1. Tag vor dem Eingriff jeweils 291 mosm/kg.

Während der Perfusion II b beträgt der Median bei 0 Min. 385 nach 60 Min 297 mosm/kg und nach 90 Min 298 mosm/kg.

Nach autologer Reimplantation III b steigt Osmolalität im Vergleich zur Vorperiode auf 325 mosm/kg (5. post-Op Tag). Bis zum 8. post-Op Tag fällt der Median auf 301 mosm/kg. Dieser Zeitpunkt entspricht dem Beginn der Reparaturphase. Die Plasmaosmolalität unterliegt relativ geringen Schwankungen und hält sich bis zuletzt auf gleichem Niveau, ca. 10 mosm/kg über den Ausgangswerten. Physiologische Werte der Vorperiode werden am Ende der Beobachtungszeit nicht erreicht. Die Plasma-Osmolalität von Tier 3 steigt bis zum 28. Tag auf 345 mosm/kg an. Der Verlauf von Tier 2, 4 und 5 ist dem Median gleich.

[mosm/kg]

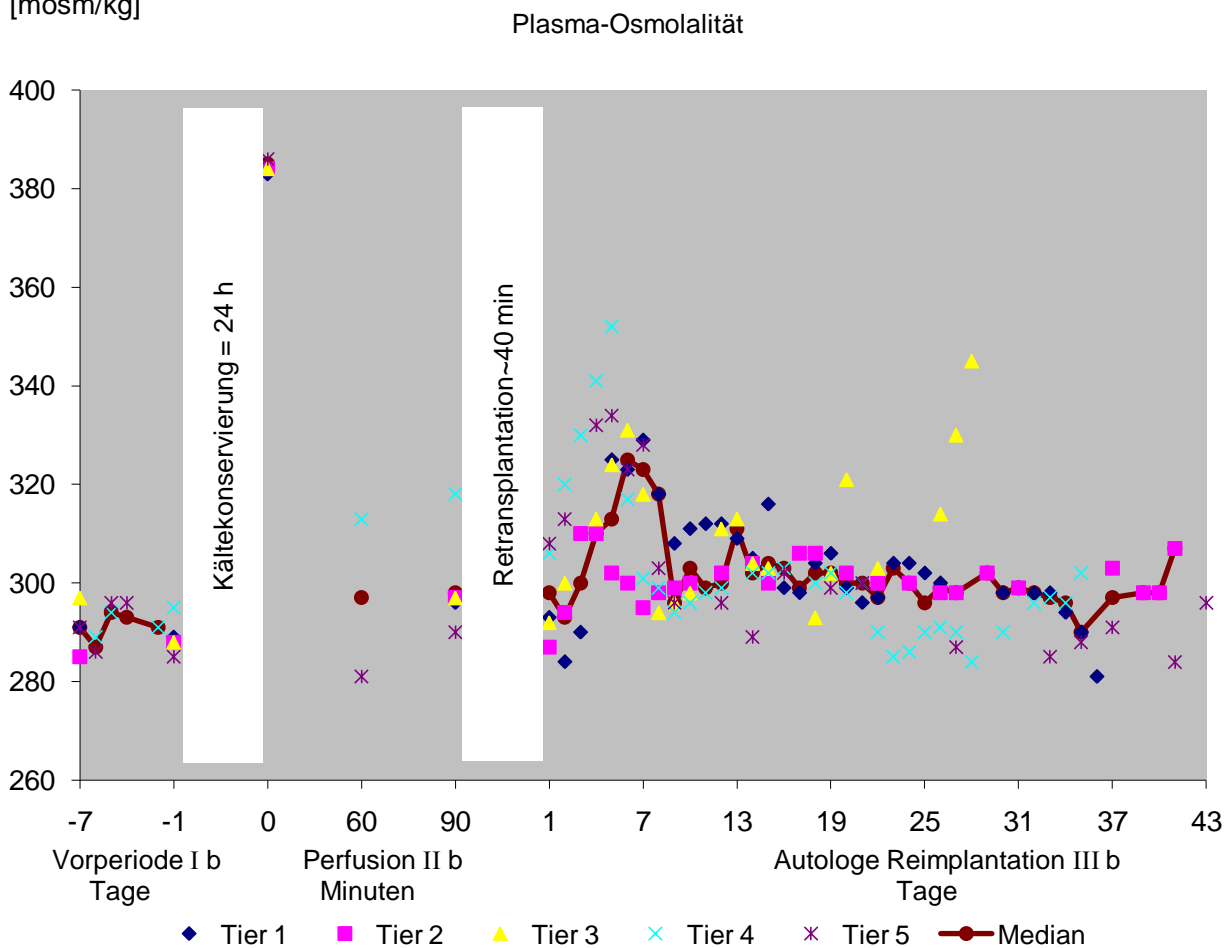


Abb. 18 Verlauf der Plasma-Osmolalität während der Vorperiode I b, Perfusion II b und Autologen Reimplantation III b

5.3.3.3 Urin-Osmolalität

Während der Vorperiode I b beträgt der Median am 7. und am 1. Tag vor dem Eingriff 461 und 506 mosm/kg.

Während Perfusion II b beträgt der Median beträgt 60 Min 345 mosm/kg und nach 90 Min 317 mosm/kg.

Nach autologer Reimplantation III b sinkt die Osmolalität im Urin bei allen Tieren (Median 2. post OP-Tag 276 mosm/kg). Zwischen dem 8. und 23. post-Op Tag pendeln die Werte innerhalb des Bereichs von 187 bis 315 mosm/kg. In diesem Zeitraum ist die Reparaturphase anzunehmen. Ein physiologischer Wert stellt sich am Ende Beobachtungszeit ein. Der Endwert ist 500 mosm/kg.

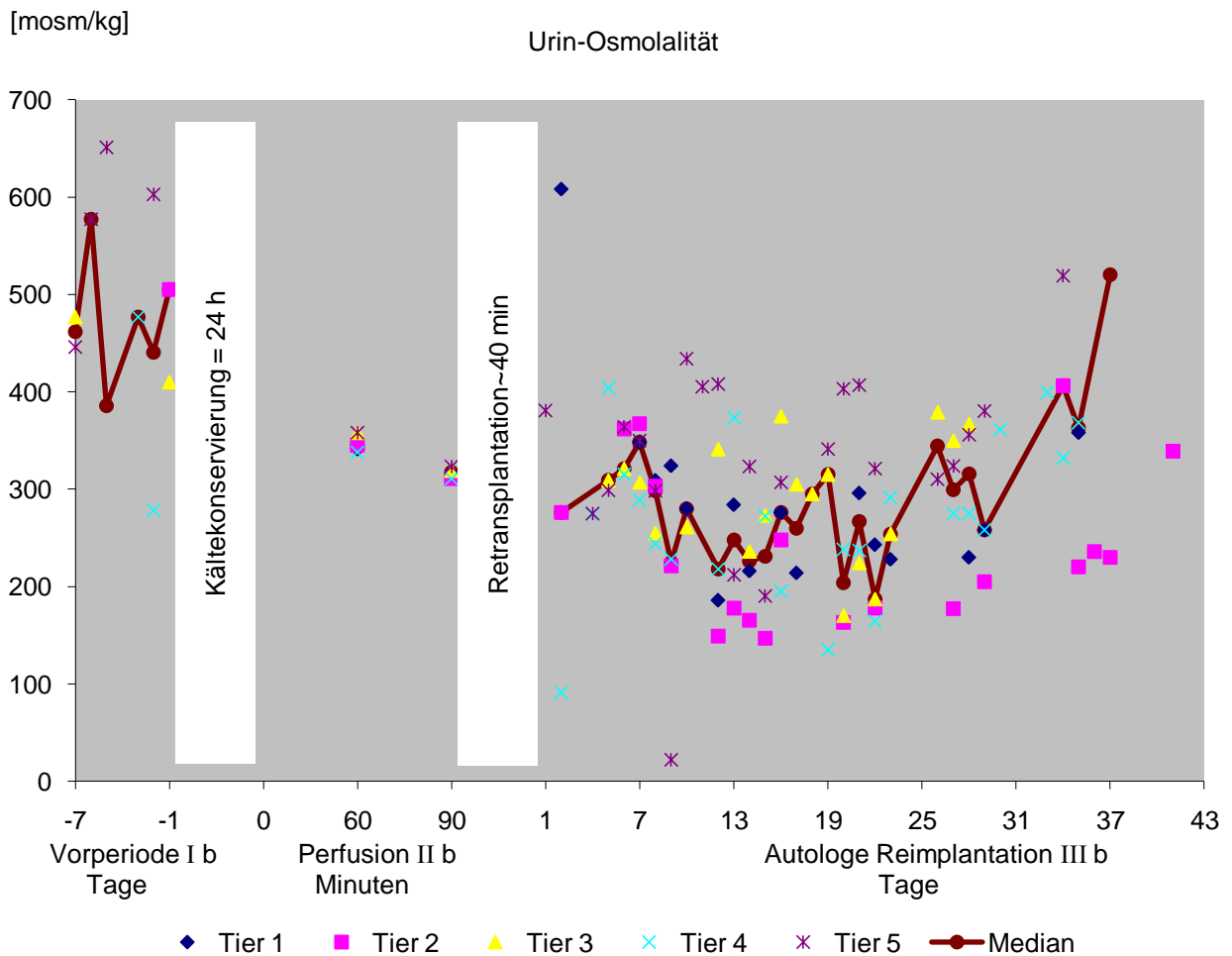


Abb. 19 Verlauf der Urin-Osmolalität während der Vorperiode I b, Perfusion II b und Autologen Reimplantation III b

5.4 Reimplantation isolierter perfundierter Schweinenieren ohne vorangehende Kältekonservierung¹

Die Ergebnisse aus dem Versuchsprotokoll ohne 24 h Kältekonservierung. Die nierenphysiologischen Parameter unter der Hämoperfusion sowie nach autologer Reimplantation können direkt verglichen werden. Versuchsaufbau, benützte Lösungen und Austauschmodule unterschieden sich nicht.

5.4.1 Renale Hämodynamik während Hämoperfusion

Tabelle 2

Parameter	Beginn Hämoperfusion	Ende Hämoperfusion
[Dimension]		
Zirkulierendes Blutvolumen [ml]	300	300
Blutfluss [ml/ min]	50	100
Afferenter Blutdruck [mmHg]	100	120
Hämodynamischer Widerstand ¹ [kPa sec ml ⁻¹] pro Niere	15.9 5.3 fach erhöht	9.5 3.1 fach erhöht

Tabelle 2. Parameter der renalen Hämodynamik zu Beginn und am Ende der der Ex-vivo-Hämoperfusion aus dem Versuchsprotokoll ohne 24 h Kältekonservierung II a mit autologem dialysierten und durch Gasaustausch arterialisiertem Vollblut. Errechnet sind die Medianwerte der renalen Hämodynamik. Zahl der Tiere N = 6.

¹Der physiologische Wert des realen hämodynamischen Widerstand beträgt 3.02 kPa sec ml⁻¹ pro Fiere.

Das zirkulierende Blutvolumen hat sich nicht geändert.

Der Blutfluss hat infolge eines abnehmenden hämodynamischen Widerstandes von 50 auf 100 ml/min zugenommen

Der Blutdruck konnte von 100 mmHg auf 120 mmHg gesteigert werden.

In der Serie ohne Kältekonservierung war der initiale Gefäßwiderstand 5-fach höher. Am Ende der Hämoperfusion lag er 3-fach über der Norm.

