

## 1. Diskussion

In dieser Arbeit sollte im Modell der isoliert normotherm hämoperfundierten Schweineniere an mindestens 20 Nieren untersucht werden, ob der Zusatz von Albumin zum Perfusionsmedium die Nierenfunktion verbessern kann.

In einer zweiten Gruppe sollen dem Blut zu Beginn der Perfusion geringe Mengen Albumin (6 g/l) zugesetzt werden. Eine dritte Gruppe erhält die größte Albuminsubstitution (20 g/l).

Die Ergebnisse in diesen drei Gruppen werden untereinander verglichen und ausgewertet.

### A) Albumin und Perfusionsmedium

Albumin wird in der Medizin zu unterschiedlichen Zwecken eingesetzt, z. B. als Therapeutikum einer Hypoproteinämie oder einer Hypoalbuminämie (Hartmann *et al.* 1996). Kolloide im Allgemeinen finden außerdem häufig bei der Prävention oder der Korrektur einer Hypovolämie, besonders in der Chirurgie, Verwendung. Sie sind effektiver als kristalloide Lösungen, aber auch teurer und verursachen häufiger Nebenwirkungen. Auch bei den kolloidalen Substanzen untereinander sind große Differenzen bezüglich ihrer pharmakologischen und pharmakokinetischen Eigenschaften vorhanden, ebenso wie unterschiedliche hämodynamische Effekte und Nebenwirkungen (Boldt *et al.* 2005).

Bei Wirkungsuntersuchungen von Albumin und synthetischen Kolloiden auf die Gerinnung und die klinischen Konsequenzen fand man heraus, dass alle untersuchten Kolloide mit den physikalischen Mechanismen der Hämostasis interferieren. Dies geschieht entweder nicht-spezifisch aufgrund der veränderten Hämodilution, jedoch auch spezifisch durch Wechselwirkungen mit Thrombozyten, Koagulationsproteinen und dem fibrinolytischen System. Dabei verursachte Albumin, verglichen mit synthetischen Kolloiden, die geringsten Veränderungen bezüglich der Hämostasis (Van der Linden *et al.* 2006).

Albumin und andere Kolloide (Dextrane, HES, Gelatine) sind bei chirurgischen Eingriffen von Nutzen für die Aufrechterhaltung der renalen Perfusion und Nierenfunktion. Beim Einsatz von Hydroxyethylstärke (HES), Dextranen und Gelatine treten in einer Untersuchung von Davidson 2006 unerwünschte renale Nebenwirkungen auf. Albumin hingegen weist eine relativ große therapeutische Breite bezüglich der renalen Funktionen auf. Weitergehend scheint Albumin zusätzliche protektive Effekte auf die Nierenfunktion zu haben, wozu die

## Diskussion

Hemmung der Apoptose und das Abfangen von reaktiven Sauerstoffradikalen gehören (Davidson 2006).

In einer anderen Studie wurde die postoperative Administration von Kolloiden (Albumin, HES und Gelatine) nach kardialen Eingriffen als Kurzinfusion mit Wirkung auf die Hämostasis untersucht. Auch hier hat Albumin den geringsten Einfluss auf hämostatische Variablen, während die Verwendung von HES oder Gelatine nach einer kardiopulmonalen Bypass-Operation bei Patienten durch Beeinträchtigung der Gerinnung zu einem erhöhten Blutverlust führen können (Niemi *et al.* 2006).

Diese Ergebnisse beruhen jedoch auf experimentellen Studien. In klinischen Studien hat sich dies bisher nicht immer bestätigt (Boldt 2003).

Bei der Durchführung isolierter Organperfusionen sind in der Vergangenheit immer wieder Probleme aufgetreten. Der Vorteil von Blut als Perfusionsmedium gegenüber zellfreien Perfusionslösungen ist in der Literatur anerkannt (Cuypers *et al.* 2000; Grosse-Siestrup *et al.* 2002; Hochel *et al.* 2003; Nui *et al.* 2006). Durch Blut wird die Ödematisierung des Organs im Vergleich zu zellfreien Perfusionsmedien vermindert und dadurch ein konsequenter Verlust renaler Funktionen zumindest eingeschränkt (Grosse-Siestrup *et al.* 2003).

Die isoliert normotherme Hämoperfusion erlaubt die Untersuchung renaler Parameter unter nahezu physiologischen Bedingungen, anders als bei der Verwendung anderer (insbesondere zellfreier) Perfusionsmedien. Zusätzlich findet bei isoliert normothermen Hämoperfusion eine Arterialisierung durch Gasaustausch und eine Entgiftung des Blutes durch Dialyse statt (Baeyer *et al.* 1997; Grosse-Siestrup *et al.* 2002)

Trotzdem ist es in der Vergangenheit noch nicht gelungen, eine Methode zu entwickeln, die alle auftretenden Unzulänglichkeiten verhindern kann.

Ziel ist es, die isolierte Organperfusion so zu verbessern, dass Schädigungen durch Ischämie bzw. Reperfusion weiter vermindert werden können, ebenso wie die Schädigung des Blutes im extrakorporalen Kreislauf, bei der es durch Hämolyse zum Erythrozytenverlust kommt. Der Grad der Hämolyse ist abhängig vom Perfusionsdruck, den verwendeten Schlauchmaterialien und auch vom Antriebssystem (Arnaud *et al.* 2000; Wagner *et al.* 2003).

Eine Möglichkeit zur Verbesserung stellt die ischämische Präkonditionierung dar. Das Organ kann sich quasi durch kurze wiederholte Ischämieperioden an eine unumgängliche längere Ischämie „gewöhnen“ (Schauer 2000; Treska *et al.* 2006).

Auch eine präoperative immunsuppressive Medikation des Spenders kann signifikant die Entstehung reaktiver Sauerstoffradikale und inflammatorischer Zytokine nach einer Nierentransplantation vermindern (Treska *et al.* 2006)

## Diskussion

Reperfusionsschäden können auch durch Zugabe verschiedener Substanzen zum Perfusionsmedium vermindert werden. So dient Glutathion als Radikalfänger (Bilzer 1998), das Polysaccharid Fucoidin vermindert die Leukozytenadhäsion (Dittrich *et al.* 2002), der Konservierungslösung zugesetztes L-Arginin dient als Substrat für die NO-Synthese (Erkasap *et al.* 2000). Ebenso wurde im Rattenmodell erfolgreich der Zusatz von Rapamycin getestet (Inman *et al.* 2003).

In der Literatur wird über den Einsatz von Albumin zur Verbesserung von Blutkreisläufen widersprüchlich diskutiert. Bei der isolierten Perfusion der Rattenleber wird eine Krebs-Henseleit-Lösung ohne Albuminzusatz bevorzugt (Bessems *et al.* 2006)

Eine Studie der isolierten Herzperfusion beim Meerschweinchen brachte für den Albuminzusatz zur Krebs-Henseleit-Lösung die besten Ergebnisse bezüglich der Prävention der extravasalen Flüssigkeitsansammlungen gegenüber HES und saliner Lösung. Nur in der Albumingruppe zeigte die Elektronenmikroskopie eine unbeschädigte Glykokalix der Endothelien (Jacob *et al.* 2006).

In einer klinischen Studie bei Patienten mit exzessivem Flüssigkeitsverlust verursachte die glomeruläre Filtration hyperonkotischer Kolloide (Dextrane, 10 %iges HES, 20 %iges Albumin) sogar hyperviskösen Urin mit Stase des tubulären Flusses. Dies führt zur Obstruktion des tubulären Lumens (Rozich *et al.* 1989).

Um herauszufinden, in welcher Dosierung der Albuminzusatz Vorteile für die isolierte Nierenperfusion erbringt, haben wir den Gruppen in dieser Versuchsreihe unterschiedliche Albuminmengen zugesetzt.

### **B) Hämodynamik**

In *Gruppe 1* (ohne Albuminzusatz) ist der **renale Widerstand** während der Perfusion am niedrigsten (zwischen 0,24 und 0,26 mm Hg\*min/ml\*100 g NG). In den *Gruppen 2* und *3* (mit Albuminzusatz) ist der renale Widerstand bis zu letzten Messung nach 180 Minuten um etwa 10 mm Hg\*min/ml\*100 g NG größer, ab diesem Zeitpunkt differieren die Werte nur noch um 4 – 6 mm Hg\*min/ml\*100 g NG.

Der renale Organwiderstand setzt sich rechnerisch aus arteriellem Mitteldruck und renalem Blutfluss ( $Q_B$ ) zusammen ( $R = (P_{art} - P_{ven}) / Q_B$  (mm Hg \* min/ml\*100 g)).

Der **arterielle Mitteldruck** in *Gruppe 1* beträgt ab der 60. Perfusionsminute 92, in *Gruppe 2* 95 mm Hg und in *Gruppe 3* 91 mm Hg. Die Blutflussgeschwindigkeit (**renalere Blutfluss**) wurde im Hinblick auf die Konstanzhaltung des arteriellen Mitteldruckes bei mindestens 80

mm Hg ab dem „steady state“ in der 60. Minute manuell angepasst. Die druckorientierte Perfusion wird auch von (Breimer *et al.* 1996) angewandt, hier mit druckkonstanten 100 mm Hg. Laut (Paquet 1965 b) werden bei einer pulslosen Perfusion ischämisch vorgeschädigte Gefäße stärker geschädigt als dies bei einer pulsatilen Durchströmung der Fall ist. Grund dafür ist, dass in Wirklichkeit mit höherem Druck perfundiert wird, als angezeigt wird. Ein großer renaler Widerstand kann ein Hinweis auf Überdruckschädigungen sein.

Wichtig war es, den renalen Widerstand gering zu halten und Überdruckschäden zu vermeiden. Daher haben wir dem Blut vor Beginn der Perfusion den  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanalblocker Verapamil zugesetzt und eine druckorientierte Perfusion durchgeführt. So konnten auch (Hvistendahl *et al.* 2001) den renalen Widerstand (bei ähnlicher GFR und renalem Blutfluss in den Gruppen) mit Verapamil nach unilateraler Ureterobstruktion im Schwein gering halten. Durch die Abklemmung der Blutgefäße intra operationem und der Manipulation an der Niere kommt es durch Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) unter anderem zu einer Vasokonstriktion.

Verapamil trägt vorrangig zur Gefäßdilataion präglomerulärer Gefäße bei und hilft so, die vasokonstriktorisches Wirkungen des Angiotensin II abzuschwächen. Somit kann mit einer besseren Blutversorgung auch ein ausreichendes Sauerstoffangebot für die Niere erzielt werden (Nakamoto *et al.* 1988).

Allerdings ist bei Wirksamkeitsuntersuchungen von Pharmaka an der isolierten Niere der Einsatz von Medikamenten (wie Verapamil) vorsichtig zu betrachten, da es theoretisch zu einer unerwünschten Beeinflussung des zu testenden Pharmakons kommen kann. Für unsere Aufgabenstellung stand jedoch die Vermeidung von Schädigungen im Vordergrund.