¹ Teil der Dissertation U. Hennen FU-Berlin 2000

5.4.2 Nierenfunktion während Hämoperfusion

Tabelle 3

Parameter [Dimension]	Vorperiode	Ende Hämoperfusion	Vergleich Vorperiode
Kreatinin Clearance [ml/ min]	49.3	6.9	14 %
RF _{Na⁺}	99.8	84.8	85 %
Na ⁺ im Urin [mmol/l]	21.5	90	4.2 fache
K ⁺ im Urin [mmol/l]	56	9	15.2 %
Diurese [ml/ min]	0.43	1.15	2.7 fache
U/P _{osmol}	1.70	0.76	44.8 %

Tabelle 3. Parameter der Ex-vivo-Nierenfunktion aus dem Versuchsprotokoll ohne 24 h Kältekonservierung II a während der Vorperiode und am Ende der Hämoperfusion mit autologem dialysierten und durch Gasaustausch arterialisiertem Vollblut. Errechnet sind die Medianwerte der Nierenfunktion. Zahl der Tiere N = 6.

Die glomeruläre Funktion war in der Serie ohne Kältekonservierung auf ~15 % der Norm eingeschränkt, was damit auch der hämodynamischen Situation entsprach.

Die RF_{Na⁺} ist in der Serie ohne Kältekonservierung auf 84.5 % eingeschränkt.

Die Urin-Natriumkonzentration ist 4.2 fach erhöht. Die Urin-Kaliumkonzentration entspricht nur 15.2 % der Vorperiode.

Es kam zu eine sofortigen Funktionsaufnahme der Nieren kenntlich am Einsetzen einer Diurese.

Die renale Osmoregulation zeigte eine isosthenurische Funktionslage während der Hämoperfusion.

5.4.3 Autologe Reimplantation ohne vorangehende Kältekonservierung

Tabelle 4

Parameter [Dimension]	Erhaltungsphase	Reparaturphase	21. Tag
Kreatinin im Serum [mg/dl]	Gipfel 2. Tag: 7.6 Schneller Abfall bis 8. Tag: 2.0	Stabilität ab 9.Tag: 2.2-1.7	1.85
Kreatinin-Clearance [ml/min/10 kg]	Beginn 2. Tag : 3.3 Schneller Anstieg bis 10. Tag : 18.2	Stabilität ab 11. Tag 11.8-19.0	17.2
Harnstoff im Serum [mg/dl]	Gipfel 2. Tag 169 Schneller Abfall bis 5. Tag: 56	Stabilität ab 7. Tag 43 - 56	45
Harnstoff-Clearance [ml/min/10 kg]	Beginn 1. Tag: 0.5 Schneller Anstieg bis 7. Tag: 50	Stabilität ab 8. Tag 32.5 - 43	39
RF _{Na} ⁺	Minimum 1. Tag 0.951	Stabilität ab 6. Tag 0.996 – 0.998	0.998
Na ⁺ im Urin [mmol/l]	Gipfel 4. Tag: 43.5 Schneller Abfall Bis 7. Tag:11.2	Stabilität ab 8. Tag 10 - 30	12
Na ⁺ -Ausscheidung [mmol/24 h]	Gipfel 4. Tag:100 Schneller Abfall bis 7. Tag 29	Stabilität ab 9. Tag 28 - 57	29
K ⁺ im Urin [mmol/l]	1. Tag: 53 Anstieg bis 7.Tag: 67	Stabilität ab 8. Tag: 39.5 – 90.2	77
Diurese [ml/min]	Beginn 1.Tag:0.6 Polyurie ⁺ ab 4.Tag	Stabilität ab 7. Tag: 1.38 - 1.9	2.0
Osmolalität i.U. [mosm/kg]	Minimum 1.Tag: 280 Isostenurie: bis 3. Tag	Schwankungen ab 10. Tag: 250 – 410	380
Serum-Protein [g/dl]	Minimum 1 .Tag 4.4	Stabilität ab 7. Tag: 6.0	5.70

Tabelle 4 Parameter der Nierenfunktion nach autologer Reimplantation aus dem Versuchsprotokoll ohne 24 h Kältekonservierung II a. Anhand der Medianwerte sind die Zeitbereiche der Erhaltungsphase und der Reparaturphase des akuten Nierenversagens sowie die Endwerte der Beobachtungszeit zusammengefasst. Zahl der Tiere N = 6.

⁺ Diurese > 2 ml/min

In dem Versuchsprotokoll II a wurde die Periode nach Reimplantation nur bis zum 21. post-Op Tag beobachtet. Von daher ist der Vergleich nur eingeschränkt durchführbar. Die Ergebnisse lassen aber Schlussfolgerungen zu.

Ergebnisse

Das Maximum des ANV beurteilt am Serum-Kreatinin lag ohne Kältekonservierung am 2. Tag bei 7.6 mg/dl. Ab diesem Zeitpunkt ist die Reparaturphase der glomerulären Funktion anzusetzen.

Beginn einer messbaren Kreatininclearance ohne Kältekonservierung ist am 2.Tag mit 5.8 ml/min/10kg Die Größenordnung der physiologische Kreatininclearance einer Niere (~25 ml/min/10 kg) als Markierung der beendigten Reparaturphase wird ohne Kältekonservierung am 9. Tag erreicht.

Die Harnstoffclearance ist zur Beurteilung der Phasen eines polyurischen Nierenversagens ungeeignet, da hier mehrere voneinander unabhängige Determinanten bestehen (Renale Parameter, glomeruläre Filtration, Rückresorption und meduläre Rezirkulation, metabolische Parameter, postoperativer Katabolismus). Prinzipiell bestehen aber analoge Verhältnisse wie bei der Kreatininclearance.

Die RF_{Na^+} ist bereits am 6. post-Op Tag wieder „physiologisch“.

Die Ausscheidung der Urin-Elektrolyte Natrium und Kalium können nicht zur Beurteilung der Reparaturphase herangezogen werden, da intrarenale Kompensationsmechanismen eine Anpassung an die Bedürfnisse der Natrium und Kalium Homöostase auch bei Beeinträchtigungen der Transportaktivitäten in den einzelnen Nephronsegmente ermöglichen.

Die Urin-Natriumkonzentration und Natriumausscheidung hat den Gipfel am 4. post-Op. Tag.

Die Urin-Kaliumkonzentration erholt sich ab dem 7. post-Op Tag.

Die Harnkonzentrierungsfähigkeit wird ab dem 4. post-Op Tag erreicht

Normale Diuresen bereits ab dem 7. post-Op Tag zu verzeichnen.

Das ANV wird ohne Kältekonservierung ab dem 4. post-Op Tag polyurisch. Die Isosthenurie besteht ohne Kältekonservierung bis zum 3. post-Op Tag.

Eine physiologische Diurese ist ohne Kältekonservierung am 21. post-Op Tag gegeben.

6 DISKUSSION

Die Untersuchungen an autolog reimplantierten Schweinenieren waren als eine Qualitätskontrolle des Modells „Hämoperfusion isolierter Nieren als Tierversuchersatzmethode“ geplant. Bei den Ergebnissen II a, II b, III a und III b der Hämoperfusionsexperimente konnte ein funktioneller Nierenschaden nachgewiesen werden.

Die autologe Reimplantation sollte zeigen, ob die Funktionsänderungen der explantierten Niere während einer Hämoperfusion kurzfristig reversibel sind, oder ob bereits ein Ischämie-/ Reperfusionsschaden (I/R-Schaden) durch Organentnahme, Lagerung und Hämoperfusion entstanden ist, der ein akutes Nierenversagen der reimplantierten Nieren nach sich zieht. Dabei sollten unterschiedliche Konservierungsprotokolle (Sofortige autologe Reimplantation vs. autologe Reimplantation nach 24 h Kältelagerung) miteinander verglichen werden.

Die Arbeitsgruppe um Salhudeen [18, 47] hatte gezeigt, dass ein Nierenschaden durch Kältelagerung der Niere über eine Apoptose der Tubuluszellen zu einem schwereren und protrahiertem Verlauf des postoperativen Akuten Nierenversagens führt.

Die Diskussion der Ergebnisse ist von daher sowohl unter dem Aspekt I/R-Schaden alleine III a als auch I/R-Schaden mit zusätzlicher Schädigung durch Kältelagerung III b zu führen.

Die funktionellen Befunde der reimplantierten Niere zeigen dass es, wie in der Arbeitsgruppe Salhudeen, zu einer erheblichen tubulären Zellschädigung durch Ischämie und Reperfusion nach kalter Organlagerung gekommen ist.

6.1 Diskussion der Methodik

6.1.1 Versuchsbedingungen und Datenauswertung

In unserer Versuchsreihe wurde auf die artgerechte Haltung der Tiere geachtet. Um die Tiere nicht durch einen chronischen Blasenkatheter zu belasten, wurde ein metabolischer Käfig benutzt. Dennoch konnten alle Urinproben gewonnen und alle Parameter gemessen werden.

Die Auswertung erfolgte nach Tabellierung der Ergebnisse in einer Excel-Datei mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel 5.0 und Word 6.0.

Die zeitliche Verlaufsdarstellung der Mediane ergab auswertbare Informationen, die es erlaubten die Fragestellungen zu beantworten. Bei den Vergleichen der Ergebnisse III a und III b zeigten die Verlaufsdarstellungen der Mediane ebenfalls eindeutig Befunde, die im Sinne der Fragestellungen interpretierbar sind.

6.1.2 Vorperiode (Meßwerte vor Versuchsbeginn als Kontrolldaten)

Unsere Daten der Vorperiode I a und I b sind mit den Literaturdaten weitestgehend übereinstimmend. Lediglich die Zahlen der 24 h Urin- Kalium Ausscheidung, welche in beiden Kohorten die gleiche Größenordnung haben, zeigen eine deutliche Abweichung von den Literaturwerten K.H. Waldmann[46]. Ursächlich dürfte die von uns gewählte Kostform sein.

6.1.3 Normotherme isolierte Hämoperfusion

Die Hämoperfusionsmethode wurde als Tierversuchersatzmethode entwickelt mit der Zielsetzung Tierversuche mit organbezogenen Fragestellungen durch eine physiologienahe in vitro Methode zu ersetzen. Ein isoliertes Organ wird dabei mit autologem Blut normothermen perfundiert, das durch Roller- Blutpumpen gefördert durch einen Oxygenator geführt wird. Damit war eine kontinuierliche Entgiftung und ein Gasaustausch gewährleistet.

Die Verwendung eines Dialysemoduls zur Thermostatisierung, Oxigenierung, Decarboxylierung und Korrektur niedermolekularer Soluten von Vollblut wurde bisher von keiner Arbeitsgruppe publiziert[13]. Alle Perfusionsuntersuchungen isolierter Nieren in der Literatur wurden entweder mit zellfreien, -nicht oxigenierten oder oxigenierten wässrigen Lösungen durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind somit nicht mit dieser Untersuchung vergleichbar.

6.1.4 Autologe Reimplantation

Die Autologe Reimplantation ist eine in der experimentellen Transplantations-Forschung gängige Methode. In der Arbeitsgruppe Hauet wurden autologe Reimplantationen von Schweinenieren durchgeführt. Hierbei sollten insbesondere Möglichkeiten zur Minderung der Reperfusionsschäden gefunden werden[7, 48]. Ansonsten wurden damit bisher hauptsächlich Konservierungslösungen und Methoden der Organkonditionierung getestet.

Als Konservierungslösung für die 24-h Kältelagerung wurde Euro-Collins Lösung gewählt, die der Prototyp einer sogenannten „intrazellulären“ Konservierungslösung ist. (Zusammensetzung: s. Literatur Tabelle 1)

6.2 Diskussion der Ergebnisse

6.2.1 Hämoperfusion

6.2.1.1 Renale Hämodynamik

Die zirkulierende Blutmenge in der Hämoperfusionsapparatur betrug einheitlich 300 ml und damit etwa 1/8 des Blutvolumens eines 33 kg schweren Schweines.

Der initiale Gefäßwiderstand der hämoperfundenen Niere liegt bei 50.2 [kPa sec ml⁻¹] und war damit 16 fach höher als der physiologische Widerstand. Nach 70 min Hämoperfusion beträgt der Gefäßwiderstand noch 9.6 [kPa sec ml⁻¹] und liegt dann immer noch 3 fach über der Norm, die 3.02 [kPa sec ml⁻¹]. Der Blutfluss ist dabei um 80 [ml/min/100g] Nierengewicht in einem annähernd physiologischen Bereich:

Auf der vaskulären Ebene findet sich ein partielles „no reflow“ Phänomen mit erheblicher Beeinträchtigung des hämodynamischen Widerstandes.