### **C) Hämatologische Ergebnisse**

Ein Blick auf die **Erythrozytenanzahl** bestätigt eindrücklich die diesbezüglichen Ergebnisse von (Sumpelmann *et al.* 2000; Sumpelmann *et al.* 2001).

Der Erythrozytengehalt im Ausgangsblut (Nullwert) liegt zwischen 5,26 (Erythrozyten\* $10^{12}/l$ ) für *Gruppe 3* und 6,15 (Erythrozyten\* $10^{12}/l$ ) für *Gruppe 2*.

In *Gruppe 1* (ohne Albuminzusatz) sinkt der Erythrozytengehalt im Zeitverlauf stetig ab auf letztlich 4,24 (Erythrozyten\* $10^{12}/l$ ), wenn auch mit größerer Streuung. Die *Gruppe 2* weist ebenfalls sinkende Werte auf, nur in *Gruppe 3* kann die Anzahl der Erythrozyten während der Perfusion relativ konstant bleiben.

## Diskussion

Albumin ist in der Lage, eine Zellaggregation der Erythrozyten zu verhindern und damit einer Verklumpung im Hämofilter (Dialysem modul) entgegen zu wirken (Unger *et al.* 2005). Es beschichtet die Erythrozytenmembranen gleichmäßig und verhindert so eine Brückenbildung (Bedell *et al.* 1985; Boldt 2000; Sumpelmann *et al.* 2000).

Die Verminderung der Erythrozytenanzahl in den *Gruppen 1* und *2* ist z. T. auf Erythrozytenansammlungen im Hämofilter zurückzuführen. Unger *et al.* konnten 2005 nachweisen, dass der Zusatz von Albumin zu heparinisiertem porcinen Blut in einem standardisiertem *in vitro* Kreislauf die Häm- und Plasmafiltration verbessern kann. Albumin (und auch HES) vermindert die Anzahl der durch Blutzellen verstopften kapillären Membranen im Hämofilter (Unger *et al.* 2005).

Erythrozyten, die in der semipermeablen Dialysemembran hängen bleiben, werden natürlicherweise dem Blutkreislauf entzogen und vermindern zusätzlich die Fläche für den Stoffaustausch. Das Organ wird durch den Wegfall der Erythrozyten mit weniger Sauerstoff versorgt (Unger *et al.* 2005).

In *Gruppe 2* sinkt der Erythrozytengehalt trotz zusätzlicher Gabe von 6 g Albumin/l Blut kontinuierlich ab. Dies wird verständlich durch einen Blick auf das freie Hämoglobin. In dieser Gruppe stellt weniger die Filterverstopfung eine Erklärung für den Verlust von Erythrozyten dar (davor schützt das Albumin), sondern die stetig ansteigende Hämolyserate während der Perfusion. Ab der 60. Perfusionsminute weist *Gruppe 2* signifikant höhere Werte für freies Hämoglobin auf als die *Gruppen 1* und *3*. Eine mögliche Erklärung hierfür stellt das Antriebssystem der *Gruppe 2* dar. In dieser Gruppe werden herkömmliche Rollenpumpen verwendet, bei der Perfusion der *Gruppen 1* und *3* werden pneumatische Blutpumpen mit pulsatilem Antrieb eingesetzt.

Rollenpumpen können das Blut durch mechanische Belastung traumatisieren (van der Hoeven *et al.* 1998). Fünf verschiedene Antriebssysteme wurden bezüglich ihrer Hämolyserate mit Schweineblut getestet (unter anderem auch die von uns verwendete Rollenpumpe). Außerdem waren noch 2 weitere Rollenpumpen, eine Wechselkammerpumpe und eine Pulspumpe im Einsatz. Die Auswertung zeigt, dass für die Puls- und Wechsellpumpe der Index der Hämolyse um 50 – 60 % niedriger liegt als bei den Rollenpumpen (van der Hoeven *et al.* 1998).

Auch in einer anderen Untersuchung werden größere Hämolyseraten für eine Standard-Rollenpumpe bestätigt (Bennett *et al.* 2004).

## Diskussion

Die beobachteten Veränderungen des Erythrozytengehaltes setzen sich bei den **Hämoglobin-** und **Hämatokritwerten** fort. *Gruppe 3* (mit 20 g Albumin/l) weist die einzigen konstant bleibenden Werte für Erythrozytenanzahl, Hämoglobin und Hämatokrit während der Perfusion auf.

Der Einsatz der Rollenpumpen bei der Perfusion der *Gruppe 2* muss kritisch betrachtet werden. Der technische Ausfall der pneumatischen Blutpumpen auf unbestimmte Zeit machte den Austausch jedoch notwendig. Deshalb beschlossen wir, die gesamte *Gruppe 2* mit Rollenpumpenantrieb zu perfundieren.

Die Zugabe von Albumin verändert natürlich die relative Zusammensetzung des Blutes. Der **kolloidosmotische Druck (KOD)**, der normalerweise zum größten Teil durch Albumin bestimmt wird, wird erhöht. Der KOD aller drei Gruppen liegt in der Nullprobe zwischen 12,1 und 13,9 mm Hg. In *Gruppe 1* sinkt er während der Perfusion kontinuierlich auf 6,6 mm Hg ab. Die Zugabe von 6 g Albumin/l Blut in *Gruppe 2* führt zu einem weniger starken Abfall auf 9 mm Hg.

Durch die Substitution von 20 g Albumin/l Blut in *Gruppe 3* steigt der KOD sprunghaft auf 20 mm Hg an und bleibt auch in diesem Bereich. In dieser Gruppe sind große Streuungen zu beobachten. Durch das zusätzliche Albumin im Perfusionsmedium als onkotisch wirksame Substanz kommt es über die semipermeable Membran des Hämofilters zu einem Flüssigkeitseinstrom aus dem Dialysat. Das Wasser fließt zur Seite des höheren onkotischen Druckes, also zur Blutseite.

Da die Dialysatmenge über den Perfusionsverlauf konstant bleiben soll, erfolgt eine ständige manuelle Gegenregulierung über die Rollenpumpenantriebe des Dialysatkreislaufs. Diese Schwankungen werden sichtbar in der Größe der Streuung in *Gruppe 3*.

In einer *in vitro* Studie wurde 2001 der Einfluss des Albumin/Globulin-Verhältnisses (AGR) auf den transmembranären Druck (TMP) im Hämofilter untersucht. Ein größeres AGR, erzielt durch zusätzliche Gabe von Albumin, führt zu einem niedrigeren transmembranären Druck. Dies wiederum ermöglicht eine höhere Durchblutung und größere Filtrationsraten im extrakorporalen Kreislauf (Unger *et al.* 2001).

Durch den erhöhten KOD der zusätzlich albuminisierten Gruppen ist auch die geringere Ödematisierung der Nieren dieser Gruppen zu erklären. Die Nieren der *Gruppe 1* erfahren eine **relative Gewichtszunahme** von fast 40 % im Vergleich zu ihren Ausgangsgewichten vor der Konservierung. Diese Zunahme ist signifikant größer als bei den anderen beiden Gruppen. Erwartungsgemäß vermindert sich die relative Gewichtszunahme, die durch interstitielle Ödematisierung bedingt ist, mit zunehmender Albuminkonzentration.

Die höheren KOD-Werte in *Gruppe 3* haben auch Einfluss auf die gebildete Urinmenge/Zeiteinheit (s. Diskussion der Nierenfunktionsparameter).

Angestrebt wurde eine möglichst hohe **Perfusionsrate** bei kontrolliertem und konstantem Druck (mittlerer arterieller Druck von 80 – 100 mm Hg), damit die Sauerstoffversorgung des Organs optimal ist. Es ist nicht auszuschließen, dass hierbei eine Ausspülung des Interstitiums durch die relativ hohen Flussraten stattfinden kann (Sone et al. 1995), die als Folge eine Einschränkung in der Aufrechterhaltung des osmotischen kortikomedullären Gradienten mit sich bringen (De Mello et al. 1976; Sone et al. 1995).

Tubuläre Schädigungen entstehen größtenteils sekundär infolge eines ischämischen Nierenschadens. Es kann zu einem passiven Rückfluss filtrierter Stoffe über die Tubuli in das renale Interstitium kommen, dem sog. „Backleak“ (Kirby 1989). Ursache ist der Verlust der Polarität der Tubuluszellen. Daraufhin kommt es zu einer Neuverteilung der  $\beta$ 1-Integrine von der basolateralen auf die apikale Seite. Die Folge ist das Ablösen der Tubuluszellen von der Basalmembran, diese verklumpen und verlegen die Lumina (Joannidis 2003).

Die Reversibilität der Nierenfunktionsstörung ist abhängig vom Ausmaß des Tubulusschadens. In unseren Versuchsreihen konnten derart große Schäden bis zur vierten Perfusionsstunde vermieden werden. Keine der untersuchten Nieren wies eine An- bzw. Oligurie auf.

#### **D) Nierenfunktionsparameter und Urin/Plasma-Quotient**

Die Höhe der **Urinproduktion** in den *Gruppen 1* (zwischen 5,4 und 9) und *2* (zwischen 4,9 und 7,3 ml/min/100 g NG) deutet auf polyurische Nieren hin. In *Gruppe 3* liegen die Werte zwischen 2 und 3 ml/min/100 g NG. Dies legt die Vermutung nahe, dass der höchste kolloidosmotische Druck (zwischen 13 und 21 mm Hg) im Blut dieser Gruppe einer starken Diurese entgegen wirkt.

In der Studie von (Breimer et al. 1996) werden 1996 Untersuchungen im Schweinenierenmodell zur Xenotransplantation durchgeführt. Nach Verabreichung eines Diuretikums (Furosemid) produzieren die Nieren  $4,6 \pm 0,8$  ml/min/100 g NG Urin, jedoch unter anderen Perfusionsbedingungen als in dieser Versuchsreihe (viel kürzere kalte Ischämiedauer).

Die Urinproduktion lebender und gesunder Hausschweine liegt bei 1 ml Urin/min\*100 g NG (Unger et al. 2007).

Dies bestärkt die Vermutung einer Schädigung der Nieren in den *Gruppen 1* und *2*, zumindest die Konzentrationsfähigkeit des Organs betreffend. Unterstützt wird der Aspekt durch den **Urin/Plasma-Quotienten der Osmolalität**. Ein Wert  $> 1$  bedeutet, dass die Niere in der Lage ist, den Harn zu konzentrieren. Werte  $< 1$  zeigen einen hypoosmolalen Urin an.

## Diskussion

Die Werte für diesen Quotienten liegen in den *Gruppen 1* und *2* beständig unter 1. Nur in *Gruppe 3* werden nach 60 Perfusionsminuten 1,04 erreicht. Zu den anderen Messzeitpunkten liegt der Quotient nur knapp darunter.