6.2.1.2 Glomeruläre Funktion

Die perfundierte Niere zeigt ein akutes polyurisches Nierenversagen: Die Niere nimmt zwar sofort die Urinproduktion auf einem polyurischen Niveau auf, die glomeruläre Filtration ist aber auf etwa 1/6 des physiologischen Wertes eingeschränkt. Die Kreatinin-Clearance beträgt 16 % des Kontrollwertes einer Niere in der Vorperiode.

Das Phänomen „no reflow“ scheint auch für die hämoperfundierte Niere zuzutreffen. Die glomeruläre Filtration ist entsprechend der Minderung des renalen Blutflusses während der Hämoperfusion herabgesetzt.

6.2.1.3 Tubuläre Funktion

Die tubuläre Funktion beurteilt an der Resorptionsfraktion für Na⁺ ist ebenso beeinträchtigt und liegt bei etwa 1/4 des Kontrollwertes in der Vorperiode. Na⁺- und K⁺- Konzentration im Urin zeigen für das akute Nierenversagen typische Veränderungen: Das Urin-Na⁺ ist das 5 fache, das Urin-K⁺ 1/10 der Norm. Das Urin-Na⁺ liegt in der Größenordnung der Konzentration der endproximalen Tubulusflüssigkeit. Eine geringe Kaliumsekretion in den Tubulusharn ist jedoch noch vorhanden [25]. Die tubuläre Natriumresorption zeigt eine exzessive Natriuresis mit herabgesetzter RF_{Na^+} .

Insgesamt sind die Befunde im Sinne einer erheblichen Funktionsminderung der Henle'schen Schleife, des distalen Tubulusapparates und der Sammelrohre zu interpretieren.

Die tubulären Schäden sind auf reversible Verluste der Bürstensäume der Tubuluszellen mit Verlust der Zellpolarität zurückzuführen. Abdiffusion von ATP-Spaltprodukten und damit eine Behinderung energieliefernder Prozesse trotz guter Sauerstoffversorgung während der Hämoperfusion könnte ebenfalls eine Rolle spielen.

Ausgedehntere tubuläre Zellnekrosen sollten während der Perfusionsphase in unserer Versuchsreihe noch nicht entstanden sein, denn lt. Literatur kommt es zur derartigen Schädigungen nur dann wenn wenigstens 1/6 des normalen RBF unterschritten wird [38]. Dies war aber nicht der Fall.

6.2.1.4 Renale Osmoregulation

Es kam zu einer sofortigen Funktionsaufnahme der hämoperfunden Nieren, kenntlich am Einsetzen einer Diurese, welche allerdings extrem hoch war und damit eine wesentlich stärkere Einschränkung der Volumenrückresorption bei nahezu gleicher glomerulärer Filtration gezeigt hat. Die renale Osmoregulation zeigte eine isosten- bzw. hypostenurische Funktionslage während der Hämoperfusion.

Die Ergebnisse zeigen ein erhebliches funktionelles Defizit der Nierenfunktion. Strukturelle Schäden sind aber aus diesen Ergebnissen nicht unmittelbar abzuleiten. Falls diese Interpretation zutrifft, müsste nach autologer Reimplantation eine sofortige Normalisierung der betroffenen Parameter erfolgen, andernfalls wäre dann doch ein ANV mit zeitfordernder Reparaturphase anzunehmen.

6.2.2 Vergleich der Hämoperfusion mit und ohne Kältelagerung

Die explantierte Niere zeigt in den Hämoperfusionsexperimenten in beiden Serien gleichermaßen das Parameterprofil einer akuten polyurischen Niereninsuffizienz. Die Partialfunktionen können somit verglichen werden.

6.2.2.1 Renale Hämodynamik

Die Serien zeigen zunächst einen deutlichen Unterschied im Gefäßwiderstand; in der Serie mit Kältekonserverung war der initiale Gefäßwiderstand 3-fach höher [16]. Der anfänglich größere Gefäßwiderstand in den Hämoperfusionen nach 24 h Kältelagerung ist durch eine in dieser Serie zusätzliche vorübergehende kälteinduzierte Vasokonstriktion bedingt. Im Verlauf der Hämoperfusion fiel der Gefäßwiderstand wieder ab, um nach ca. 90 Minuten Hämoperfusion in beiden Serien einen fast gleichen Wert anzunehmen, der aber immer noch 3-fach über der Norm lag. Das Phänomen „no reflow“ ist somit in beiden Serien sichtbar und etwa auch gleich stark ausgeprägt. Die Tatsache, dass in beiden Serien nach 2 Stunden Hämoperfusion praktisch der gleiche Gefäßwiderstand gemessen wird, schließt aber ausgedehntere mikrothrombotische Gefäßverschlüsse in der Nierenrinde nach Kältelagerung aus.

6.2.2.2 Glomeruläre Funktion

Die Minderung der glomerulären Filtration ist direkte Folge der herabgesetzten Durchblutung; Die glomeruläre Funktion war in beiden Serien etwa gleich stark auf ~15 % der Norm eingeschränkt. Auffällig ist, dass die glomeruläre Filtration von der Kältekonserverung nicht zusätzlich geschädigt wurde.

6.2.2.3 Tubuläre Funktion

Die tubuläre Funktion zeigte dagegen deutliche Unterschiede: Die RF_{Na^+} ist in der Serie ohne Kältekonserverung nur auf 84,5 % eingeschränkt, in der Serie mit Kältekonserverung dagegen auf 23,4 %. Die Urin-Natriumkonzentration und Urin-Kaliumkonzentration unterscheiden sich zwar weniger deutlich, aber in die gleiche Richtung: größerer Schaden in der Serie mit Kältekonserverung gleichbedeutend mit höherer Natrium- und niedrigerer Kaliumkonzentration im Urin.

6.2.2.4 Renale Osmoregulation

In beiden Serien kam es zu einer sofortigen Funktionsaufnahme der hämoperfundenen Nieren, kenntlich am Einsetzen einer Diurese. In der Serie mit Kältekonserverung ist diese allerdings extrem hoch und zeigt damit die wesentlich stärkere Einschränkung der Volumenrückresorption bei nahezu gleicher glomerulärer Filtration. Die renale Osmoregulation zeigte in beiden Serien eine isosthenurische bzw. hypostenurische Funktionslage während der Hämoperfusion. Ob tatsächlich in der Serie ohne Kältelagerung der Urin verdünnt werden konnte bleibt offen. Der Vergleich der beiden Hämoperfusions-Serien lässt sich tabellarisch zusammenfassen:

Tabelle 10

Parameter	II a	II b
Renovaskulärer Widerstand* [kPa sec ml ⁻¹]	3.0	9.60
Kreatininclearance [ml/ min]	6.9	5.75
RF _{Na}	84.8	23.4
Urin-Natrium [mmol/l]	134	90
Urin-Kalium [mmol/l]	9	6
U/P Osmol	0,76	1

Tabelle 10. Vergleich der Parameter der Ex-vivo-Nierenfunktion aus dem Versuchsprotokoll ohne II a und mit 24 h Kältekonserverung II b am Ende der Hämoperfusion mit autologem dialysiertem und durch Gasaustausch arterialisiertem Vollblut. Errechnet sind die Medianwerte der Nierenfunktion.

II a Zahl der Tiere N =6. II b Zahl der Tiere N =5.

* Initialer Gefäßwiderstand

6.2.3 Autologe Reimplantation nach Kältelagerung und isolierter Hämoperfusion

6.2.3.1 Renale Hämodynamik

Im Versuchsprotokoll war keine Instrumentierung vorgesehen, so dass eine direkte Messung der Nierendurchblutung nicht möglich war. Dennoch ist von dem Phänomen des „no reflow“ auszugehen [38, 49], da sich postoperativ ein akutes Nierenversagen der reimplantierten Niere zeigte. Die Erhöhung des renovaskulären Widerstandes im akuten, ischämischen Nierenversagen wird in dieser Hypothese durch eine Endothel Schwellung erklärt [26, 37, 49].

Infolge der hypoxischen Schwellung tubulärer Epithelzellen, Kapillar-Endothelien der Glomerula und Mesangialzellen kommt es auf Grund der relativ unnachgiebigen Nierenkapsel (Gerotta Fascie) zu einem deutlich erhöhten Gewebedruck der den Gefäßwiderstand heraufsetzt. Durch Fibrin und Thromben in den Kapillaren wird das „no reflow“ Phänomen weiter verstärkt [21].

Das „no reflow“ Phänomen“ kommt besonders im kortikomedullären Übergang (Vasa recta)[21, 37, 49] und der Medulla zum Tragen. Das äußere Mark beinhaltet die S3-Segmente der proximalen Tubuli, aufsteigende Äste der Henleschen Schleifen sowie die kortikalen Sammelrohre mit den umschließenden vasa recta. Diese und vor allem die distalen Tubulusabschnitte (TALH) reagieren auf eine reduzierte Sauerstoffversorgung aufgrund eines hohen ATP Umsatzes besonders empfindlich. Dieses gibt eine zusätzliche Erklärung für den hohen Salzverlust bei unseren reimplantierten Nieren [14]. (s.u.)

Zusätzlich ist eine kälteinduzierte Vasokonstriktion der präglomerulären Arteriolen und kleinen Arterien Folge eines kälteabhängigen intrazellulären Kalziumeinstrom zu diskutieren. Die tubulären Kalziumkanäle sind offenbar nicht ausreichend durch die Konservierungslösung Euro-Collins blockiert.

In unserer Versuchsreihe muss somit eine erhebliche Verschiebung des Gefäßtonus zu Gunsten der lokalen und systemischen Vasokonstriktoren vorliegen. Neben dem erhöhten Sympathikustonus und einer maximalen Aktivierung des Renin Angiotensin Systems kommt es auch zu einem Anstieg der zirkulierenden vasokonstriktiven Substanzen wie z.B. Katecholamine und Endothelin.

Schließlich kann aufgrund einer gesteigerten proximaltubulären Natriurese über den tubuloglomerulären feedback Mechanismus eine präglomeruläre Vasokonstriktion entstehen, die zu zur Erhöhung des Gefäß-Widerstandes beiträgt [35, 38].

6.2.3.2 Glomeruläre Funktion

Alle 5 autolog reimplantierten Nieren nahmen nach 24-h Kältekonservierung und präoperativer Hämoperfusion ihre Funktion auf. Nach Reimplantation wird ein akutes, zunächst oligoanurisches später polyurisches Nierenversagen sichtbar. In unserer Versuchsreihe dauert die oligurische Phase bis zum 4. post-Op Tag (5. post OP Tag Diurese 1.5 ml/min). Danach liegen die Diuresen mit 2.5 ml/min deutlich über den Kontrollwerten (2 ml/min).

Das Serum-Kreatinin steigt bis zum 5. post-Op Tag auf ein Maximum von 15.9 mg/dl. Plasma-Harnstoff und -Kreatinin verhalten sich direkt proportional zu den jeweiligen Clearancegrößen, so dass eine Veränderung dieser Werte prinzipiell auch an den Retentionswerten abgelesen werden kann.

Die Kreatininclearance stabilisiert sich ab dem 34. post-Op. Tag von durchschnittlich 31 ml/min/10 kg allerdings mit starken Schwankungen. Dieser Wert entspricht ca. 80% der Vorperiode bezogen auf eine Niere. Die Ausgangswerte werden somit nicht vollständig erreicht.

Der Endwert der Harnstoff-Clearance entspricht mit ca. 40 % dem Wert der Vorperiode.

Die Hauptursache der verminderten Kreatininclearance liegt in dem Phänomen des „back leakage“ des Primärharns im Bereich des proximalen Tubulus, vorwiegend im pars recta Segment [50]. Fassbare Auswirkungen des tubulären „back leakage“ sind verminderte Kreatininclearance und verminderte RF_{Na^+} .