In einer isolierten Hämoperfusion mit Schweinenieren aus dem Schlachthof werden nach 60 Minuten Werte von  $3,6 \pm 0,3$  ml Urin pro min/100 g NG erzielt (Grosse-Siestrup *et al.* 2002).

Allerdings darf nicht außer Acht gelassen werden, dass in dem Modell der isolierten Organperfusion naturgemäß keine Gegenregulierung über eine ADH-Ausschüttung erfolgen kann. Die Niere wird während der Organentnahme denerviert und der Feedbackmechanismus über Hypothalamus und Hypophyse fällt weg. Navar findet 1978 einen Feedbackmechanismus mit Beteiligung spezialisierter Zellen der *Macula densa* und des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems. Die spezialisierten Zellen sind in der Lage, die NaCl-Konzentration im Blut zu messen und so eine  $Ca^{++}$  - vermittelte Regulation des Gefäßtonus in den afferenten Arteriolen in Gang zu setzen (Navar 1978).

In Abwesenheit von ADH kommt es zur Wasserdiurese. Ohne dieses Hormon ist die Wasserdurchlässigkeit im Sammelrohr sehr gering, es kann kein Wasser mehr rückabsorbiert werden (Lang *et al.* 2000). Körper eigene Regulationsmechanismen werden außer Kraft gesetzt (Paquet 1965 a; Neew-Galuschka *et al.* 1998).

Ein weiterer Faktor zur Begünstigung einer Diurese ist das Absinken des Hämatokrits im Perfusionsverlauf (wie auch in den *Gruppen 1* und *2* aufgetreten), dabei sinkt auch die Urin-Osmolalität (Lieberthal *et al.* 1987). Auch wird in der Literatur für die nicht-pulsatile Perfusion eine größere Urinbildung/Zeiteinheit angegeben als für pulsatile Perfusionssysteme (Paquet 1965 a).

Andere Erklärungen für eine mangelnde Harnkonzentrierung sind ein akutes Nierenversagen oder eine Obstruktion ableitender Harnwege. Nach einer 60-minütigen Ischämie ist mit den ersten Auswirkungen auf die Harnkonzentrierung zu rechnen (Beck *et al.* 1992).

Auch eine teilweise Obstruktion der ableitenden Harnwege kann zu hypotoner Polyurie führen (Faber *et al.* 1992).

Ferner kommt hinzu, dass wir zum Ausgleich des Flüssigkeitsverlustes durch die Urinbildung eine gleiche Menge physiologischer Elektrolytlösung zum Blutvolumen hinzu gegeben haben. Dadurch kommt es phasenweise zu einer Hämodilution, was sich auf den effektiven Filtrationsdruck auswirkt.

Der effektive Filtrationsdruck setzt sich zusammen aus der Differenz des Perfusionsdruckes und dem kolloidosmotischen Druck in den glomerulären Kapillaren. Durch Hämodilution wird auch der KOD in den glomerulären Kapillaren erniedrigt, dies führt zu einer Anhebung des effektiven Filtrationsdruckes und so zu einer vermehrten Filtration mit sich anschließender Diurese.



Als Maß für die **glomeruläre Filtrationsrate (GFR)** wird die **exogene Kreatinin-Clearance** verwendet. Kreatinin entsteht **endogen** als Endprodukt des Muskelstoffwechsels permanent in relativ konstanter Höhe. Da es sich in dieser Versuchsreihe um eine isolierte Nierenperfusion handelt und die **endogene** Kreatininproduktion somit wegfällt, wurde dem Dialysat eine bestimmte Menge Kreatinin zugesetzt.

Die Kreatinin-Clearance korreliert mit der mit exogen zugeführtem Inulin gemessenen GFR, zeigt allerdings im Mittel um 7 % höhere Werte an, was beim Schwein auf eine geringe tubuläre Sekretion schließen lässt (Waldmann *et al.* 1991). Für diese Versuchsreihe ergibt dies jedoch eine genügend sichere Aussage.

**Gruppe 2** weist bis zuletzt die niedrigste Kreatinin-Clearance auf (zwischen 14 und 17 ml/min/100 g NG). Die Werte der beiden anderen Gruppen ähneln einander im Verlauf: nach 60 Minuten liegen die Werte bei knapp 30 ml/min/100 g NG, am Ende der Perfusion bei 17 (**Gruppe 3**) bzw. 21 ml/min/100 g NG (**Gruppe 1**). Die Gruppen 1 und 3 weisen besonders nach 60 und 120 Perfusionsminuten höhere Kreatinin-Clearancewerte auf. Dies erklärt sich durch den höheren renalen Blutfluss (QB, s. 4.1.1.). In einer Versuchsreihe an isoliert perfundierten Schweinenieren lässt sich feststellen, dass diejenige Gruppe, die den höchsten renalen Blutfluss ( $357 \pm 58$  ml/min\*100 g NG) aufweist, auch die größte Kreatinin-Clearance ( $65 \pm 11$  ml/min\*100 g NG) erzielt (Unger *et al.* 2006).

Die *in vivo* Referenzwerte der GFR (allerdings an wachen und fixierten Schweinen) liegen zwischen  $2,8 \pm 0,1$  ml/min/kg KGW (Waldmann *et al.* 1991) und  $3,5$  ml/min/kg KGW (Wendt *et al.* 1990). Diese Werte beziehen sich auf die Leistungen beider Nieren.

Breimer *et al.* geben 1996 für die Inulin-Clearance Werte von 41 – 67 ml/min/100 g NG an.

Referenzwerte für die endogene Kreatinin-Clearance nur einer Niere sind bei (Gyrd-Hansen *et al.* 1969) zu finden, nämlich 1,2 – 2 ml/min/kg KGW. Dies ist die *in vivo* Leistung einer Schweineniere 10 Tage *post operationem* einer *unilateralen Nephrektomie*.

Isoliert perfundierte Nieren geschlachteter Schweine weisen nach einstündiger Perfusion Werte von  $19,4 \pm 2,7$  ml/min/100 g NG auf, nach zwei Stunden liegen die Werte noch bei  $18,7 \pm 2,6$  ml/min/100 g NG (Grosse-Siestrup *et al.* 2002).

Ebenfalls isoliert perfundierte Nieren geschlachteter Schweine einer anderen Studie reichen an die Ergebnisse dieser Versuchsreihe (**Gruppe 1**: zwischen 22 und 29; **Gruppe 2** zwischen 14 und 17; **Gruppe 3** zwischen 17 und 28 ml/min\*100 g NG) nicht heran: nach 2-stündiger kalter Ischämie erzielt eine Gruppe autolog normotherm hämoperfundierter Schweinenieren eine mittlere Kreatinin-Clearance von  $10,6 \pm 2,8$  (perfundiert ohne Leukozyten im Perfusionsmedium) bzw.  $1,9 \pm 1$  ml/min\*100 g NG (ohne Leukozytendepletion) (Harper *et al.* 2006). Allerdings wurden in dieser Versuchsreihe mit einer wesentlich geringeren Perfusionsrate (renaler Blutfluss von  $73 \pm 17$  ml/min\*100 g NG) gearbeitet (Harper *et al.*

## Diskussion

2006). Im Vergleich dazu liegen die Werte für den renalen Blutfluss in der aktuellen Versuchsreihe bei über 200 ml/min\*100 g NG.

Prinzipiell ist die GFR bzw. Kreatinin-Clearance in isoliert perfundierten Organen niedriger als *in vivo*, wobei tiefer gelegene Nephronen stärker beeinträchtigt werden als oberflächliche Bereiche. (De Mello et al. 1976) nach, dass die Einzelnephron-GFR in oberflächlich liegenden Nephronen um 20 bis 30 % sinkt, und in tiefen Nephronen sogar um 50 %.

Als Erklärung für die niedrigere Kreatinin-Clearance in *Gruppe 2* könnte, wie oben schon angeführt, die veränderte Zusammensetzung des Blutes durch den höchsten Erythrozytenverlust (durch Hämolyse) angeführt werden. Durch den verminderten Erythrozytengehalt wird auch die Viskosität des Perfusionsmediums verändert.

Außerdem können Zelltrümmer durch zerstörte Erythrozyten die Filtrationsleistung der Niere beeinträchtigen (Feola et al. 1990)

Auch Fehler bei der Urinvolumenbestimmung können die GFR beeinflussen. Verlegte Tubuli oder das oben erwähnte „Backleak“ – Phänomen täuschen eine niedrigere GFR vor.

Außerdem kommt es bei einer Störung der Natriumreabsorption zu einer tubuloglomerulären Rückkopplung. In deren Verlauf wird die GFR reduziert, um weitere Na<sup>+</sup> - Verluste zu vermeiden (Schnermann et al. 1969).

An Rattennieren wurde Albumin dem Perfusionsmedium in unterschiedlichen Konzentrationen (0 – 80 g/l) zugesetzt und die Auswirkungen auf die GFR überprüft (Schurek et al. 1981). Hier korrelierte die Perfusionsflussrate direkt mit der Albuminkonzentration. Bei hohen Albuminkonzentrationen trat die niedrigste GFR auf, und die höchste GFR wurde bei fehlendem Albumin gemessen (wobei das letzte Ergebnis sich nicht mit den Ergebnissen anderer *in vitro* Studien deckt, bei denen ein Fehlen des Albumins eine reduzierte GFR verursachte (Bowman et al. 1974; Little et al. 1974). Als Ursache der reduzierten GFR bei Schurek et al. (1981) wurde ein urethraler Gegendruck vermutet, verursacht durch die Verwendung zu enger Harnkatheter.

Dies ist eine Erklärung, die für die aktuelle Versuchsreihe aufgrund der Kathetergröße bei Schweinen nicht in Frage kommt.

Ein Blick auf die **Urin/Plasma-Quotienten für Protein** zeigt, dass die Werte der beiden zusätzlich albuminsierten Gruppen (*Gruppen 2 und 3*) bis zur 60. Minute deutlich größer sind als in *Gruppe 1*. Beim **Urin/Protein-Quotienten für Albumin** sind die Unterschiede während der ersten beiden Stunden sogar signifikant.

## Diskussion

Während bei den *Gruppen 2* und *3* die Werte tendenziell absinken, steigen diese in *Gruppe 1* bis zum letzten Messzeitpunkt an. Hier könnte bei den Nieren der *Gruppe 1* im tubulären Bereich eine Schädigung vorliegen, wodurch vermehrt Proteine in den Endharn gelangen.

Die Proteinreabsorption im Tubulussystem erfolgt durch Pinozytose (Lang *et al.* 2000). Für das Schwein wird ein Proteingehalt im Endharn von 300 – 500 mg/l angegeben (Waldmann *et al.* 1991). In unserer Versuchsreihe erreichen die Werte in den Anfangsphasen ein Vielfaches.