Der glomeruläre Ultrafiltrationskoeffizient, K_f , muss sich in unserer Versuchsreihe deutlich durch Abnahme der Oberfläche bzw. Permeabilität der Glomerula gemindert haben. Wahrscheinlich ist es zu einer Verdickung durch Fibrosierung in der Tunica adventitia nach vaskulären Läsionen gekommen.

Markerproteine, welche eine Proteinurie sowohl in einen glomerulären als auch tubulären Schaden unterscheiden, wurden in unseren Experimenten nicht gemessen. Der Rückgang der Proteinurie geht mit der Erholung der glomerulären Funktion einher. Die Protein-Konzentration im Urin ist postoperativ etwa auf das 4 fache des der Vorperiode gesteigert. Die Medianwerte fallen dann kontinuierlich ab,

um etwa ab dem 28. post-Op. Tag das Niveau der Vorperiode zu erreichen.

6.2.3.3 Tubuläre Funktion

Die renale Natriumbehandlung ist der empfindlichste Parameter zum Nachweis einer tubulären Schädigung. Die RF_{Na^+} (Vorperiode $RF_{Na^+} = 0.9953$, 3. post-Op. Tag = 0.719) wird zur Beurteilung der tubulären Transportfunktion herangezogen.

Mehr als 90% des Sauerstoffverbrauchs der Nieren sind durch den aktiven Na^+ -Transport im Tubulussystem bedingt. Somit wird auch bei Störung der tubulären Integrität mit der Messung der RF_{Na^+} die wichtigste vom Energiestoffwechsel abhängige Funktion der Tubuli erfasst. Die Einschränkung der RF_{Na^+} ist von daher beim ANV ein valider Parameter.

Die RF_{Na^+} ist durch das Verhältnis von U/P_{Na^+} zu U/P_{Krea} bestimmt. Ein tubuläres „back leakage“ beeinflusst beide Größen im gleichen Maße. Eine Minderung der RF_{Na^+} kann sowohl durch tubuläres „back leakage“ als auch durch eine Minderung der ATP-abhängigen Natriumresorption bedingt sein. Eine Unterscheidung der beiden Möglichkeiten kann nur durch simultane Messung des Sauerstoffverbrauchs und Bestimmung des Kopplungskoeffizienten, Na^+ Transport/ O_2 Verbrauch, getroffen werden.

Der Gipfel der Urin-Natriumwerte ist am 4. post-Op. Tag erreicht. Ein schneller Abfall folgt bis zum 7. post-Op. Tag, welcher dem Wert der Vorperiode entspricht (Median 12 mmol/l). Die Wiedereinstellung physiologischer Werte und Schwankungsbreiten zeigt die Erholung der tubulären Natriumbearbeitung an.

Die K^+ -Konzentration im Urin ist postoperativ auf einen Minimalwert von 10 mmol/l abgefallen, steigt aber ab dem 2. post-Op. Tag wieder, um ab dem 32. post-Op. Tag einen relativ stabilen jedoch noch erniedrigten Bereich im Vergleich zur Vorperiode zu erreichen. Niedrige K^+ -Werte im Urin zeigen ein Funktionsdefizit der distal-tubulären Kaliumsekretion. Der Anstieg des Urinkaliums bedeutet die Erholung dieser partiellen Nierenfunktion.

In der ersten Woche nach autologer Reimplantation kommt es zur Hyperkaliämie bis 6 mmol/l am 6. post OP-Tag. Postoperativer Hyperkatabolismus und azidosebedingte intra/extrazelluläre K^+ -Verschiebungen im Rahmen des akuten Nierenversagens sind wirksam. Insgesamt wird diese jedoch nicht so gravierend eingeschränkt, als dass dies den Tod eines des Tieres bedingt hätte.

6.2.3.4 Renale Osmoregulation

Kältekonserverung, Hämoperfusion und warme Ischämie haben in unserer Versuchsreihe zu diffusen renoparenchymalen Schäden geführt, die zusammen die Aufhebung der Harnkonzentrierung bedingt und zu einer Isosthenurie geführt haben. Es muss zumindest vorübergehend zu einem Funktionsverlust von mehr als 2/3 der Nephrone gekommen sein, da ab dieser Größenordnung die Fähigkeit der Niere zur Harnkonzentrierung eingeschränkt ist [22].

Ursache könnte eine Unempfindlichkeit der Niere auf ADH sein. Damit ist die Wasserdurchlässigkeit bestimmter Nierenepithelien nicht mehr gewährleistet. Dem Urin in den ADH empfindlichen Tubulus- und Sammelrohrabschnitten kann somit kein Wasser entzogen werden. Sollte ausschließlich eine ADH-Resistenz vorliegen dann dürfte es nicht zu Isosthenurie, sondern es müsste zur Hyposthenurie gekommen sein.

Ursächlich für die Isosthenurie ist sehr wahrscheinlich der Ausfall des in der Henle'schen Schleifen und den Sammelrohren angesiedelte Harnkonzentrierungs-Mechanismus der auf dem Prinzip der Gegenstromdiffusion beruht. Das bedeutet, dass die gesamte distal-tubuläre Natriumbehandlung des Primärharns während der Erhaltungsphase des ANV ausgefallen ist. Der Endharn wird dann nur noch durch die proximal-tubuläre Transportaktivität bestimmt, die isoosmotisch arbeitet.

Die rückkehrende Harnkonzentrierung ist der empfindlichste Parameter der Erholung der Nierenfunktion. Die Urin Osmolarität verhält sich dabei invers zur Länge der Ischämiezeit. Ab dem 29. post-Op Tag konnten die autolog reimplantierten Nieren die Urinosmolalität wieder deutlich über die Plasmaosmolalität anheben. Fraglich bleibt inwiefern die Regeneration des ANV in der Versuchsreihe vollständig erlangt wird. Retentionswerte, tubuläre Funktionen und glomeruläre Filtration nehmen zwar annähernde Ausgangswerte wieder an. Dies geschieht jedoch bei gesteigerten Diurese Raten. In dieser Polyurie zeigt sich die noch nicht vollständige Übernahme der Nierenfunktion durch die autolog reimplantierte Einzelniere.

6.2.3.5 Phasen des ANV

Tabelle 11

Parameter [Dimension]	Erhaltungsphase Zeitdauer	Reparaturphase Zeitdauer	Endwert Beobachtung	Wert Vorperiode
Kreatinin-Konzentration im Serum [mg/dl]	Gipfel 5. Tag: 15.9 Schneller Abfall bis 8.Tag: 3.5	Langsamer Abfall ab 9. bis 23. Tag: 1.8 Stabilität ab 24.Tag:1.8-1.9	42. Tag 1.9	1.0
Kreatinin-Clearance [ml/min/10 kg]	Beginn 6. Tag: 2.85	Anstieg bis 32.Tag : 29.8 Stabilität ab 33.Tag: 26.5 - 29.8	42. Tag 26.5	47.1 / 2
Harnstoff-Konzentration im Serum [mg/dl]	Gipfel 5.Tag: 236 Schneller Abfall bis 12.Tag : 72.5	Langsamer Abfall ab 13. bis 27.Tag : 45 Stabilität ab 28. Tag: 19	42. Tag 19	22
Harnstoff-Clearance [ml/min/10 kg]	Beginn 6.Tag : 2.03	Anstieg bis 29. Tag : 14.9 Stabilität ab 30.Tag: 8.8 - 15	42. Tag 15.1	25 / 2
Harnstoff-Ausscheidung [mmol/24h/10 kg]	Anstieg bis 10.Tag : 6.64	Stabilität mit Schwankung. ab 11. Tag : 1.92 – 8.71	42. Tag 9	4.5
Protein-Konzentration im Urin [g/dl]	Gipfel 6.Tag : 0.88	Abfall bis 28. Tag: 0.115	42.Tag 0.26	0.16
U/P _{Kreatinin}	Minimum 5.Tag: 2	Anstieg ab 2. Tag	42. Tag 48	91
RF _{Na⁺}	Minimum 3. Tag : 0.719	Stabilität ab 7.Tag: 0.993 – 0.999	42. Tag 0.993	0.997
Na ⁺ Konzentration im Urin [mmol/l]	Gipfel 4.Tag: 63 Schneller Abfall bis 8 Tag: 9	Stabilität ab 9.Tag : 8 – 28	42. Tag 14	26
Na ⁺ Ausscheidung im Urin [mmol/24h]	Gipfel 4.Tag: 95.5 Schneller Abfall bis 7 Tag: 45.5	Stabilität ab 9.Tag: 37.4 – 85.9	42. Tag 25	75
K ⁺ Konzentration im Urin [mmol/l]	Gipfel 6.Tag : 47 Schneller Abfall bis 9 Tag : 26.5	Anstieg ab 10. Tag: Stabilität nicht erreicht	42. Tag 77	62
K ⁺ Ausscheidung im Urin [mmol/24h]	Gipfel 6.Tag : 116 Schneller Abfall bis 7 Tag : 69	Anstieg bis 17. Tag Stabilität ab 18. Tag : 135 – 220	42. Tag 220	178
Diurese [ml/min]	Beginn 3.Tag :0.85 Anstieg bis 12. Tag: 1.95	Stabilität ab 13.Tag: 2.45 – 2.70	42. Tag 2.7	2
Plasma-Osmolalität [mosm/kg]	Gipfel 5. Tag : 325 Schneller Abfall Bis 8.Tag :301	Stabilität ab 9. Tag : 301	42. Tag 300	285
Urin-Osmolalität [mosm/kg]	Isostenurie bis 29.Tag: 300	Anstieg ab 30.Tag	42. Tag 520	500
U/P _{osmol}	Isostenurie bis 29. Tag 1.0	Anstieg ab 30. Tag	42. Tag 1.6	1.7
Protein-Konzentration i.S. [g/dl]	Minimum 1.Tag 4.10	Stabilität ab 7. Tag: 6.1	42. Tag 6.8	6.7
Albumin-Konzentration i.S. [g/dl]	Minimum 1.Tag 2.4	Stabilität ab 8. Tag: 2.7	42. Tag 3.2	3.3

Tabelle 11. Parameter der Nierenfunktion nach autologer Reimplantation aus dem Versuchsprotokoll mit 24 h Kältekonserverung II b. Anhand der Medianwerte sind die Zeitbereiche der Erhaltungsphase und der Reparaturphase des akuten Nierenversagens sowie die Endwerte der Beobachtungszeit zusammengefasst. Zahl der Tiere N = 5.

Die Phasen des Akuten Nierenversagens wurden im Literaturteil genannt.

Das bei Transplantationen häufig auftretende Phänomen der verzögerten Funktionsaufnahme (delayed graft function), das sich in einer andauernden Oligo-Anurie manifestiert, wurde nach autologer Reimplantation in unseren Versuchen ebenfalls beobachtet und als Ischämie/Reperfusionsschaden im Sinne eines akuten Nierenversagens (ANV) gedeutet [25, 51]. Dabei ist der Zeitverlauf der Regeneration als Marker des Schweregrades des renalen Schadens zu werten. Anhand der gemessenen und funktionellen Parameter kann der Zeitablauf der Regeneration beurteilt werden. Über den Verlauf der Parameter der Nierenfunktion bezüglich harnpflichtiger Substanzen lassen sich die einzelnen Stadien des ANV in unserer Versuchsreihe aufzeigen. Die Phasen des ANV sind wie folgt definiert [25, 51] :

Die gemessenen Parameter erlauben folgende Zuordnungen:

Die **Schädigungsphase** setzt sich in unseren Experimenten aus der Organentnahmezeit (27 min), der Reimplantation (44 min), der warmen Ischämiezeit (318 min) und Kältelagerung (24 h) zusammen.

In der **Erhaltungsphase** zeigt das reimplantierte Organ nach anfänglicher Oligoanurie die Charakteristiken eines polyurischen ANV. Die Harnproduktion setzt am 2. post-Op Tag wieder ein, um ab dem 3. Tag polyurische Werte zu erreichen. Die Erhaltungsphase bezüglich der glomerulären Funktion dauert bis zum Gipfelwert des Serum-Kreatinins. Die Dauer der Erhaltungsphase der Tubulusfunktion variiert in partiellen Funktionsbereichen, lässt sich aber mit der renalen Natriumbehandlung erfassen.

Die Dauer der Erhaltungsphase des ANV lässt sich für die drei renalen Hauptfunktionsbereiche wie folgt definieren: Glomeruläre Funktion bis 5. post-Op. Tag; Tubuläre Funktion bis 6. post-Op. Tag; Renale Osmoregulation bis 29. post-Op. Tag.

Die Befunde in den ersten Tagen nach autologer Retransplantation entsprechen qualitativ denen der vorangegangenen Hämoperfusion. Ein direkter Vergleich mit der vorangehenden Hämoperfusion ist jedoch insofern erschwert, als die Hämoperfusionsdaten nur kurzfristig und statisch sind, wohingegen die Reimplantationsbefunde ein dynamisches Geschehen zeigen. Ein Vergleich kann jedoch unter dieser Einschränkung erfolgen. Die Funktion der reimplantierten Niere

am 3. post-Op. Tag wird mit der Nierenfunktion während der vorangegangenen Hämoperfusion verglichen.

Tabelle 12

Parameter	Hämoperfusion	Autologe Reimplantation (3. post OP Tag)
Renovaskulärer Widerstand [kPa sec ml ⁻¹]	9.60	nicht gemessen
Kreatininclearance [ml/ min]	5.75	3
RF _{Na}	0.234	0.719
Urin-Natrium [mmol/l]	134	95.5
Urin-Kalium [mmol/l]	6	10

Tabelle 12. Vergleich der Parameter der Nierenfunktion aus dem Versuchsprotokoll mit 24 h Kältekonserverung II b am Ende der Hämoperfusion mit den Parametern des 3. post Op Tages nach Autologer Reimplantation. Errechnet sind die Medianwerte der Nierenfunktion. II a Zahl der Tiere N =6. II b Zahl der Tiere N =5.

Der Vergleich zeigt ein ungleich schweres Defizit während der Hämoperfusion. Dabei ist die tubuläre Funktion wesentlich stärker geschädigt als die glomeruläre Funktion. Die Interpretation dieser Befunde weist auf den besonders schweren tubulären Zellschaden während der Hämoperfusion hin; Der Verlust der Polarität der Tubuluszellen tritt offenbar sofort ein. Ein vektorieller Natriumtransport ist in dieser Situation nicht möglich.

Der Beginn der **Reparaturphase** setzt mit dem Tag des Extremwertes (Minimum-Maximum) ein. Dieser zeigt die funktionelle Restaurierung der jeweiligen Nierenpartialfunktion an. Das Ende der Reparaturphase ist als Zeitpunkt einer wiedererlangten physiologischen Nierenfunktion definiert.

Als die Dauer der Reparaturphase der glomerulären Funktion kann in unseren Versuchen der Zeitraum ab dem 6. bis zum 23. post-Op. Tag gewertet werden.

Die Reparaturphase der tubulären Funktion beginnt mit dem Minimum der RF_{Na}⁺ (3. post-Op. Tag) und vollends ab Abfall des Urin-Natrium (7. post-Op Tag). Die RF_{Na}⁺ hat am 7. post-Op. Tag die Werte der Vorperiode von 99.9% wieder erreicht. Von

diesem Tag an bestehen intakte Nephrene mit physiologischem Natriumtransport. Die Wiedereinstellung des Normalwertes zeigt die Erholung der tubulären Na⁺-folgenden Zeitspanne kontinuierlich die Zahl der funktionstüchtigen Glomerula vergrößert. Ab dem 24. post-Op Tag ist der Zustand einer funktionstüchtigen Einzelniere gegeben. Während der Reparaturphase ist eine „glomerulo-tubuläre“ Balance gegeben. D.h. es bestehen funktionstüchtige Nephren mit normalem Einzelnephronfiltrat und normaler Natriumrückresorption. Die Zahl dieser Nephrene wird in der Reparaturphase laufend vergrößert bis der physiologische Zustand einer Einzelniere erreicht ist (24.postOp.Tag).

Eine voll anpassungsfähige renale Osmoregulation tritt deutlich später ein; erst ab dem 30. post-Op. Tag ist die reimplantierte Niere in der Lage auf unterschiedliche osmotische Belastungen zu reagieren.

Die Dauer der Reparaturphase des ANV lässt sich für die drei renalen Hauptfunktionsbereiche wie folgt definieren: Glomeruläre Funktion 6. bis 23. post-Op. Tag; Tubuläre Funktion 7. bis 24. post-Op. Tag; Renale Osmoregulation bis 29. post-Op. Tag

Eine **physiologische Nierenfunktion** wird ab dem 24. post-Op Tag erreicht. Das Plateau der Retentionswerte Kreatinin und Harnstoff deutet auf eine funktionelle Stabilität hin. Im Vergleich zur Vorperiode (Kontrollwerte) zeigen sich jedoch konstante funktionale Defizite. Die Verlaufsbeobachtung schließt nach Abschluss der Reparaturphase des ANV die beginnende Anpassung an den Zustand der Einnierigkeit ein. Es ist zu erwarten, dass die noch nicht vollzogene Anpassung sich zunächst in einer geänderten Funktionalität äußert, bevor eine volle Kompensation durch Hypertrophie der reimplantierten Niere sichtbar wird [14]. Beim Menschen dauert die volle Anpassung nach Uninephrektomie ca. 1 Jahr. Für das Schwein liegen keine diesbezüglichen Daten vor.

6.2.4 Vergleich der Autologen Reimplantation mit und ohne Kältelagerung

6.2.4.1 Glomeruläre Funktion

Das Maximum des akuten Nierenversagens beurteilt am Serum-Kreatinin lag ohne Kältekonservierung am 2. Tag bei 7.6 mg/dl und mit Kältekonservierung am 5. Tag bei 15.9 mg/dl.

Das Maximum der Erhöhung der Retentionswerte gegenüber der Vorperiode ist in beiden Serien verschieden: Der Serum-Kreatinin-Wert erreicht das 16 fache, der Serum-Harnstoff Wert das 10 fache der Vorperiode. Im Vergleich hierzu sind die Retentionswerte der Versuchsreihe ohne Kältekonservierung auf einem niedrigeren Niveau. Kreatinin und Harnstoffspiegel sind beide maximal nur um das 8 fache der Norm angestiegen.

Den gleichen Befund zeigt die glomeruläre Funktion, beurteilt an der Kreatininclearance.

Beginn einer messbaren Kreatininclearance ohne Kältekonservierung ist am 2.Tag mit 5.8 ml/min/10kg und mit Kältekonservierung erst am 6.Tag mit 2.85 ml/min/10kg. Insgesamt scheint die Entwicklung der Kreatininclearance um 3 Tage verschoben zu sein.

Die Harnstoffclearance ist zur Beurteilung der Phasen eines polyurischen Nierenversagens weniger geeignet, weil mehrere und voneinander unabhängige Determinanten (Postaggressionsstoffwechsel) berücksichtigt werden müssen. Prinzipiell bestehen aber analoge Verhältnisse zur Kreatininclearance.

Die Plasma-Proteinkonzentration liegt 28% unter der Konzentration der Vorperiode. Die Vergleichsgruppe ohne Kältekonservierung hat ein Defizit von nur 19%.

Die Urin-Proteinkonzentration ist in unserer Versuchsreihe um das 5.5 fache gegenüber der Vorperiode gestiegen. In der Vergleichsgruppe ohne Kältekonservierung war der Wert um das 2.5 fache gegenüber der Vorperiode gestiegen.

6.2.4.2 Tubuläre Funktion

Die Resorptionsfraktion für Natrium ist in beiden Serien abgesenkt. Nach autologer Reimplantation werden 72% in unserer Versuchsreihe und ohne Kältekonserverung werden 95% gemessen. Der Tiefpunkt war hier am 1. Tag nach autologer Reimplantation erreicht. In unserer Serie erst am 3. postoperativen Tag.

Die RF_{Na^+} normalisiert sich nach Kältekonserverung 2 Tage später. Im Vergleich: 1. vs. 3. post-Op Tag. Die RF_{Na^+} ist am 6. bzw. 7. post-Op Tag in den beiden Serien wieder „physiologisch“.

Die Natriumkonzentration im Urin und die Natriumausscheidung haben in beiden Serien zeitgleich einen Gipfel am 4. post-Op. Tag. Dieser Gipfel zeigt den Beginn der Bilanzierung der Natriumretention in der Erhaltungsphase des ANV nachdem eine vorangegangene Natrium-Retention abgebaut wurde.

Die Urin-Natrium-Konzentration ist in unserer Versuchsreihe um das 5-fache gegenüber der Vorperiode als Ausdruck einer ausgeprägten Natriuresis gestiegen. In der Vergleichsgruppe ohne Kältekonserverung war der Wert nur um 16% gestiegen. Der Tiefpunkt lag hier am 4. Tag gegenüber unserer Versuchsreihe am 6. Tag. Die Nieren in beiden Serien verfügen somit über die gleiche Fähigkeit der Anpassung an das akute polyurische Nierenversagen in Bezug auf die Aufrechterhaltung der Natrium-Homöostase.

Tubuläre nekrotische Schädigung sind einhergehend mit einer ausgeprägten Natriuresis d.h. die Urin - Natrium Konzentration liegt über 40 mmol/l. Der Vergleich der Urin-Natrium Konzentration macht deutlich, dass es in unserer Versuchsreihe mit Kältekonserverung auch zu Zellnekrosen im Bereich der proximalen Tubuli gekommen sein muss, da die Urin-Natrium Konzentration bei 76 mmol/l liegt. Die proximalen Tubuli sind für den Hauptteil der Natriumresorption verantwortlich.

Die Urin-Kalium-Konzentration ist in unserer Versuchsreihe um 72 % gegenüber der Vorperiode abgefallen. In der Vergleichsgruppe ohne Kältekonserverung war der Wert um ca. 65 % gesunken. Der Tiefpunkt lag hier am 3. Tag gegenüber unserer Versuchsreihe am 1. Tag. Die Urin-Kalium Konzentration ist nach Kältekonserverung bis zum 19. post Op. Tag deutlich höher und zeigt damit eine schlechtere Kaliumsekretion nach Kältekonserverung mit längerer Rekompensation. Aufgrund der höheren Diurese in dieser Serie wird aber die Kalium Homöostase mit Einsetzen einer Polyurie zur gleichen Zeit wie in der Serie ohne Kältekonserverung erreicht.

6.2.4.3 Renale Osmoregulation

Die Nieren unserer Versuchsreihe befinden sich länger in dem oligoanurischen Stadium des akuten Nierenversagens. Die Diurese unserer Versuchsreihe beginnt am 5. post-Op Tag = 1.42 ml/ min; ohne Kältekonserverung am 2. post-OP Tag = 1.06 ml/ min. Ab dem 6. post-Op Tag liegen die Diuresen in unserer Serie über denen ohne Kältekonserverung. Das bedeutet die Nieren unserer Versuchsreihe benötigen insgesamt mehr Flüssigkeit zur Elimination harnpflichtiger Substanzen. Die Diurese ist mit Kältekonserverung ab dem 12. post-Op Tag polyurisch. Ohne Kältekonserverung ist eine normale Diurese ab dem 7. post-Op Tag zu verzeichnen. Die Diurese bleibt in der Serie mit Kältekonserverung bis zum Ende der Untersuchung am 42. post-Op Tag auf polyurischem Niveau. Ohne Kältekonserverung sind normale Diuresen bereits ab dem 7. post-Op Tag zu verzeichnen.

Die Plasma-Osmolarität hat in der Serie ohne Kältekonserverung im Vergleich zu unseren Versuchen um 11.5 % zugenommen.