Zum größten Teil dürfte dies durch Zelldebris bedingt sein, verursacht durch ischämisch geschädigte Tubuluszellen. Dies ist auch bei den Untersuchungen von (Schumer M. *et al.* 1992; Zager *et al.* 1994) der Fall.

Von einer ischämischen Phase sind zuerst die juxtamedullären Anteile der Nephrone betroffen. Die oberflächlich gelegenen Nephrone sind weniger ischämieempfindlich (Mason *et al.* 1983; Brezis *et al.* 1984) Dies ist eine häufige Ursache für die mangelnde Konzentrationsfähigkeit der Nieren einer isolierten Perfusion, da sich in den superficialen Nephronen die kurzen Henle'sche Schleifen befinden. Im Vergleich zu den langen Henle'schen Schleifen, die sich näher an der Medulla befinden, tragen sie weniger zur Konzentrierung des Urins bei.

Untergegangene Zellen werden zu Beginn der Perfusion ausgespült, z. T. ist dies in unseren Versuchen mit bloßem Auge erkennbar. Ferner können hypoxisch bedingte Schäden an präglomerulären und glomerulären Gefäßen die Durchlässigkeit für Proteine kurzfristig erhöhen. Proteinablagerungen in den Tubuli verursachen glomeruläre und tubulointerstitielle Schädigungen (Chien *et al.* 2001).

Ein interessanter Parameter im Zusammenhang mit unterschiedlichen Albuminkonzentrationen stellt die **Reabsorptionsfraktion Natrium** dar. Dies bezeichnet den prozentualen Anteil des reabsorbierten Natriums aus dem glomerulären Filtrat.

Unter physiologischen Bedingungen liegen die *in vivo* Werte bei 99 %, etwa 1 % wird mit dem Urin ausgeschieden. Im proximalen Tubulus werden bis zu 60 % des Natriums absorbiert, in der Henle'schen Schleife 15 – 20 % und die restlichen 10 – 15 % im distalen Tubulus (Hartmann 1994).

In unseren Versuchen weist *Gruppe 3* mit jeweils mehr als 90 % während der ganzen Perfusion die signifikant höchsten Werte der Absorptionsfraktion für Natrium auf. Die Werte in *Gruppe 1* bleiben zwar konstant, aber nur bei Werten von 76 – 80 %. In *Gruppe 2* war sogar ein permanenter Abfall auf zuletzt 50 % zu beobachten.

Bei Nieren, die Schweinen während des Schlachtprozesses im Schlachthof entnommen wurden, konnte jedoch eine Reabsorptionsfraktion für Natrium von  $91,1 \pm 7,6$  % erreicht werden (Dittrich *et al.* 1998), und das trotz schlechterer äußerer Bedingungen im Vergleich

## Diskussion

zum Operationssaal. Die Nieren der aktuellen Versuchsreihe stammen von narkotisierten Schweinen im Operationssaal. Da den Tieren Leber und Extremitäten anlässlich anderer Versuchsreihen entnommen und ebenfalls isoliert perfundiert wurden, bot sich für uns die Möglichkeit innerhalb dieser Operation auch die Nieren zu entnehmen. Daher griffen wir für diese Versuchsreihe nicht auf Schlachthofnieren zurück.

Verschiedene *in vitro* Untersuchungen haben eine positive Korrelation der Natriumreabsorptionsfraktion mit der Proteinkonzentration im Blut gezeigt (Spitzer *et al.* 1970; Imai *et al.* 1972; Bowman *et al.* 1974).

Erklärt wird dies durch den hohen kolloidosmotischen Druck der peritubulären Zellseite, wodurch das „Backleak“ – Phänomen reduziert wird und der transepitheliale Transport von Flüssigkeit und gelösten Substanzen gesteigert wird.

Außerdem sind natürlich auch in diesem Bereich die physiologischen Regelmechanismen durch die Abkopplung des Organs vom Körper ausgeschaltet. Antinatriuretische Regulationen sind ohne Sympathikusaktivität, Angiotensin und Aldosteron nicht mehr möglich, auch der ADH-Mangel wirkt sich auf den Natrium-Haushalt der isoliert perfundierten Niere aus (Lieberthal *et al.* 1987)

Im distalen Tubulus und der Henle Schleife erfolgt die Natriumreabsorption aktiv. Da unsere Nieren keine physiologische Reabsorptionsfraktion Natrium von 99 % aufweisen, ist von einer Beeinträchtigung der Tubuli durch Ischämie und Reperfusionsschaden auszugehen. Da die Natriumreabsorption vermindert ist, muss mehr Natrium ausgeschieden worden sein. Dennoch führte dies nicht zu einem hyperosmolalen Urin. Durch die verminderte Absorption der Elektrolyte wird auch im Interstitium die eigentlich vorhandene Hyperosmolalität beeinträchtigt und mehr Wasser ausgeschieden.

*In vivo* korreliert die Natriumreabsorption mit dem Sauerstoffverbrauch. Die Natriumreabsorption ist der Prozess, der unter physiologischen Bedingungen den größten Teil am renalen Sauerstoffverbrauch ausmacht. Die Ischämieempfindlichkeit der Niere macht sich hauptsächlich an diesem Parameter bemerkbar (Baeyer *et al.* 1997)

Zur Darstellung der Kopplung dieser beiden Parameter (Sauerstoffverbrauch und Natriumreabsorption) wurde für unsere Auswertung eine lineare Regression gewählt (s. 2.8. Lineare Regression).