Die Urin-Osmolarität ist in unserer Versuchsreihe um 42 % gegenüber der Vorperiode abgefallen. In der Serie ohne Kältekonserverung war der Wert ebenso um 42 % gesunken. Beide Tiefpunkte waren hier am 1. Tag nach autologer Reimplantation erreicht.

6.2.4.4 Phasen des akuten Nierenversagens

Die Ergebnisse III b lassen sich nicht uneingeschränkt mit den Ergebnissen aus III a vergleichen, da die Dauer der Nachbeobachtung nach autologer Reimplantation unterschiedlich war. In der Serie ohne 24 h-Kältekonserverung wurde 21 Tage lang beobachtet, in der eigenen Serie bis zum 42. Tag. Insofern können zur Phase der Anpassung der Nierenfunktion der retransplantierten Niere an die Einnierigkeit keine vergleichenden Aussagen gemacht werden.

Der Verlauf des akuten Nierenversagens nach autologer Reimplantation ist jedoch in den beiden Protokollen gleichermaßen abgedeckt.

Die **Schädigungsphase** im Sinne einer warmen Ischämie war infolge identischer Operationstechniken beider Serien etwa 5 Stunden lang.

Diskussion

In der Serie nach 24-h Kältekonservierung ist die **Erhaltungsphase** des ANV in den Teilbereichen der Nierenfunktion, glomeruläre und tubuläre Funktion, sowie Osmoregulation zeitlich länger und funktionell intensiver ausgeprägt. Die Reparaturphase setzt dementsprechend in allen Teilbereichen auch später ein.

Wie oben unter 3 erwähnt gibt es verschieden ausgeprägte Schweregrade des akuten Nierenversagens. Differenziert wird zwischen einer leichten prärenalen Hyperazotämie und einer akuten tubulären Nekrose. Es ist davon auszugehen, dass nach Kältekonservierung insbesondere während der Hämoperfusion ausgedehntere Nierenschäden, wie z.B. durch tubuläre Nekrosen und Leckagen verursacht, vorhanden sind.

Die **Reparaturphase** setzt nach autologer Reimplantation mit Kältelagerung in allen Teilbereichen später ein. Zusammengefasst ergaben sich folgende zeitliche Zuordnungen:

Tabelle 13

Parameter	Reparaturphase III a	Reparaturphase III b
Glomeruläre Funktion	ab 2. post-Op Tag	ab 5. post-Op Tag
RF _{Na+}	ab 1. post-Op Tag	ab 3. post-Op Tag
Tubuläre Funktion*	ab 6. post-Op Tag	ab 6. post-Op Tag
Renale Osmoregulation	ab 4. post-Op Tag	ab 28. post-Op Tag

Tabelle 13. Anhand der einzelnen Nierenfunktionsparameter aus dem Versuchsprotokoll ohne III a und mit 24 h Kältekonservierung III b wird der Beginn der Reparaturphase nach Autologer Reimplantation verglichen. Angegeben sind die Tage nach Reimplantation ab denen die Reparaturphase einsetzt. III a Zahl der Tiere N =6. III b Zahl der Tiere N =5.

Die renale Osmoregulation ist der empfindlichste Parameter der Nierenschädigung. Die Nierenfunktion wird in beiden Serien zu unterschiedlichen Zeitpunkten polyurisch: ohne Kältekonservierung ab dem 4. post-Op Tag, mit Kältekonservierung ab dem 7. post-Op Tag. Eine Isosthenurie besteht ohne Kältekonservierung bis zum 4. post-Op Tag, mit Kältekonservierung bis zum 28. post-Op Tag.

Die absolute Größe der Ausscheidung der Urin-Elektrolyte Natrium und Kalium können nicht zur Erkennung des Beginns der Reparaturphase herangezogen werden, da intrarenale Kompensationsmechanismen eine Anpassung an die Bedürfnisse der Natrium und Kalium Homöostase auch bei Beeinträchtigungen der

Transportaktivitäten in den einzelnen Nephronsegmenten ermöglichen. Dies geschieht in Anpassung an unterschiedliche glomeruläre Filtrationsraten (Glomerulotubuläre Balance) [52].

Die Einstellung einer **physiologischer Nierenfunktion** in der Reihenfolge:

Tabelle 14

	physiologische Nierenfunktion III a	physiologische Nierenfunktion III b
Parameter		
Glomeruläre Funktion	ab 5. post-Op Tag	ab 20. post-Op Tag
RF _{Na+}	ab 6. post-Op Tag	ab 7. post-Op Tag
Diurese	ab 7. post-Op Tag	nicht erreicht
Renale Osmoregulation	ab 10. post-Op Tag	ab 28. post-Op Tag

Tabelle 14. Anhand der einzelnen Nierenfunktionsparameter aus dem Versuchsprotokoll ohne III a und mit 24 h Kältekonservierung III b wird die Reihenfolge der Einstellung einer physiologischen Nierenfunktion nach Autologer Reimplantation verglichen. Angegeben sind die Tage nach Reimplantation ab denen sich eine physiologische Nierenfunktion eingestellt hat. III a Zahl der Tiere N =6. III b Zahl der Tiere N =5.

Die Größenordnung der physiologischen Kreatininclearance einer Niere (~25 ml/min/10 kg) als Markierung der beendigten Reparaturphase wird ohne Kältekonservierung am 9. Tag mit Kältekonservierung 11 Tage später, am 20. Tag erreicht.

Eine physiologische Diurese ist ohne Kältekonservierung am 21. post-Op Tag gegeben, mit Kältekonservierung bleibt die transplantierte Niere bis zum Ende der Untersuchung mit 2.4 ml/min leicht polyurisch.

Die Harnkonzentrierungsfähigkeit wird nach Kältekonservierung wesentlich später am 28. post-Op Tag erreicht gegenüber der Serie ohne Kältekonservierung sind physiologische Verhältnisse bereits ab dem 4. post-Op Tag vorhanden.

6.3 Pathophysiologie der Ischämie/Reperfusion in der reimplantierten Niere nach Kältelagerung: Möglichkeiten der Beeinflussung

Der Reperfusionsschaden wird in erheblichem Maß durch reduzierte Sauerstoffradikale mit hoher Zelltoxizität hervorgerufen. Günstige Voraussetzungen für diesen Pathomechanismen wurden noch zusätzlich durch die kalte Organlagerung geschaffen. Reaktive Sauerstoffradikale sind in erheblichem Maße durch die Xanthinoxidase bei der Verstoffwechsellung der Nukleotide angefallen. Zugabe von Allopurinol hätte die Bildung eindämmen können, da Allopurinol die Umwandlung von Hypoxanthins in Xanthin blockiert.

Sauerstoffradikale sind während der Reperfusion vorwiegend in den proximalen Tubuluszellen angefallen, wofür die mangelhafte Natriumresorption und hohe Urin-Natriumkonzentration spricht. Zusätzlich muss es zu einer vermehrten Entstehung von Sauerstoffradikalen während der Kältekonserverung gekommen sein. Ein möglicher Ansatz zur Therapie bzw. Prävention des ANV könnte in der Blockade der iNOS liegen [42]. Weiterhin lässt die Schwere des ANV in unserer Versuchsreihe auf eine doch erhebliche Freisetzung von Eisen mit Entstehung des höchst membran- und zelltoxischen Hydroxylradikal während der kühlen Transplantatlagerung schlussfolgern. Zugabe von Deferoxamin zur Konservierungslösung hätte die Zelltoxizität von Eisen eingedämmt, weil Deferoxamin neben antioxidativen Eigenschaften eine Zellschutzfunktion durch eine Stimulation der Hämoxigenase, EPO und VEGF über Aktivierung des HIF-1 besitzt [18].

Die Arbeitsgruppe um Salahudeen [18, 47, 53] hatte gezeigt, dass ein Nierenschaden durch Kältelagerung über eine Apoptose der Tubuluszellen zu einem schwereren und protrahiertem Verlauf des postoperativen Akuten Nierenversagens führt.

Nach Reimplantation des kältekonserverten und isoliert perfundierten Organes muss eine Apoptose subletal verletzter Zellen in hohem Maße stattgefunden haben [14]. Die Signale zur Auslösung einer Apoptose sind eine aktive biologische Leistung und setzen einen lebenden Organismus voraus. Die mitochondriale Schädigung durch die kalte Organlagerung in unserer Versuchsreihe hat durch Öffnung der Membranporen die Apoptose ausgelöst. Es ist in unserer Versuchsreihe davon auszugehen, dass die Execution Phase der Apoptose durch die drei folgenden Mechanismen initiiert wurde [18, 27, 31, 47, 53, 54]:

1. Rezeptor vermittelte Apoptose durch Expression von proapoptotischen Rezeptoren für Fas-Ligand (CD95) und Tumor Nekrose Faktor (TNF $-\alpha$) [14].
2. Default Pathway (Fehlen von Wachstumsfaktoren)
3. Verlust von Zell-Zell Kontakten und Zell- Matrix Kontakten

Schließlich sind die Ergebnisse auch für die Forschung auf dem Gebiet der Xenotransplantation von Schweinenieren insofern von Bedeutung als damit der natürliche postoperative Verlauf der Nierenfunktion nach Transplantation ohne den Einfluss einer allogenen Immunreaktion im Schweinemodel dokumentiert werden kann.

6.4 Schlussfolgerung

1. Die Ischämie durch Organentnahme erzeugt funktionelle Schäden, die sich in der nachfolgenden isoliert hämoperfundierte Niere manifestieren. Dabei bestehen Unterschiede zwischen Hämoperfusion nach 24 h Kältelagerung und Hämoperfusion direkt nach Organentnahme.

Es besteht grundsätzlich ein vaskulärer Schaden mit Anstieg des renalen Gefäßwiderstandes, ein glomerulärer Schaden mit herabgesetzter GFR und ein tubulärer Schaden mit erniedrigter RF_{Na^+} . Nach 24-h Kältelagerung ist der vaskuläre Schaden nach Überwindung der kälteinduzierten Vasokonstriktion in der gleichen Größenordnung wie ohne vorangehende Kältelagerung. Das gleiche gilt auch annähernd für die glomeruläre Filtration. Der tubuläre Schaden ist nach Kältelagerung wesentlich stärker. Ursächlich ist eine intensivere Abdiffusion von ATP-Spaltprodukten aus der Tubuluszelle während der Kältelagerung, die eine schnelle ATP-Resynthese nach Wiederherstellung der Sauerstoffzufuhr behindert.

2. Die Daten der Arbeitsgruppe Salahudeen [18, 27, 31, 47, 53, 54] zeigen den apoptotischen Zellschaden durch Kälte induziert. Der Verlauf des nach Reimplantation einer 24 h kältegelagerten Niere zeigt sowohl eine verlängerte Erhaltungsphase als auch eine längere Reparaturphase. Dieser Effekt ist auf die zusätzliche Apoptose der Tubuluszellen im Empfängertier zurückzuführen, nachdem alle anderen Parameter wie warme Ischämiezeit in beiden Serien identisch waren. Hier sind unsere Befunde eine direkte Bestätigung der ausgeprägteren Intensität sowie den deutlich verlängerten Zeitintervallen des ANV nach Kältekonservierung

[14]. Die glomeruläre Funktion wird von einer apoptotischen Zelltransformation offenbar weniger betroffen; die Werte sind in beiden Serien weniger different. Über den Mechanismus der glomerulo-tubulären Balance wird die glomeruläre Filtration durch den tubulären Schaden aber mit beeinflusst.

Die zusätzliche Apoptose von Tubuluszellen ist als Antwort des Organismus auf durch die Kältelagerung entstandene Zellschädigung einzuordnen. Die ATP-Resynthese in den Tubuluszellen ist nach Kältelagerung offensichtlich stärker behindert. Dieser Mechanismus treibt die betroffenen Zellen in einen apoptoseauslösenden Zustand [14]. Die Ausführung einer Apoptose setzt Signale voraus, die nur von einem intakten Organismus generiert werden können. Dabei handelt es sich um die Bildung von Fas-Ligand und der Inangsetzung des „default Pathway“. Da diese Funktionsverluste nach autologer Reimplantation nicht auf alloimmunogene Einflüsse zurückzuführen sind, können die Befunde als Basis für eine Beurteilung der Nierenfunktion nach experimenteller allogener Transplantation von Schweinenieren im Rahmen der Entwicklung der Xenotransplantation verwendet werden.

3. Die Befunde lassen auch eine Aussage zu der Fragestellung zu, ob das Modell der 24h-kältekonservierten Nieren eine valide Tierversuchersatz-Methode darstellt. Der Vergleich mit den Ergebnissen aus III a zeigt bessere Ergebnisse ohne 24h- Kältekonservierung. Der Ischämie/Reperfusionsschaden wird ohne 24h-Kältekonservierung nach autologer Reimplantation schneller überwunden[14]. Die Einstellung normaler Nierenfunktion ist allerdings als Ausdruck der vollzogenen Anpassung an den Status der „Einnierigkeit“, vermutlich unabhängig von der vorangehenden Kältekonservierung. In der Serie III a ist diese Anpassung innerhalb von 21 Tagen in den Bereichen Kreatininclearance und renale Osmoregulation jedenfalls noch nicht erreicht. Der Nierenschaden ausgelöst durch vorangehende Ischämie während der Organentnahme ist in der nachfolgenden ex vivo Hämoperfusion mit autologem Blut in der Serie von U. Hennen deutlich geringer. Die praktischen Bedeutung dieses Sachverhaltes liegt in der Tatsache, dass Schlachthof Organe nicht an dem der Schlachtung folgenden Tag zu Hämoperfusionsexperimenten eingesetzt werden sollten. Eine experimentelle Verwendung der entnommenen Nieren am gleichen Tag ist eindeutig der Vorzug zu geben.

4. Grundsätzlich ist das Modell der isoliert hämoperfundierte Niere nur begrenzt zur Untersuchung physiologischer Vorgänge geeignet. Dagegen können pharmakologische Fragestellungen im Zusammenhang mit einem Ischämie/Reperfusionsschaden unter dem Aspekt Organprotektion sehr gut mit diesem Modell untersucht werden. Insbesondere könnten Fragestellungen bezüglich Strategien zur Vermeidung einer Apoptose nach Kältelagerung mit diesem speziell dafür validen Modell untersucht werden.

5. Die Technik der isolierten Organfunktion, angewandt von der Firma „TransMedics“, mindert das Risiko postoperativer Komplikationen, wie Transplantatfehlfunktionen oder die verspätete Funktionsaufnahme des Transplantates. [16, 14].

Der tubuläre Schaden ist nach isolierter Organperfusion wesentlich weniger ausgebildet. Ursächlich ist eine schwächere bis aufgehobene Abdiffusion von ATP-Spaltprodukten aus der Tubuluszelle.

Der apoptotische Zellschaden durch Kälte induziert fällt nach isolierter Organperfusion weg. Erhaltungsphase und Reparaturphase sind verkürzt, da die Apoptose der Tubuluszellen im Empfängertier ausgeschaltet ist. Deshalb wird der Aufenthalt im Krankenhaus durch das sofort funktionierende Organ verkürzt. Weniger Medikamente zur Behandlung der Komplikationen müssen eingesetzt werden und die Zahl der Retransplantationen nimmt ab[14].

Die ATP-Resynthese in den Tubuluszellen ist nach isolierter Organperfusion wesentlich weniger behindert. An dem perfundiertem Organ können ausgiebige Funktionstests sowie Tests zur Gewebekompatibilität durchgeführt werden. [16]

7 ZUSAMMENFASSUNG

Um das Ausmaß der funktionellen Organschädigung nach Kältekonservierung aufzuzeigen, wurde der direkte Vergleich der Versuchsreihe, bestehend aus 5 Schweinen, 24 h Kältekonservierung, 90 minütiger isolierter Hämoperfusion und autologer Reimplantation bei gleichzeitiger kontralateraler Nephrektomie ohne Kältekonservierung angestellt.

Zur Beurteilung und zum Vergleich der Nierenfunktion wurden vor, während der Organentnahme, der Perfusion und 42 Tage nach autologer Reimplantation, Untersuchungen durchgeführt.

Während der Hämoperfusion wurde in der Serie mit Kältekonservierung initial ein 3-fach höherer Gefäßwiderstand nachgewiesen. Nach ca. 90 Minuten Hämoperfusion hatten beide Serien einen fast gleichen Wert angenommen, der aber immer noch 3-fach über der Norm lag.

Ohne 24-h Kältelagerung werden nur Ischiämieschäden sichtbar, die auf die vorangegangene warme Ischämie zurückgeführt werden können (reversibler Verlust der Zellpolarität der Tubuluszellen, Basolaterale Verschiebung der Na^+/K^+ -ATPase).

Während der Hämoperfusion mit 24-h Kältelagerung werden Schäden sichtbar, die besonders im tubulären System angesiedelt sind und die auf eine Verzögerung der ATP-Resynthese zurückgeführt werden können. Während der Kältelagerung sind die ATP-Spaltprodukte irreversibel aus den Tubuluszellen herausdiffundiert.

Nach autologer Reimplantation ohne 24-h Kältelagerung besteht ein kurzfristiges polyurisches ANV durch I/R-Schaden infolge der warmen Ischämie.

Nach autologer Reimplantation mit 24-h Kältelagerung ist das ANV wesentlich stärker ausgeprägt. Hier kommt eine zusätzliche Apoptose der Tubuluszellen durch die fehlende kurzfristige Verfügbarkeit von ATP auslösend zum Tragen.

Nach autologer Reimplantation kam es in beiden Serien zu einer sofortigen Funktionsaufnahme der Nieren kenntlich am Einsetzen einer Diurese. Das akute Nierenversagen nach autologer Reimplantation mit vorangehender Kältelagerung ist aber erheblich ausgeprägter im Vergleich zur sofortigen Reimplantation. Der Verlauf des nach Reimplantation einer 24 h kältegelagerten Niere zeigt sowohl eine verlängert Erhaltungsphase als auch eine längere Reparaturphase

Zusammenfassung

Die glomeruläre Funktion war eingangs in beiden Serien etwa gleich stark auf ~15 % der Norm eingeschränkt. Das Maximum des ANV beurteilt am Serum-Kreatinin und am Serum-Harnstoff lag ohne Kältekonservierung am 2. Tag bei 7.6 mg/dl und mit Kältekonservierung am 5. Tag bei 15.9 mg/dl. Ab diesem Zeitpunkt ist die Reparaturphase der glomerulären Funktion anzusetzen.

Der Vergleich beider Versuchsreihen nach autologer Reimplantation zeigt durch das Erreichen der physiologischen Kreatininclearance einer Niere (~25 ml/min/10 kg) die Beendigung der Reparaturphase an. Dieser Zeitpunkt wird ohne Kältekonservierung bereits am 9. Tag und mit Kältekonservierung erst am 20. Tag nach autologer Reimplantation erreicht. Die Einschränkung der glomerulären Funktion wird durch Obstruktion in den Sammelrohren durch Konglomerate aus tubulären nekrotischem Debris und Tamm-Horsefall Protein erklärt.

Die tubuläre Funktion zeigte dagegen deutlichere Unterschiede. Hier war die RF_{Na^+} während der Erhaltungsphase des ANV in der Serie ohne Kältekonservierung nur auf 84.5 % eingeschränkt, in der eigenen dagegen auf 23.4 %, was als Ausdruck einer wesentlich weitergehenden Minderung der transtubulären Ionentransporte zu interpretieren ist. Die RF_{Na^+} ist jedoch bereits am 6. bzw. 7. post-Op Tag in den beiden Serien wieder „physiologisch“. Dieser Parameter zeigt physiologische Verhältnisse in intakten Nephren an.

Offenbar haben in unserer Serie wesentlich stärker Zellnekrosen stattgefunden. Hier ist sicher die Nichtverfügbarkeit von Nukleosiden (Adenosin und Guanosin) zur Resynthese von ATP entscheidend. Diese Produkte diffundieren während der Kältekonservierung aus den Tubuluszellen irreversible heraus. Dieser Effekt ist auf die zusätzlich verstärkte Apoptose im Empfängertier zurückzuführen, da alle anderen Parameter wie z.B. die warme Ischämiezeit in beiden Serien identisch waren. Die zusätzliche Apoptose von Tubuluszellen ist als Antwort des Organismus auf durch die Kältelagerung entstandene Zellschädigung einzuordnen. Die ATP-Resynthese in den Tubuluszellen ist nach Kältelagerung von daher offensichtlich stärker behindert. Dieser Mechanismus treibt die betroffenen Zellen in einen apoptoseauslösenden Zustand. Die Ausführung einer Apoptose setzt Signale voraus, die nur von einem intakten Organismus generiert werden können.

8 LITERATURVERZEICHNIS

1. Moore, F.D., J.P. Merrill, and J.E. Murray, *Life and contributions of David Hume*. Transplant Proc, 1974. **6**(4 Suppl 1): p. 153-63.
2. Hamburger, J., G. Richet, and B. Antoine, [*Medical and biological aspects of attempted renal transplant in human.*]. Minerva Med, 1954. **45**(41): p. 1462-8.
3. Hrabalova, M., Bachleda, P., Lubuska, L., Kojecky, Z., Zadrazil, J., Krejci, K., Al Jabry, *Effect of various protective solutions on function after kidney transplantation*. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 2003. **147**(2): p. 197-202.
4. Bessems, M., Doorschodt, B. M. van Vliet, A. K., van Gulik, T. M., *Preservation of rat livers by cold storage: a comparison between the University of Wisconsin solution and Hypothermosol*. Ann Transplant, 2004. **9**(2): p. 35-7.
5. Fehrenberg, C. von Baeyer, H. Unger, V. Schmitt, R. Haider, W. Quarcoo, D. Groneberg, D. A. Grosse-Siestrup, C. , *Protective effects of B2 preservation solution in comparison to a standard solution (histidine-tryptophan-ketoglutarate/Bretschneider) in a model of isolated autologous hemoperfused porcine kidney*. Nephron Physiol, 2004. **96**(2): p. p52-8.
6. Robinson, B.H., *Monitoring the artificial kidney*. Biomed Eng, 1970. **5**(4): p. 184-9.
7. Hauet, T., Baumert, H., Amor, I. B., Goujon, J. M., Gibelin, H., Godart, C. Vandewalle, A., Carretier, M., Eugene, M., *Protection of autotransplanted pig kidneys from ischemia-reperfusion injury by polyethylene glycol*. Transplantation, 2000. **70**(11): p. 1569-75.
8. Brasile, L., E. Green, and C. Haisch, *Warm ex vivo perfusion prevents reperfusion injury in warm ischemically damaged kidneys*. Transplant Proc, 1997. **29**(8): p. 3422-3.
9. Frodin, L., Engberg, A., Aallskog, O., Wolgast, M., *Renal transplantation in the rat. IV. Cortical pressure gradients measured in vivo and during isolated perfusion with reference to renal function after transplantation*. Scand J Clin Lab Invest, 1975. **35**(5): p. 463-72.
10. Johnston, P.A., Bernard, D. B., Perrin, N. S., Levinsky, N. G ., *Prostaglandins mediate the vasodilatory effect of mannitol in the hypoperfused rat kidney*. J Clin Invest, 1981. **68**(1): p. 127-33.
11. Sonnenberg, H. and P. Deetjen, [*Methods for Perfusing Single Nephron Segments.*]. Pflugers Arch Gesamte Physiol Menschen Tiere, 1964. **278**: p. 669-74.
12. Saltzstein, E.C., J.D. Villarica, and M.M. Bortin, *Perfusion of an isolated renal allograft*. Am J Surg, 1966. **111**(6): p. 877-80.