*Gruppe 1* (ohne zusätzliches Albumin) weist mit  $R^2 = 0,05$  den niedrigsten Wert für das Bestimmtheitsmaß auf. In dieser Gruppe wurden im Schnitt 10 Mol  $\text{Na}^+$  pro Mol  $\text{O}_2$  verbraucht. In *Gruppe 2* waren es 20 Mol  $\text{Na}^+$  pro Mol  $\text{O}_2$  ( $R^2 = 0,22$ ) und in *Gruppe 3* 10 Mol  $\text{Na}^+$  pro Mol  $\text{O}_2$  ( $R^2 = 0,14$ ).

## Diskussion

In keiner der Gruppen ist eine positive Korrelation von Natriumreabsorption und Sauerstoffverbrauch zu sehen. Aus den jeweiligen Boxplots ist ersichtlich, dass *Gruppe 2* ( $1,6 \pm 2,08$  mmol/min\*100 g NG) in der 60. Perfusionsminute den niedrigsten Wert für die Natriumreabsorption aufweist, im Vergleich zu *Gruppe 1* ( $3,22 \pm 1,16$  mmol/min\*100 g NG) sogar mit signifikantem Unterschied. Zu diesem Zeitpunkt liegt der Sauerstoffverbrauch aller Gruppen jedoch in ähnlichen Wertebereichen (zwischen 0,131 und 0,137 mmol/min\*100g). Also kann besonders in dieser Gruppe die Natriumreabsorption nicht der entscheidende Faktor für die Menge des Sauerstoffverbrauchs sein.

Die korrelierte Regressionsgerade, wie sie in der Versuchsreihe an lebenden Hunden (s. 2.8.) erstellt wurde (Deetjen *et al.* 1976), konnte in unseren Versuchen leider nicht erzielt werden.

Theoretisch könnte hierfür ein vermehrter Ausfall von Nephronen in Frage kommen. Der innere Bereich des äußeren Marks weist eine besondere Blutversorgung auf. Während der Perfusion können „Shunts“ auftreten und zu einer lokalen Minderversorgung führen, was auch bei hohen Flussraten mit gut oxygeniertem Perfusionsmedium auftreten kann (Alcorn *et al.* 1981). Ein Anstieg im Sauerstoffverbrauch kann aber auch ein Zeichen für Reparationsvorgänge an geschädigten Zellen sein.

Laut Brezis *et al.* (1984) geht die starke Abhängigkeit des Sauerstoffverbrauchs von der  $\text{Na}^+$ -Reabsorption v.a. von den medullären Anteilen der Niere und speziell von den dicken aufsteigenden Schenkeln der Henle'schen Schleife aus.

Eine Störung der Natriumreabsorption ist gekennzeichnet durch einen Anstieg der  $\text{Na}^+$  - Konzentration und einen Abfall der  $\text{K}^+$  - Konzentration im Urin zu Beginn der Perfusion. Dies kann in unseren Versuchsreihen nur schwer beurteilt werden, da es zu Beginn der Perfusion zu einem starken Abfall der  $\text{K}^+$  - Konzentration im Urin kommt, verursacht durch das Ausspülen der restlichen von Bayer-II-Konservierungslösung in der Niere und den Schlauchsystemen. Diese weist als intrazelluläre Konservierungslösung einen hohen Kalium-Gehalt von 150 mmol/l auf.

### **E) Histologische Ergebnisse**

In den Tubuli der ohne Albuminzugabe perfundierten Nieren (*Gruppe 1*) ist eine hydropische Vakuolisierung ohne Proteinablagerung zu sehen. Hydropische Schwellungen (mit oder ohne Vakuolisierung) können entstehen durch ATP-Mangel, Membranschädigungen unterschiedlicher Genese oder auch Störungen des Wasser- und Elektrolythaushaltes. Auch bei einer an Hundenieren durchgeführten Reperfusion von Lazar *et al.* traten 1997 nukleärer

## Diskussion

Polymorphismus und hydropische Dystrophie auf (u.a. neben interstitiellen und perivaskulären Ödemen).

Die Nieren der mit 6 g Albumin/l Blut zusätzlich substituierten *Gruppe 2* weisen hyalintropfige Speicherungen besonders in den proximalen Tubuli auf. Die Lumina der Tubuli sind z. T. geweitet. Außerdem sind Zellen mit pyknotischen Kernen zu sehen. Bei ischämisch geschädigten Nieren fallen histologisch herdförmige oder diffuse Weitstellungen der Tubuluslichtungen und Flüssigkeitsansammlungen im Interstitium auf (Weiss 1999). Je nach Ischämiedauer findet man vor allem in den proximalen Tubuli (da diese besonders ischämieempfindlich sind) trübe Schwellungen, hydropische Degenerationen und Epithelnekrosen vor (Weiss 1999). Ähnliche Ergebnisse wurden auch in einer Versuchsreihe an isoliert hämoperfundierten Schlachthofnieren nach sechsständiger Perfusion festgestellt, u.a. traten auch tubuläre Dilatationen, Kernschrumpfungen und zytoplasmatische Vakuolisierungen auf (Harper *et al.* 2006).

Kritisch anzumerken ist die nicht durchgeführte histologische Untersuchung von Nieren der *Gruppe 3*. Daher kann keine Aussage über die Auswirkung von 20 g Albumin/l während der Perfusion auf zellulärer Ebene getroffen werden.

Die geringgradigen Entzündungszeichen sind dem akuten Zeitverlauf zuzuordnen, d. h. sie sind nicht während bzw. durch die Perfusion entstanden. Gleichwohl haben sich alle Schweine in der allgemeinen Voruntersuchung als klinisch gesund dargestellt.