13. Grosse-Siestrup, C., Pfeffer, J., Unger, V., Nagel, S., Witt, C., Fischer, A., Groneberg, D. A., *Isolated hemoperfused slaughterhouse livers as a valid model to study hepatotoxicity*. *Toxicol Pathol*, 2002. **30**(6): p. 749-54.
14. La Manna, G., Conte, D., Cappuccilli, M. L., Nardo, B., D'Addio, F., Puviani, L., Comai, G., Bianchi, F., Bertelli, R., Lanci, N., Donati, G., Scolari, M. P., Faenza, A., Stefoni, S., *An in vivo autotransplant model of renal preservation: cold storage versus machine perfusion in the prevention of ischemia/reperfusion injury*. *Artif Organs*, 2009. **33**(7): p. 565-70.
15. Dittrich, S., Schuth, A., von Baeyer, H., Grosse-Siestrup, C., Lange, P., Kaczmarczyk, G., *[Effect of blood viscosity on the function of isolated perfused porcine kidney after cold preservation]*. *Zentralbl Chir*, 1998. **123**(7): p. 809-13.
16. Hosgood, S.A., Yang, B., Bagul, A., Mohamed, I. H., Nicholson, M. L., *A comparison of hypothermic machine perfusion versus static cold storage in an experimental model of renal ischemia reperfusion injury*. *Transplantation*, 2010. **89**(7): p. 830-7.
17. Schrier, R.W., Wang, W., Poole, B., Mitra, A., *Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy*. *J Clin Invest*, 2004. **114**(1): p. 5-14.
18. Salahudeen, A.K., *Cold ischemic injury of transplanted kidneys: new insights from experimental studies*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2004. **287**(2): p. F181-7.
19. Walb, D., *[Urinary diagnostics and simple kidney function tests in general practice]*. *Z Allgemeinmed*, 1972. **48**(30): p. 1381-4.
20. Dragun, D., Hoff, U., Park, J. K., Qun, Y., Schneider, W., Luft, F. C., Haller, H., *Ischemia-reperfusion injury in renal transplantation is independent of the immunologic background*. *Kidney Int*, 2000. **58**(5): p. 2166-77.
21. Sutton, T.A., C.J. Fisher, and B.A. Molitoris, *Microvascular endothelial injury and dysfunction during ischemic acute renal failure*. *Kidney Int*, 2002. **62**(5): p. 1539-49.
22. Bonventre, J.V. and J.M. Weinberg, *Recent advances in the pathophysiology of ischemic acute renal failure*. *J Am Soc Nephrol*, 2003. **14**(8): p. 2199-210.
23. de Souza Durao, M., Jr., Razvickas, C. V., Goncalves, E. A, Okano, I., Camargo, S. M., Monte, J. C. dos Santos, O. F., *The role of growth factors on renal tubular cells submitted to hypoxia and deprived of glucose*. *Ren Fail*, 2003. **25**(3): p. 341-53.
24. Ruschitzka, F., Shaw, S., Gygi, D., Noll, G., Barton, M., Luscher, T. F., *Endothelial dysfunction in acute renal failure: role of circulating and tissue endothelin-1*. *J Am Soc Nephrol*, 1999. **10**(5): p. 953-62.
25. Lameire, N.H. and R. Vanholder, *Pathophysiology of ischaemic acute renal failure*. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*, 2004. **18**(1): p. 21-36.
26. Guan, Z., Gobe, G., Willgoss, D., Endre, Z. H., *Renal endothelial dysfunction and impaired autoregulation after ischemia-reperfusion injury result from excess nitric oxide*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2006. **291**(3): p. F619-28.

27. Salahudeen, A.K., M. Joshi, and J.K. Jenkins, *Apoptosis versus necrosis during cold storage and rewarming of human renal proximal tubular cells*. *Transplantation*, 2001. **72**(5): p. 798-804.
28. Wiegele, G., M. Brandis, and L.B. Zimmerhackl, *Apoptosis and necrosis during ischaemia in renal tubular cells (LLC-PK1 and MDCK)*. *Nephrol Dial Transplant*, 1998. **13**(5): p. 1158-67.
29. Liu, X., Drognitz, O., Neeff, H., Benz, S., Hopt, U. T., *Apoptosis is caused by prolonged organ preservation and blocked by apoptosis inhibitor in experimental rat pancreatic grafts*. *Transplant Proc*, 2004. **36**(4): p. 1209-10.
30. Brenner, R.s., *The Kidney*. Vol. 1. 2006. 951-958.
31. Salahudeen, A.K., Huang, H.Joshi, M., Moore, N. A., Jenkins, J. K., *Involvement of the mitochondrial pathway in cold storage and rewarming-associated apoptosis of human renal proximal tubular cells*. *Am J Transplant*, 2003. **3**(3): p. 273-80.
32. Homsy, E., P. Janino, and J.B. de Faria, *Role of caspases on cell death, inflammation, and cell cycle in glycerol-induced acute renal failure*. *Kidney Int*, 2006. **69**(8): p. 1385-92.
33. Mueller, T.H., Kienle, K., Beham, A., Geissler, E. K., Jauch, K. W., Rentsch, M., *Caspase 3 inhibition improves survival and reduces early graft injury after ischemia and reperfusion in rat liver transplantation*. *Transplantation*, 2004. **78**(9): p. 1267-73.
34. Ueda, N., G.P. Kaushal, and S.V. Shah, *Apoptotic mechanisms in acute renal failure*. *Am J Med*, 2000. **108**(5): p. 403-15.
35. Zimmermann, K.C., C. Bonzon, and D.R. Green, *The machinery of programmed cell death*. *Pharmacol Ther*, 2001. **92**(1): p. 57-70.
36. Feldmann, G. Haouzi, D.Moreau, A., Durand-Schneider, A. M., Bringuier, A., Berson, A., Mansouri, A., Fau, D., Pessayre, D., *Opening of the mitochondrial permeability transition pore causes matrix expansion and outer membrane rupture in Fas-mediated hepatic apoptosis in mice*. *Hepatology*, 2000. **31**(3): p. 674-83.
37. Yamamoto, T., Tada, T., Brodsky, S. V., Tanaka, H., Noiri, E., Kajiya, F., Goligorsky, M. S., *Intravital videomicroscopy of peritubular capillaries in renal ischemia*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2002. **282**(6): p. F1150-5.
38. Goligorsky, M.S., *Whispers and shouts in the pathogenesis of acute renal ischaemia*. *Nephrol Dial Transplant*, 2005. **20**(2): p. 261-6.
39. Yagil, Y., B.D. Myers, and R.L. Jamison, *Course and pathogenesis of postischemic acute renal failure in the rat*. *Am J Physiol*, 1988. **255**(2 Pt 2): p. F257-64.
40. Panicker, J.N., R.K. Visweswaran, and M. Thomas, *Evolving trends in the etiopathogenesis of acute renal failure*. *J Assoc Physicians India*, 2000. **48**(9): p. 907-12.

41. Boratynska, M., D. Kaminska, and O. Mazanowska, [*Prevention and therapy of ischemia-reperfusion injury in renal transplantation*]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 2004. **58**: p. 9-17.
42. Goligorsky, M.S., S.V. Brodsky, and E. Noiri, *Nitric oxide in acute renal failure: NOS versus NOS*. *Kidney Int*, 2002. **61**(3): p. 855-61.
43. Rauen, U. and H. de Groot, *Cold-induced release of reactive oxygen species as a decisive mediator of hypothermia injury to cultured liver cells*. *Free Radic Biol Med*, 1998. **24**(7-8): p. 1316-23.
44. Magovern, J.A., Prophet, G. A., Pae, W. E., Jr., Pierce, W. S., *A permanent arterial access system*. *ASAIO Trans*, 1988. **34**(3): p. 460-2.
45. Grosse-Siestrup, C. and A.M. Lajous-Petter, *Totally implantable catheter system in the dog*. *J Invest Surg*, 1990. **3**(4): p. 373-85.
46. Waldmann, K.H., M. Wendt, and K. Bickhardt, [*Creatinine clearance as the foundation for clinical determination of kidney function in swine*]. *Tierarztl Prax*, 1991. **19**(4): p. 373-80.
47. Salahudeen, A.K., *Cold ischemic injury of transplanted organs: some new strategies against an old problem*. *Am J Transplant*, 2004. **4**(1): p. 1.
48. Hauet, T., J.M. Goujon, and A. Vandewalle, *To what extent can limiting cold ischaemia/reperfusion injury prevent delayed graft function?* *Nephrol Dial Transplant*, 2001. **16**(10): p. 1982-5.
49. Brodsky, S.V., Yamamoto T., Tada, T., Kim, B., Chen, J., Kajiya, F., Goligorsky, M. S., *Endothelial dysfunction in ischemic acute renal failure: rescue by transplanted endothelial cells*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2002. **282**(6): p. F1140-9.
50. Kwon, O., Nelson, W. J., Sibley, R., Huie, P., Scandling, J. D., Dafoe, D., Alfrey, .Myers, B. D., *Backleak, tight junctions, and cell-cell adhesion in postischemic injury to the renal allograft*. *J Clin Invest*, 1998. **101**(10): p. 2054-64.
51. Basile, D.P., Donohoe, D., Roethe, K., Osborn, J. L., *Renal ischemic injury results in permanent damage to peritubular capillaries and influences long-term function*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2001. **281**(5): p. F887-99.
52. von Baeyer, H., Haeberle, D. A., van Liew, J. B.Hare, D., *Glomerular tubular balance of renal D-glucose transport during hyperglycemia: clearance and micropuncture studies on its characterisation at saturated transport conditions*. *Pflugers Arch*, 1980. **384**(1): p. 39-47.
53. Salahudeen, A.K., *Consequences of cold ischemic injury of kidneys in clinical transplantation*. *J Investig Med*, 2004. **52**(5): p. 296-8.
54. Salahudeen, A.K., N. Haider, and W. May, *Cold ischemia and the reduced long-term survival of cadaveric renal allografts*. *Kidney Int*, 2004. **65**(2): p. 713-8.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ADH	Antidiuretisches Hormon
ANV	Akutes Nierenversagen
Apaf-1	Apoptose-protease-activating factor-1
ATN	Akute Tubulusnekrose
BMELV	Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz
EC	Euro-Collinslösung
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
K_f	glomerulärer Ultrafiltrationkoeffizient
RBF	Renaler Blutflusses
$R_{f_{Na^+}}$	Natriumresorptionsfraktion
RVR	Renal vascular Resistance
S3 Segment	Abschnitt des Tubulus rectus proximalis im äußeren Streifen des äußeren Markes
SNGFR	Single Nephron GFR
Tx	Transplantation
UW	University of Wisconsin (Konservierungslösung)

Danksagung

Für die Überlassung des Themas und die geduldige Anleitung bei der Abfassung dieser Dissertation bin ich Herrn Prof. Dr. H. v. Baeyer zu großem Dank verpflichtet.

Herrn Priv. Doz. Dr. C. Große-Siestrup bin ich für die wertvollen Anregungen und die unkomplizierte Zusammenarbeit sehr dankbar.

Herrn Prof. Dr. E.S. Bücherl †, Herrn Dr. Koen de Jonge † und Herrn Dr. Michael Meissler danke ich für die Durchführung der Operationen, die freundschaftliche Zusammenarbeit und ihre enorme Hilfsbereitschaft.

Herrn Dr. Jörn Frank † danke ich für die technische Durchführung der Perfusionen, Herrn Volker Unger für seine nimmermüde Unterstützung bei der statistischen Bearbeitung der Daten.

Ich danke meinem Kollegen Herr Ulrich Hennen für seine engagierte Mitarbeit.

Den OP-Schwestern und den Tierpflegern danke ich für ihre freundliche Mitarbeit und Unterstützung.

Und natürlich meiner Ehefrau Marlies für Ihre aufmunternden Worte und Bestärkung niemals aufzugeben.

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht
enthalten.

Erklärung

„Ich, Stefan Wiegert, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: [Unilaterale Reimplantation von Schweinenieren nach normothermer isolierter Hämoperfusion mit und ohne vorangehender Kältekonserverung: Ablauf der postoperativen Nierenfunktion] selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift