

Aus dem Institut für Arbeitsmedizin
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Abschätzung der Nierenfunktion unter isolierter
Hämoperfusion -**
Referenzwerte und Bewertungsverfahren für eine
Tierversuchersatzmethode

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Volker Unger

aus Sagan

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. D. Groneberg
2. Prof. Dr. med. U. Wagner
3. Priv.-Doz. Dr. P. Welker

Datum der Promotion: 13. Juli 2007

Meinen Töchtern gewidmet

Gegenstand der Publikationsdissertation.....	5
Zusammenfassung.....	6
Abstract.....	7
1 Einleitung und Zielsetzung.....	9
1.1 Hintergrund.....	9
1.2 Die Perfusion isolierter Organe.....	9
1.3 Zielsetzung.....	11
2 Methodik der Studien.....	12
2.1 Versuchsgruppen.....	12
2.2 Organgewinnung und Perfusionen.....	12
2.3 Verfahren zur graphischen Analyse von Kreatinin-Clearance und Natrium-Resorptionsfraktion an Hand eines Doppel-Nomogramms.....	14
3 Ergebnisse und Diskussion.....	15
3.1 Bewertungsverfahren zur Abschätzung physiologischer Nierentätigkeit unter isolierter Hämoperfusion.....	15
3.1.1 Kreatinin-Clearance und Natrium-Resorption.....	15
3.1.2 Spezifischer Quotient Natrium-Transport / Sauerstoffverbrauch.....	16
3.2 Modelloptimierung.....	17
3.2.1 Organkonservierung.....	17
3.2.2 Perfusat.....	18
3.2.2.1 Auswirkungen verschiedener Perfusate auf die Funktion der isolierten Niere.....	18
3.2.2.2 Perfusat-Additiv Albumin.....	19
3.2.3 Stimulus-response Messungen mit Pharmaka.....	20
3.3 Vergleichsuntersuchungen der Organfunktion bei verschiedenen Versuchsgruppen.....	22
4 Schlussfolgerungen und Ausblick.....	24
5 Literaturverzeichnis.....	26
Liste der benutzten Abkürzungen und Formeln.....	28
Erklärung zum Anteil des Doktoranden an den Publikationen.....	29
Erklärung über Selbständigkeit.....	30
Lebenslauf.....	31
Wissenschaftlicher Werdegang.....	32
Danksagung.....	36
Anhang: Titelseiten und Abstracts der in der Publikationsdissertation von Volker Unger zusammengefassten Arbeiten.....	37

Gegenstand der Publikationsdissertation

PUBLIKATION-[1]

V. Unger, C. Grosse-Siestrup, D. A. Groneberg. Evaluation of renal functional parameters in different settings of isolated organ hemoperfusions. *Physiol. Meas.* 27: 1167-1175 (2006).

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Retrieve&dopt=AbstractPlus&list_uids=17028409

PUBLIKATION-[2]

C. Fehrenberg, H. von Baeyer, **V. Unger**, R. Schmitt, W. Haider, D. Quarcoo, D. Groneberg, C. Grosse-Siestrup. Protective effects of B2 preservation solution in comparison to a standard solution (Histidine-Tryptophan-Ketoglutarate / Bretschneider) in a model of isolated autologous haemoperfused porcine kidney. *Nephron Physiol* 96: 52-58 (2004).

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Retrieve&dopt=AbstractPlus&list_uids=14988662

PUBLIKATION-[3]

J. Höchel D. Lehmann, C. Fehrenberg, **V. Unger**, D. A. Groneberg, C. Grosse-Siestrup. Effects of different perfusates on functional parameters of isolated perfused dog kidneys. *Nephrol Dial Transplant* 18(9):1748-1754 (2003).

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Retrieve&dopt=AbstractPlus&list_uids=12937220

PUBLIKATION-[4]

C. Grosse-Siestrup, **V. Unger**, M. Meissler, S. Nagel, A. Wussow, C. Peiser, A. Fischer, R. Schmitt, D. A. Groneberg. Hemoperfused Isolated Porcine Slaughterhouse Kidneys as a Valid Model for Pharmacological Studies. *J Pharm Sci* 92: 1147-1154 (2003).

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Retrieve&dopt=AbstractPlus&list_uids=12761804

PUBLIKATION-[5]

V. Unger, C. Grosse-Siestrup, C. Fehrenberg, A. Fischer, M. Meissler, D. A. Groneberg. Reference values and physiological characterization of a specific isolated pig kidney model. *J. Occup. Med. Toxicol.* 2:1 (2007)

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Retrieve&dopt=AbstractPlus&list_uids=17261183

Zusammenfassung

Hintergrund: Die isolierte hämoperfundierte Niere wird als Modell genutzt für Untersuchungen physiologischer und pathophysiologischer Aspekte renalen Verhaltens in experimenteller und klinischer Forschung, etwa in der Transplantationsmedizin und in pharmakologischen und toxikologischen Studien. Da die Schweineniere dem menschlichen Organ in Grösse und Funktion vergleichbarer ist, als die Nieren gebräuchlicher Versuchstiere wie Maus oder Ratte, steht diese Spezies hier seit einigen Jahren im Vordergrund der Forschung. Ein weiterer Vorzug kann sein, dass die Schweineorgane aus Schlachtprozessen verwendet und somit Tierversuche eingespart werden könnten.

Die Abkopplung des isolierten Organs von allen neuralen wie humoralen Kontrollmechanismen des Spenderkörpers erzeugt eine Situation, in der physiologische Normalwerte aus in vivo Studien zur Beurteilung der Funktionsgüte des Modells nur begrenzten Wert haben. Spezielle Analyse- und Bewertungsverfahren sind deshalb für dieses Modell neu bereitzustellen.

Methoden: (A) Für die Evaluation von Perfusionsqualität und Nierenfunktion wurde ein spezielles graphisches Verfahren entwickelt und hiermit wurden zwei renale Funktionsstufen untersucht: glomeruläre Filtration (Kreatinin-Clearance) und fraktionale Natrium-Resorption. Zusätzlich wurde der Kopplungsquotient Natrium-Resorption/ O₂-Konsum studiert. (B) Eine Optimierung des vorhandenen Modell-Systems wurde unternommen: mit einer speziell entwickelten Konservierungslösung, mit Perfusat-Vergleichsstudien (zellfreie Lösung vs. Vollblut), sowie mit einer Untersuchung der Wirksamkeit des Perfusatzusatzes Albumin. (C) Die Funktionalität des Modells wurde "stimulus-response"-getestet mittels zweier antagonistisch wirkender nierenspezifischer Pharmaka: Furosemid und ADH (antidiuretisches Hormon). (D) Schliesslich wurden nach diesen Vorstudien Nieren-Perfusionsreihen ausgewertet und verglichen, die mit verschiedenen Versuchsprotokollen durchgeführt wurden. Die isolierten Organe wurden entweder im Operationssaal entnommen (OP) oder im Schlachthaus gewonnen (SLA) und hatten festgelegte Konservierungszeiten (0, 2, 5, 24 Stunden). Die Ergebnisse wurden mit Untersuchungen der Nierenfunktion verglichen, die an lebenden Schweinen durchgeführt wurden (CON).

Ergebnisse: Die Verbesserung der Organkonservierung wird für dieses Modell mit einer Studie zum Vergleich der neu entwickelten Lösung mit einer herkömmlichen

Lösung demonstriert, desgleichen die Überlegenheit von Vollblut als Perfusat gegenüber zellfreier Lösung. Die Funktionalität des optimierten Perfusionsmodells konnte mit typischen Organ-Reaktionen auf die Test-Pharmaka nachgewiesen werden. Die Untersuchungen bei den verschiedenen Versuchsgruppen ergaben teilweise erhebliche Abweichungen von den in vivo Kontrollwerten. Mit Hilfe der entwickelten Auswerteverfahren werden Funktionsbereiche des Modells vorgeschlagen, die für eine Standardisierung geeignet erscheinen.

Schlussfolgerung: Die mit einem optimierten und standardisierten Nieren-Perfusionsmodell demonstrierte Annäherung an vitales Organverhalten eröffnet eine attraktive Möglichkeit zum Studium renaler Homöostase in experimenteller und klinischer Forschung, sogar dann, wenn die Organe in Routine-Schlachtprozessen gewonnen werden, was die Reduktion von Tierversuchen möglich machen kann.

Abstract

Background: Models of isolated and perfused kidneys are used to study physiological and pathophysiological aspects of renal homeostasis in experimental and clinical research, so in transplantation medicine, toxicology. Since physiological and morphological parameters of small laboratory animal kidneys are difficult to compare to human renal parameters, porcine kidney perfusion models have been developed to simulate closer conditions to the human situation. If the organs could be used out of regular slaughtering processes animal experiments may be avoided.

The isolated kidney's cut-off situation from extra-organic nervous and humoral control mechanisms gives physiological reference values out of in vivo animal studies a limited meaning and therefore comparative values and special evaluation procedures for the isolated kidney function under different organ collection and perfusion conditions have to be established for this model.

Methods: To assess isolated kidney perfusion quality, a new nomogram technique for analyzing complex physiological data was developed and 3 renal function parameters studied: creatinine-clearance, sodium reabsorption and the tubular coupling-ratio of Na-reabsorption/O₂-consumption. Model optimization was established by use of a special preservation solution, by comparing blood and

cellfree perfusates and by studying additives (albumin). The model function was “stimulus-response”-tested by application of 2 antagonistic renal pharmaca: furosemide and anti-diuretic hormone (ADH). Different perfusion settings in the model of porcine kidney hemoperfusion were finally studied and compared. The organs were collected in the operating theatre (OP) or in a public abattoir (SLA) and the perfusion results compared to the data of in vivo measurements in living animals (CON). The experimental groups had defined preservation periods (0, 2, 5, 24 hrs).

Results: The successful use of the special solution for organ preservation and the use of blood as perfusate was confirmed in comparative studies. The model validity and the usefulness of the new nomogram technique was demonstrated by typical alterations of renal function parameters after administration of the test pharmaka. Varying perfusion settings in the experimental kidney groups resulted in functional values with partly relevant differences in comparison to the in vivo control values. By help of the new developed evaluation methods characteristic areas for the organ function are to consider for model standardization.

Conclusion: In the present study functional values for isolated kidneys with different perfusion settings were determined to assess organ perfusion quality in an optimized and standardized model. It can be summarized that the hemoperfused porcine kidney can serve as a biological model with acceptable approximation to in vivo renal physiology, also if the organs originate from usual slaughtering processes.

1 Einleitung und Zielsetzung

1.1 Hintergrund

Das Thema der exogenen Einflüsse auf die Gesundheit von Mensch und Tier hat in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen und tierexperimentelle Methoden zur Analyse der Einflüsse auf verschiedene Organsysteme werden zunehmend eingesetzt. Darüberhinaus steht auf dem Gebiet der Transplantationsmedizin die Verbesserung von chirurgischen Methoden, optimierte Verfahren zur Organbewahrung sowie der Fortschritt in der Kenntnis der Abstossung transplantiert Gewebe weiterhin im Vordergrund des Interesses.

Infolgedessen führt eine wachsende öffentliche und privatwirtschaftliche Forschung auf diesen Gebieten auch zu steigenden Zahlen von Tierversuchen, welche wiederum zu einem immer größer werdenden Konflikt zwischen der notwendigen Forschung in diesem Bereich und dem ethischen Aspekt von Lebens- und Tierschutz führen. In den genannten Forschungsrichtungen sind präklinische Testmethoden erforderlich, die leicht verfügbar sind und zugleich valide Ergebnisse an großen Stichproben erlauben. Tierversuchersatzmethoden haben in diesem Zusammenhang einen hohen Stellenwert. Die Testung von neuen Substanzklassen, Arzneimittelinteraktionen, Untersuchungen zu Ischämie- und Reperfusionsschäden sowie zur Abstossung transplantiert Gewebe sind einige Anwendungsbereiche.

Die vorliegende Publikations-Dissertation thematisiert die Hämoperfusion der isolierten Niere und die zusammengefassten Arbeiten sollen beitragen, durch die Etablierung einer Tierversuchersatzmethode eine Brücke zwischen notwendiger Forschung und modernem Tierschutz zu bauen.

Dabei sollte ein modularer Einsatz verschiedener erprobter sowie neuer Techniken stattfinden, die stufenweise zu einem weitgehenden "Replacement" von Tierversuchen im Sinne des 3R Konzepts („refinement, reduction, replacement“) nach Russel und Burch, zitiert nach [6], führen könnten.

1.2 Die Perfusion isolierter Organe

In den vorliegenden Arbeiten wird die Hämoperfusion isolierter Organe als Tierversuchersatzverfahren untersucht. Der Reiz dieser Versuchsmethode liegt in der Möglichkeit nahezu optimaler physiologisch-technischer Kontrolle der

Perfusionsbedingungen bei weitgehender Vitalität des Organs. Ein weiterer Vorzug ist die Vermeidung systemischer Effekte, die die Interpretation von organspezifischen Auswirkungen in einer Studie erschweren könnten.

Deshalb ist schon früh versucht worden, dieses experimentelle Modell in der medizinischen Forschung zu etablieren [7-12]

Die Nutzung großer Säugetiere in der experimentellen Medizin hat einerseits den Vorteil, dass die Organe und Funktionssysteme dem Menschen nach Grösse und funktioneller Morphologie besser vergleichbar sind, als die von kleinen, üblichen Versuchstieren (Ratte, Maus). Dies stellt andererseits jedoch eine gewisse ethisch-emotionelle Hürde dar. Ein weiterer Vorzug der hier vor allem untersuchten Schweineorgane ist, dass sie von Schlachthöfen beschafft werden können, ohne Tiere für das spezielle Versuchsziel töten zu müssen. Damit könnten Tierversuche eingespart werden [13].

Die Hauptprobleme bei der Entwicklung derartiger Perfusionsmethoden betrafen bisher die Oxygenierung, Substratversorgung und Perfusatäquibrierung. Fortschritte konnten durch Anpassung von Methoden aus der Hämodialysetherapie erreicht werden. Ausserdem wurde ermöglicht, als Perfusat physiologisch konditioniertes Blut zu nutzen [14].

Eine Vielfalt von Organ-Perfusionssystemen sind entwickelt worden. Hingegen mangelt es im publizierten Schriftgut an spezifischen Evaluationsverfahren, Gütekriterien sowie an physiologischen Referenzwerten der Nierenfunktion für dieses Modell. Dieses ist teilweise wie folgt erklärbar: Physiologische Referenzwerte, die aus in vivo Studien an Tieren stammen, sind von begrenzter Bedeutung, wenn diese mit Messungen an isolierten Organen verglichen werden sollen, da die Organe von den humoralen und nervalen Kontrollmechanismen des Spenderkörpers abgetrennt sind, was sich im funktionellen Modellverhalten widerspiegelt. Das isolierte Organ zeigt ein „ungezügelter“ Freilauf-Verhalten.

Beispielhaft seien hier zwei Beobachtungen genannt, bei denen erhebliche Abweichungen von klinischen Normalwerten gegenüber Messungen unter isolierter Nierenperfusion festgestellt werden. So wird bei Perfusionsversuchen häufig eine Steigerung der Harnproduktion auf das 10-fache und mehr des in vivo Normalwertes beobachtet, - was, wie wir zeigen konnten [1], zum Teil (s. auch Kap. 3.2.2.2) durch das Fehlen von antidiuretischem Hormon (ADH) im geschlossenen Perfusionssystem bedingt ist – ohne, dass andere Messwerte und Beobachtungen einen Abbruch des Experiments zwingend notwendig machen,

oder dass der Versuch in toto als im klinischen Vergleich pathologisch und unverwendbar bezeichnet werden muss. Ähnliche Beobachtungen mit starken Unterschieden zu klinischen Normalwerten werden bei den Harnkonzentrationen von Natrium und Kalium beim Betreiben dieses Modells gemacht. Hier ist sicher ein Hauptgrund, dass das weitgehend extrarenal verankerte Renin-Angiotensin-Aldosteron-System als Kontrollsystem für die isolierte Niere ausfällt [15].

Somit müssen für dieses experimentelle Modell sowohl definierte, standardisierte Grenzen der Versuchsbedingungen und Einflussgrößen (z.B. Hämodynamik, Blutzusammensetzung) als auch extra angepasste Mess- und Bewertungsverfahren zur Anwendung kommen

1.3 Zielsetzung

Durch die „Freilauf“-Charakteristik der isolierten Niere bedingt, die aus diversen eigenen Vorversuchen sowie aus der Literatur bekannt war, ergaben sich im Rahmen eines längerfristigen Programms zur Entwicklung von isolierten Organ-Modellen, die Ziele für diese Untersuchung wie folgt:

1. Bewertungsansätze zur Abschätzung physiologischer Nierentätigkeit unter isolierter Hämoperfusion sollen gegenüber klinischen Verfahren adaptiert und erweitert werden.
2. Eine Modelloptimierung soll verwirklicht werden.
3. Vorhandene sowie aktuelle Messungen aus Nieren-Perfusionsversuchen sollen mit dem veränderten Ansatz evaluiert werden.

2 Methodik der Studien

2.1 Versuchsgruppen

Die isolierten Organe wurden entweder im Operationssaal entnommen (OP) oder im Schlachthaus gewonnen (SLA) und hatten festgelegte Konservierungszeiten. Die Ergebnisse wurden mit Untersuchungen der Nierenfunktion verglichen, die an lebenden Schweinen durchgeführt wurden (CON).

2.2 Organgewinnung und Perfusionen

Die Gewinnung und Präparation der isolierten Organe wird in den Publikationen ausführlich beschrieben, für die kontrollierte, sterile Entnahme im Operationsraum [5] sowie für die Organ-Gewinnung im Schlachthaus [4].

Der Perfusions- und Messablauf sei hier kurz dargestellt. Für die Perfusion isolierter Organe, modifiziert nach [14] wurde ein System mit zwei Kreisläufen eingesetzt (s. Abb. 1, 2). In einem Kreislauf wird Blut bewegt, im anderen Dialyseflüssigkeit, die - oxygeniert und temperiert - sowie, einer Homöostase entsprechend, regeneriert wird. Dem Dialysat, einer modifizierten Standard-Elektrolytlösung (Tyrode-Lösung) wird Glukose als Energiesubstrat, sowie Kreatinin als Indikator zur Bestimmung der exogenen Kreatinin-Clearance zugesetzt. Beide Kreisläufe sind durch einen Kapillardialysator osmotisch gekoppelt. Im Perfusat-Kreislauf wird das Blut durch eine Pumpe aus dem Blutreservoir (Blutbeutel) in den Kapillardialysator gepumpt, wo Dialyse, Gasaustausch und Temperaturkontrolle im Gegenstromtransfer mit dem Dialysat erfolgen. Das angereicherte Blut wird durch die zweite Pumpe vom Kapillardialysator über eine Luftfalle und eine Ultraschallsonde (Flussmessung) in die Organarterie gepumpt. Vor dem Organ befindet sich ein arterieller Zugang zur Probenentnahme. Ebenfalls hier werden der Blutdruck und die Temperatur gemessen Über eine Multifunktionssonde („Paratrend“) werden hier ausserdem kontinuierlich pH, Sauerstoffdruck, Kohlendioxidgehalt und Standardbikarbonat im Blut bestimmt.

Als Blutpumpen werden je nach Fragestellung herkömmliche, z.B. in Herz-Lungen-Maschinen benutzte Rollerpumpen oder pneumatische pulsatile Pumpen [16] (s.

Abbildung 2), wie sie auch klinisch, z.B. im Berliner Herzzentrum eingesetzt werden, verwendet.

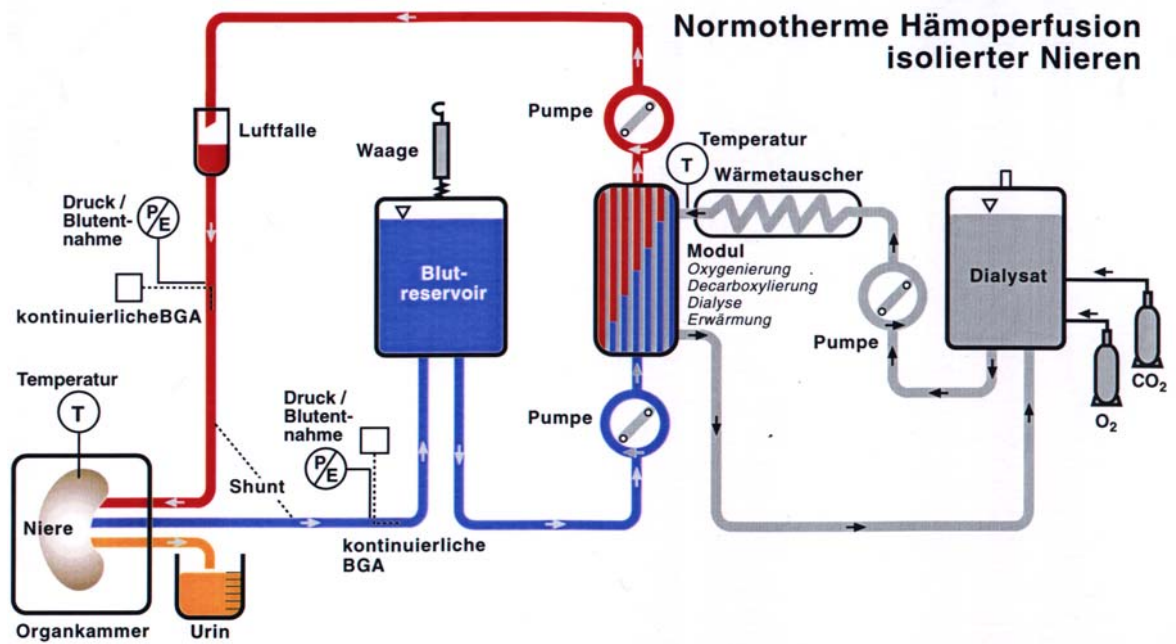


Abb. 1: Schema zur Perfusion der isolierten Niere mit Rollerpumpen



Abb. 2 Versuchsaufbau zur Perfusion der Niere (pneumatische Blutpumpen)

2.3 Verfahren zur graphischen Analyse von Kreatinin-Clearance und Natrium-Resorptionsfraktion an Hand eines Doppel-Nomogramms

Für die Evaluation von Perfusionsqualität und Nierenfunktion wurde ein spezielles graphisches Verfahren entwickelt [1]. Das Verfahren kann zur Analyse auch anderer komplexer Parameter in der Biomedizin verwendet werden. Die nomogramm-artige Präsentation physiologischer Daten wird hier zur Untersuchung zweier fundamentaler renaler Funktionsstufen benutzt, der glomerulären Filtration (1) sowie der tubulären Natrium-Behandlung (2), an Hand folgender Parameter

- (1) Kreatinin-Clearance Cl_{crea} ,
- (2) Fraktionelle Natrium-Exkretion EF_{Na} :

$$Cl_{crea} = \frac{U}{P} \times VU$$

(1)

$$EF_{Na} = \frac{\frac{U}{P}_{Na}}{\frac{U}{P}_{crea}}$$

(2)

EF_{Na} kann leicht in die fraktionelle Resorption $RF_{Na} = (1 - EF_{Na})$ umgewandelt werden. (Für die Veranschaulichung des Folgenden sei auf Abb. 3 verwiesen)

Beiden Parameter-Formeln ist der Term U/P_{crea} gemeinsam und dieser wird in einem x-y-Doppeldiagramm als y-Achse verwendet. In Teildiagramm 3a bildet VU die x-Achse, in Teildiagramm 3b wird U/P_{Na} für die x-Achse verwendet.

Ziel ist die Bildung zweier paralleler Nomogramme mit zusätzlich erzeugten Linien konstanter Kreatinin-Clearance Cl_{crea} einerseits und konstanter Natrium-Exkretionsfraktion EF_{Na} bzw. RF_{Na} andererseits als Hilfsliniennetze, um nach Übertragung der Messergebnisse aus den Experimenten mit isolierten Nieren und den Kontrolltieruntersuchungen eine vergleichende Bewertung der Daten vornehmen zu können.

Bei linearer Skalierung der Diagramm-Achsen resultieren für die Hilfsliniennetze $Cl_{crea} = \text{const.}$ bzw. $RF_{Na} = \text{const.}$ unübersichtliche Kurvenscharen, die für die Datenanalyse ungeeignet sind. Dieses ändert sich nach Transformation in logarithmische Achsenskalen. Hiernach ergeben sich parallele Geraden, (von links nach rechts) fallend für $Cl_{crea} = \text{const.}$ sowie ansteigend für $RF_{Na} = \text{const.}$ (vergl. Abb. 3)

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Bewertungsverfahren zur Abschätzung physiologischer Nierentätigkeit unter isolierter Hämoperfusion

3.1.1 Kreatinin-Clearance und Natrium-Resorption ¹

Das im Methodenteil dieser Zusammenfassung (Kap. 2.3) beschriebene, neu entwickelte graphische Evaluationsverfahren wurde in dieser Arbeit mit Studien an verschiedenen Gruppen von isolierten Nieren im Vergleich zu in vivo Kontrolluntersuchungen (CON) etabliert.

	CON	A	B	C	D	E
Perfusionsmodus	-	max	min	min	min	max
Konservierungszeit (Std)	-	no	no	no	no	24
Pharmakon	-	no	no	ADH	LAS	no
Anzahl	8	16	16	8	8	16

Tabelle 1: Gruppenübersicht

Die experimentellen Gruppen unterschieden sich hauptsächlich im Perfusionsmodus (Gruppen A und E: höchstmöglicher Blutdruck bzw. Blutfluss ohne Auftreten von Gewebetraumata, These: maximale Druck-Filtration bzw. -Diurese; Gruppen B, C, D: minimaler Blutdruck mit gerade noch filtrierender Niere; These: minimierter Auswascheffekt osmotisch aktiver Substanzen im Nierenmark und folglich Erlangung einer konzentrierenden $-U/P_{osm} > 1-$ isolierten Niere, was sonst bei diesem Modell selten beobachtet wird – s. Kap. 3.2.3) und in der Konservierungszeit (ohne Konservierung bei Gruppen A-D und in Gruppe E 24 Stunden Konservierung, Erwartung: Gruppe E mit eingeschränkter Nierenfunktion). In den Gruppen C und D wurden auf die Diurese wirkende Substanzen zu Testzwecken eingesetzt (s. Kap. 3.2.3).

Insgesamt hervorzuheben als Ergebnis dieser Untersuchung ist die Erkenntnis einer notwendigen Relativierung des bei Modell-Studien bisher allein präferierten Gütekriteriums Filtrationsleistung ($GFR \approx$ Kreatinin-Clearance). Nunmehr wird vorgeschlagen, gleichzeitig die Beurteilung der Fähigkeit der isolierten Niere, Natrium zu resorbieren sowie den Harn zu konzentrieren, vorzunehmen. Dieser

¹ V. Unger, C. Grosse-Siestrup, D. A. Groneberg. Evaluation of renal functional parameters in different settings of isolated organ hemoperfusions. *Physiol. Meas.* 27: 1167-1175 (2006)

differentielle Bewertungsprozess kann durch das vorgeschlagene graphische Verfahren transparenter gestaltet werden, was im Kap. 3.3 an Hand der Abb. 3 veranschaulicht wird.

3.1.2 Spezifischer Quotient Natrium-Transport / Sauerstoffverbrauch

Mehrere Jahre eigener Forschung an isolierten Nieren haben die Erkenntnis wachsen lassen, dass für das „freilaufende“ isolierte Organ zusätzlich zu herkömmlichen Parametern (VU, Konzentration harnpflichtiger Substanzen in Plasma und Urin) komplexere physiologische Zusammenhänge für die „Performance“-Bewertung herangezogen werden müssen.

In Kenntnis zahlreicher klassischer Studien in der Literatur [17-23] wurde die Kopplung zwischen Natrium-Resorption und Sauerstoffverbrauch für die isolierte Niere als ein möglicher, zusätzlicher Bewertungsparameter untersucht [5]. Die Natrium-Resorption ist ein aktiver, sauerstoffverbrauchender, tubulärer Prozess und die Korrelation mit dem Sauerstoffverbrauch wird in der genannten Literatur als weitgehend linear beschrieben. Dort werden Darstellungen der Beziehung zwischen beiden Faktoren präsentiert, für die die folgende Regressionsgleichung (aus [17]) typisch ist:

$$\text{O}_2\text{-consumption} = 0,121 + 0.0332 * T_{\text{Na}}$$

Der erste Term (0,121 mmol/min*100g) repräsentiert den basalen Sauerstoffverbrauch des Nierengewebes ohne jeden aktiven Natrium-Transport. Der zweite Term in reziproker Form steht für den genannten Kopplungsquotienten und beträgt hier 30,1 mmol Na⁺ / mmol O₂, welcher Wert mit guter Übereinstimmung in weiteren Studien [19, 22] für die in vivo Situation der Säugetierniere genannt wird.

In unseren Untersuchungen erhielten wir abweichende Kopplungsfaktoren (mmol Na⁺ / mmol O₂): 42,0 für perfundierte isolierte Nieren ohne Konservierung (vergleichbar Gruppe A in Kap. 3.1.1) und 50,6 bei 2 Stunden Konservierung. Im Schlachthof gewonnene Nieren mit 5 Stunden Konservierungszeit zeigten einen Kopplungsquotienten von 23,8.

Für Ansätze zur Bewertung dieser Ergebnisse sei das Folgende angemerkt: Quotienten-Werte < 30,1 bedeuten, dass mehr Sauerstoff als in vivo normalerweise für den Rücktransport des Natriums verbraucht wird, gemessen wurde. In pathologischer Ausprägung wird in dieser Situation die Generierung von

Hitzeschockproteinen (HSP's) [24] diskutiert. Diese HSP's spielen beim Ischämie-Reperfusion-Schadensyndrom, das auch für das isolierte Nieren-Modell von zentraler Bedeutung [25] ist, eine grosse Rolle.

Der gegensätzliche Fall von Kopplungs-Quotienten-Werten $> 30,1$ bedeutet, dass mehr Natrium im venösen Blut erscheint, als nach verbrauchter Sauerstoffmenge im Vergleich zu in vivo Verhältnissen physiologisch normal wäre. Hier werden tubuläre „leakage“-Prozesse diskutiert [26, 27].

3.2 Modelloptimierung

Eine Optimierung des vorhandenen Modell-Systems wurde unternommen mit den folgenden Schritten: (a) mit einer speziell entwickelten Konservierungslösung „B2“, (b) mit Perfusat-Vergleichsstudien (Vollblut - zellfreie Lösung), sowie (c) mit einer Untersuchung der Wirksamkeit des Perfusatzusatzes Albumin.

3.2.1 Organkonservierung

Effizienz einer neuen Konservierungslösung B2 für Nieren im Vergleich zu einer Standardlösung (HTK) ²

Eine neu entwickelte Konservierungslösung zeigte im Rahmen unserer Modellbedingungen deutlich bessere Ergebnisse im Vergleich zu einer herkömmlichen, klinisch gebräuchlichen Rezeptur: HTK = Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat (nach Bretschneider).

Nach „B2“-Konservierung führte ein fast halbiertes Organwiderstand zu einem Perfusionsfluss von 142,3 gegenüber 119,7 ml/min*100g nach der HTK-Behandlung. Kreatinin-Clearance Werte von 13,0 gegenüber 4,1 ml/min*100g ergaben Filtrationsfraktionen von 10,8 und 3,8 %. Bei Diurese-Messwerten von 2,7 und 1,9 ml/min*100g, konnte die Wasser-Resorptionfraktion zu 79,2 gegenüber 53,7 % bestimmt werden. Die ermittelten tubulären Na-Transport-Werte von 1,4 und 0,34 mmol/min*100g entsprechen Natrium-Resorptionsfraktionen von 86,3 und 68,2 %.

² C. Fehrenberg, H. von Baeyer, **V. Unger**, R. Schmitt, W. Haider, D. Quarcoo, D. Groneberg, C. Grosse-Siestrup. Protective effects of B2 preservation solution in comparison to a standard solution (Histidine-Tryptophan-Ketoglutarate /Bretschneider) in a model of isolated autologous haemoperfused porcine kidney. Nephron Physiol. 96: 52-58 (2004)

3.2.2 Perfusat

3.2.2.1 Auswirkungen verschiedener Perfusate auf die Funktion der isolierten Niere ³

Bei isolierten Organperfusionen haben Eigenschaften des Perfusionsmediums in zwei Bereichen grundsätzliche Bedeutung für die Qualität des Modells: (a) bei der Vitalität des Organs und folglich bei der Übertragbarkeit der Messergebnisse auf in vivo Verhältnisse, sowie (b) bei der Perfusionszeit, die bei bestimmten Fragestellungen möglichst von langer Dauer sein sollte. Zellfreie Perfusate haben hier den Vorteil, durch bessere Sterilisierbarkeit einem vorzeitigen Abbruch der Versuche wegen möglicher Keimausbreitung entgegenzuwirken.

In dieser Studie wurden die Auswirkungen verschiedener Perfusate untersucht. Der Hund ist in der nephrologischen Forschung ein sehr häufig genutztes Versuchstier und aktuelle Vergleichswerte Hund-Schwein aus der Literatur waren nicht bekannt. Bei den Untersuchungen erwies sich im Rahmen unseres Modellsystems die Überlegenheit von Blut gegenüber den zellfreien Aufbereitungen (modifizierte Tyrode-Lösung).

Dieser Unterschied zeigte sich beim renalen Blutfluss mit 80 gegenüber 115 ml/min*100g für Tyrode bzw. Blut als Perfusat, sowie bei der Kreatinin-Clearance mit Werten von 0,18 und 1,47 ml/min*100g. Die Diurese wurde zu 0,15 gegenüber 0,56 ml/min*100g gemessen. Der tubuläre Natrium-Transport von 55 gegenüber 528 $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot 100\text{g}$ zusammen mit den entsprechenden Sauerstoffverbrauchswerten erlaubte eine Bestimmung des Kopplungs-Quotienten TNa/O_2 -Konsum zu 2,1 und 5,3 mol Na/mol O_2 für Tyrode gegenüber Blut.

³ J. Höchel, D. Lehmann, C. Fehrenberg, **V. Unger**, D. A. Groneberg, C. Grosse-Siestrup. Effects of different perfusates on functional parameters of isolated perfused dog kidneys. *Nephrol Dial Transplant.* 18:1748-1754 (2003).

3.2.2.2 Perfusat-Additiv Albumin

Der Zusatz von Albumin zum Perfusat der isolierten Niere wurde mit den folgenden Fragestellungen untersucht: (a) Lässt sich eine Verminderung der Organ-Ödematisierung unter Perfusion erreichen? (b) Kann mit einer Annäherung an physiologische Verhältnisse beim kolloidosmotischen Druck im Perfusat eine Normalisierung von Funktionsparametern wie GFR und Diurese erreicht werden?

Dies wurde in einer Studie [5] untersucht, in der Nieren verglichen wurden, die im Operationsraum entnommen wurden. Die Nieren wurden nach 2 Stunden Konservierung perfundiert, Gruppe B ohne Zusatz und Gruppe C mit Albumin-Anreicherung des Perfusats. Eine Nierengruppe A wurde ohne Konservierung und ohne Perfusatzusatz perfundiert. Es wurde im Vergleich zu einer in vivo Kontrollgruppe (CON) folgendes beobachtet:

Der kolloidosmotische Druck im Plasma der Gruppe C mit 16,8 mmHg war vergleichbar zur physiologischen Situation (CON) mit 17,4 mmHg im Unterschied zu den anderen Gruppen mit Werten von 6-7 mmHg. Dementsprechend konnte eine verringerte Gewichtszunahme während Perfusion von 15,3 % bei Gruppe C gegenüber den anderen Versuchsgruppen signifikant festgestellt werden, was eine erfolgreiche Anti-Ödem-Prophylaxe mit Albumin-Zusatz nahelegt.

Die gegenüber Gruppe B unterschiedlichen Messergebnisse bei den Parametern Kreatinin-Clearance, Diurese und Natrium-Resorptionsfraktion zeigten zwar eine Tendenz zur Annäherung an physiologische Verhältnisse, waren aber sämtlich nicht signifikant.

3.2.3 Stimulus-response Messungen mit Pharmaka

Die Funktionalität des Modells wurde in zwei Untersuchungsreihen pharmakologisch getestet.

In einer ersten Studie wurde das Diuretikum Furosemid an isolierten Nieren, die auf dem Schlachthof (SLA) gewonnen wurden, geprüft ⁴

Dem Modell mit Schlachthausentnahme und Pharmakontestung (VOR/NACH) wurden Nieren einer Referenzgruppe (REF) gegenübergestellt, die im Operationsraum des Instituts entnommen wurden. Die folgenden Ergebnisse wurden ermittelt (VOR/NACH/REF): Bei 119,4/125/291,5 ml/min*100g Perfusionsfluss ergab sich ein nahezu halbiertes Organwiderstand der Referenzgruppe gegenüber dem Schlachthaus-Modell. Die Kreatinin-Clearance von 8,7/12,9/46,2 ml/min*100g zeigte eine Steigerung unter Furosemid bei insgesamt niedrigerem Niveau der SLA-Gruppe. Die Diurese mit 1,7/4,2/10,4 ml/min*100g sowie die Natrium-Ausscheidung mit 0,14/0,47/1,12 mmol/min*100g ergaben jeweils nahezu eine Verdreifachung der Werte bei den Furosemid-Versuchen, hingegen bei der Natrium-Resorptionsfraktion mit 85,4/69,7/80,6 % eine deutliche Verminderung. Insgesamt konnten signifikante Reaktionen in zu erwartender Richtung beim Diuretikum-Test des Schlachthaus-Modells gezeigt werden.

Bei der oben beschriebenen Referenzgruppe isolierter Nieren zeigte sich eine Grundsituation starker Poliurie, die so bereits bei anderen experimentellen Nieren-Gruppen mit ähnlichem Protokoll beobachtet wurde.

Deshalb wurde in einer weiteren Testserie versucht, mit einem anderen als dem in Kap. 3.2.2.2 gewählten Ansatz, den Zustand vermehrten Harnflusses sowie eingeschränkter Konzentrationsfähigkeit zu vermeiden.

Dabei sollten Erkenntnisse aus Untersuchungen verwendet werden, in denen über medulläre Auswaschprozesse bei Nierenperfusionen unter erhöhtem Blutdruck bzw. Blutfluss berichtet wird [28-31].

⁴ C. Grosse-Siestrup, **V. Unger**, M. Meissler, S. Nagel, A. Wussow, C. Peiser, A. Fischer, R. Schmitt, D. A. Groneberg. Hemoperfused Isolated Porcine Slaughterhouse Kidneys as a Valid Model for Pharmacological Studies. J Pharm Sci. 92: 1147-1154 (2003).

Es wurde daraufhin ein Modell isolierter Nieren mit Verminderung des Blutflusses entwickelt. An diesem Modell wurden dann ebenfalls Wirksubstanz-Testungen vorgenommen.

In dieser jüngeren Untersuchung [1] wurde nicht nur Furosemid, sondern auch alternativ ADH (antidiuretisches Hormon) eingesetzt und damit zwei antagonistisch auf die Niere einwirkende Substanzen getestet.

Die neue Kontroll-Gruppe für diese Studie an isolierten Nieren mit vermindertem Blutfluss ist in Kap. 3.1.1 beschrieben worden (Gruppe B) und ist dort ebenso wie die Gruppen mit ADH-Einwirkung (C) bzw. Furosemid-Gabe (D) in der Tabelle 1 aufgeführt.

Die drei Gruppen B/C/D zeigen bei der Kreatinin-Clearance ein etwa einheitliches Niveau von ca 20 ml/min*100g und liegen folglich in dem beschriebenen Doppeldiagramm (Abb. 1, [1]) auf einer einheitlichen Linie. Demgegenüber sind die Unterschiede bei den Werten für die Diurese 2,3/0,8/7,9 ml/min*100g und für die Natrium-Exkretion 0,22/0,5/0,96 mmol/min*100g jeweils hoch signifikant (B/C/D = Kontrolle/ADH/Furo = norm/niedrig/hoch).

Damit konnte nicht nur die funktionelle Validität des Modells demonstriert werden, sondern es wurde ebenfalls die Wichtigkeit einer Optimierung der Hämodynamik unterstrichen.

3.3 Vergleichsuntersuchungen der Organfunktion bei verschiedenen Versuchsgruppen ⁵

Schliesslich wurden nach diesen vorangegangenen Studien zur Modelloptimierung in einer Übersichtsarbeit umfangreiche Ergebnisse aus Nieren-Perfusionsstudien zusammengetragen mit dem Ziel, Referenzwerte vorzulegen und zur Charakterisierung des Test-Modells isolierte hämoperfundierte Schweineniere beizutragen.

Zur Behandlung standen die Fragen: (a) ob Nieren, die auf dem Schlachthof (SLA-Gruppe D) gewonnen wurden, vergleichbare Modellqualität zeigen wie Organe, die im Operationsraum (OP) unter kontrollierten Bedingungen präpariert wurden (Gruppe A) und (b) welche Beurteilungsverfahren und Messgrössen die Perfusionsgüte am besten widerspiegeln.

Für eine zusammenfassende Darstellung wird das Nomogramm-Verfahren [1] benutzt, dessen Konstruktion im Methodenteil (Kap. 2.3) beschrieben wurde (Abbildung 3). Ausgewählte Ergebnisse werden für die Vergleichsgruppen A, D unter Berücksichtigung einer Kontrollgruppe (CON - in vivo untersuchte Nieren lebender Tiere) präsentiert (Mittelwerte im Diagramm mit gestrichelten Hilfslinien hervorgehoben): Glomeruläre Filtration GFR (Kreatinin-Clearance Cl_{crea}) [ml/min*100g]: (CON) 76,1; (A) 59,2; (D) 16,3; Natrium-Resorptionsfraktion RF_{Na} [%] (CON) 99,8; (A) 82,3; (D) 88,7, tubulärer Kopplungs-Quotient der Na-Resorption/ O_2 -Consumption (T_{Na} / O_2-cons [mmol-Na/mmol- O_2] (CON) 30,1; (A) 42,0; (D) 23,8).

Bei den hauptsächlichen Beurteilungs-Parametern Cl_{crea} , RF_{Na} ist somit etwa Vergleichbarkeit zwischen den Nieren-Gruppen A (OP) und D (Schlachthof) gegeben, auch wenn der Abstand zu in vivo Verhältnissen erheblich ist. Eine abwägende Analyse bei speziellen Fragestellungen ist hier unter Einbeziehung der zusätzlichen, einzelnen in der Darstellung enthaltenen Parameter (U/P_{crea} , U/P_{Na} , RF_{H_2O}) notwendig.

⁵ V. Unger, C. Grosse-Siestrup, C. Fehrenberg, A. Fischer, M. Meissler, D. A. Groneberg. Reference values and physiological characterization of a specific isolated pig kidney model. J Occup MedToxicol. 2: 1 (2007)

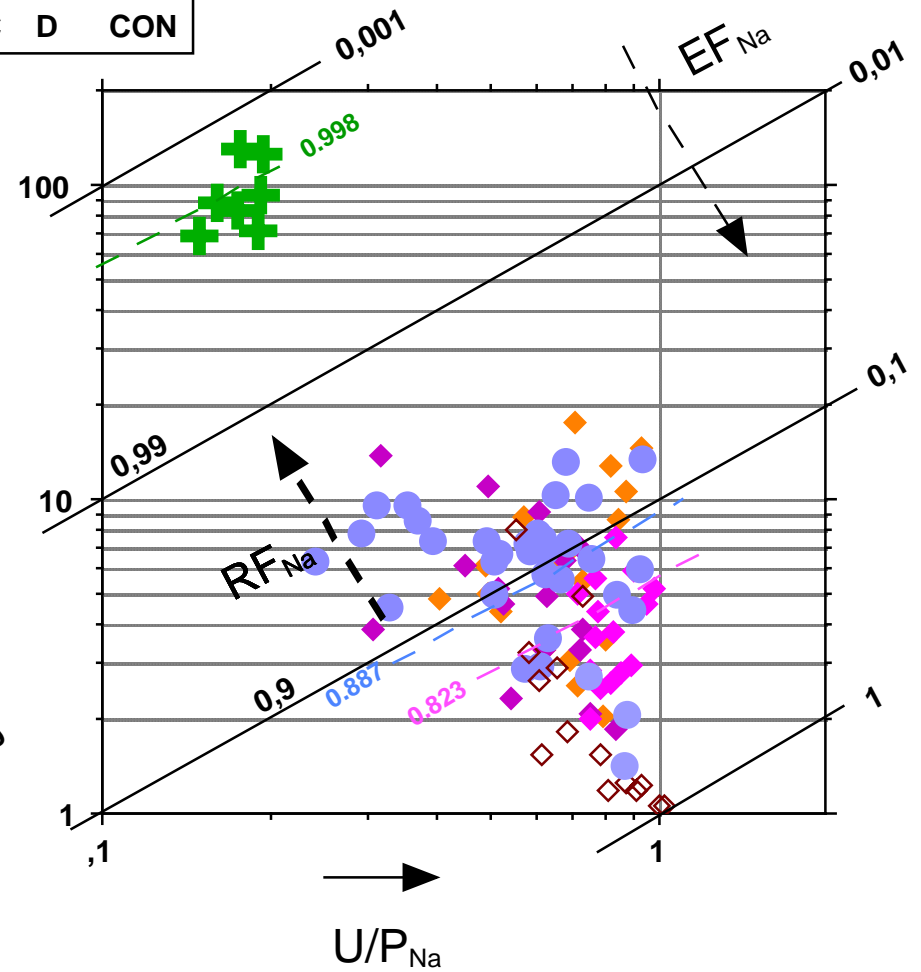
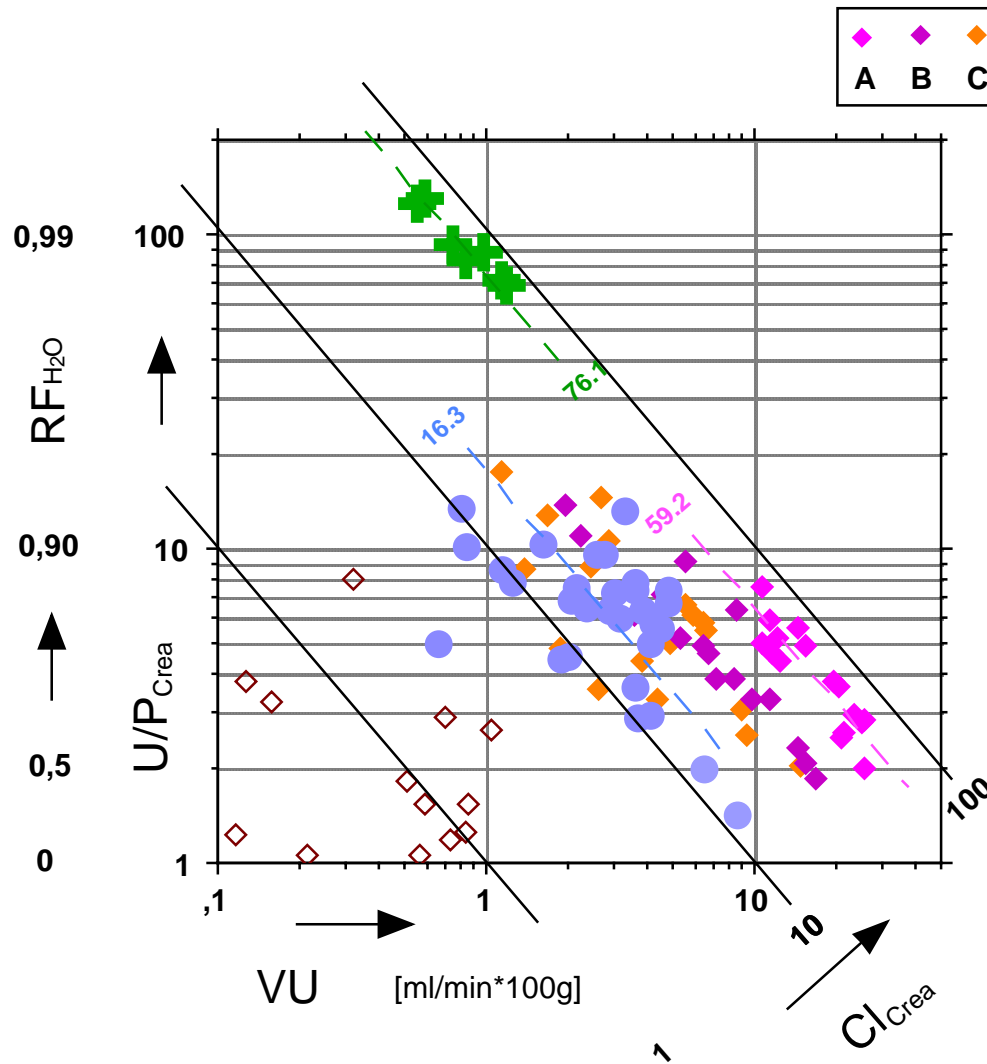


Abb. 3a: Kreatinin Clearance

Nomogram Kreatinin Clearance (Cl_{crea}) und Fraktionelle Natrium Reabsorption (RF_{Na}) für Schweinenieren bei in vivo Messungen (CON) und bei isolierter Hämoperfusion, Gruppen: OP (A o.Konservierung, B mit Kons.-2 Std, 24 Std -braune offene Rauten-, C Albumin); Schlachthof-Nieren (D mit Konservierung)

Abb 3b: Fraktionelle Natrium Resorption

4 Schlussfolgerungen und Ausblick

Zusammenfassend konnten die vorgestellten fünf Arbeiten in der jüngsten Zeit dazu beitragen, dass sich in den Forschungsgebieten der Testung der akuten Toxizität, des Ischämie-Reperfusionsschadens und der Transplantationsmedizin beim Organsystem Niere Alternativen zu Tierversuchen entwickeln und realisieren lassen.

Bedingt durch den standardisierten, modularen Aufbau des neu entwickelten Perfusionssystems ist eine hohe Flexibilität gegeben, sowohl in Bezug auf zu testende Organsysteme und Perfusionsfluide, als auch auf die Komponenten des Systems (Blutpumpen, Oxygenatoren, Dialysemodule, Biomaterialien).

Eine neu entwickelte Konservierungslösung zeigt im Rahmen unseres Modells – vorerst nur für die Niere untersucht - deutlich bessere Funktionswerte im Vergleich zu einer herkömmlichen Lösung, was nicht nur für unser Modellsystem vorteilhaft ist, sondern auch für die klinische Transplantationsforschung vielversprechend ist.

Die Nutzung von Blut als Perfusat hat sich als physiologisch optimal gezeigt und ermöglicht eine in vitro steady-state-Situation unter physiologischen Bedingungen für mehrere Stunden. Dies sollte durch weitere Verbesserung der Sterilisierungsprozeduren noch steigerbar sein.

Die Präferenz von Blut gegenüber zellfreien Perfusionsschmelzen sowie ein durch onkotische Additive optimal eingestellter kolloidosmotischer Druck führen bei der Perfusion der Niere zu deutlichen Verbesserungen (z.B. bei der Reduzierung ödemverursachten Organschwellung und dadurch bedingter Blutflussbehinderung)

Die Beschaffung und Nutzung von Organen, die aus Routineschlachtprozessen stammen, hat sich als praktikabel erwiesen. Die physiologischen Funktionen dieser Organe sind gegenüber solchen, die unter optimaler Kontrolle im medizinischen OP-Betrieb gewonnen wurden, nur moderat eingeschränkt, was vor allem durch die modellimmanenten längeren Intervalle körperwarmer Ischämie bedingt erscheint.

Spezifische Bewertungsfaktoren zur Beurteilung der physiologischen Organfunktion, wie Filtrationsleistung, Natrium-Resorptionsvermögen und

funktioneller Sauerstoffverbrauch des Organs, sind bei diesem Modell unabdingbar.

Als Ausblick eröffnet die mit einem optimierten und standardisierten Nieren-Perfusionsmodell demonstrierte Annäherung an vitales Organverhalten eine attraktive Möglichkeit zum Studium renaler Homöostase in experimenteller und klinischer Forschung. Dieses beinhaltet unter bestimmten Voraussetzungen die Möglichkeit der Reduktion von Tierversuchen, wenn die Organe in Routine-Schlachtprozessen gewonnen werden.

5 Literaturverzeichnis

1. Unger, V., C. Grosse-Siestrup, and D.A. Groneberg, *Evaluation of renal functional parameters in different settings of isolated organ hemoperfusions*. *Physiol Meas.*, 2006. **27**: p. 1167-1175.
2. Fehrenberg, C., H. Baeyer von, V. Unger, R. Schmitt, W. Haider, D. Quarcoo, D.A. Groneberg, and C. Grosse-Siestrup, *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. **218**.
3. Höchel, J., D. Lehmann, C. Fehrenberg, V. Unger, D.A. Groneberg, and C. Grosse-Siestrup, *Effects of different perfusates on functional parameters of isolated perfused dog kidneys*. *Nephrol Dial Transplant*, 2003. **18**(9): p. 1748-54.
4. Grosse-Siestrup, C., V. Unger, M. Meissler, S. Nagel, A. Wussow, C. Peiser, A. Fischer, R. Schmitt, and D.A. Groneberg, *Hemoperfused isolated porcine slaughterhouse kidneys as a valid model for pharmacological studies*. *J Pharm Sci*, 2003. **92**(6): p. 1147-54.
5. Unger, V., S.C. Grosse, C. Fehrenberg, A. Fischer, M. Meissler, and D. Groneberg, *Reference values and physiological characterization of a specific isolated pig kidney model*. *J Occup Med Toxicol.*, 2007. **2**(1).
6. Gruber, F.P., *Die Geschichte des Refinement-Gedankens*, in *Alternativen zu Tierexperimenten*, F.P. Gruber and H. Spielmann, Editors. 1996, Spektrum, Akad. Verlag: Heidelberg, Berlin, Oxford.
7. Frey von, M. and M. Gruber, *Untersuchungen über den Stoffwechsel isolierter Organe: Ein Respirationsapparat für isolierte Organe*. *Archiv für Physiologie (Leipzig)*, 1885. **9**: p. 519ff.
8. Jacobi, C., *Apparat zur Durchblutung isolierter überlebender Organe*. *Archiv für Experimentelle Pathologie & Pharmakologie*, 1890. **26**: p. 78ff.
9. Langendorff, O., *Untersuchungen am überlebenden Säugethierherzen*. *Pflueger Arch. Ges. Physiol.*, 1895. **61**: p. 291.
10. Richards, A.N. and O.H. Plant, *Urine production in the perfused kidney*. *Am. J. Physiol.*, 1922. **59**: p. 184.
11. Lindbergh, C.A., *An apparatus for the the culture of whole organs*. *J Exp Med*, 1935. **62**: p. 409.
12. Rosenfeld, S., A.L. Sellers, and J. Katz, *Development of an isolated perfused mammalian kidney*. *Am. J. Physiol.*, 1958. **196**(5): p. 1155-1159.
13. Grosse-Siestrup, C., C. Fehrenberg, H. Baeyer von, and D.A. Groneberg, *Multiple-organ harvesting for models of isolated hemoperfused organs of slaughtered pigs*. *Altex*, 2002. **19**(1): p. 9-13.
14. Baeyer von, H., K. Stahl, M. Hausler, M. Meissler, V. Unger, J. Frank, S.C. Grosse, G. Kaczmarczyk, K. Affeld, H.J. Flaig, and B. Steinbach, *[A new method of ex vivo whole blood perfusion of isolated mammalian organs, exemplified by the kidney of swine]*. *Biomed Tech (Berl)*, 1997. **42**(3): p. 61-8.
15. Neew-Galuschka, E., K. Stahl, C. Fehrenberg, and G. Kaczmarczyk, *Pathophysiology of the isolated blood-perfused porcine kidney - better understanding of the Renin-Angiotensin-System*. *Lab Anim*, 2000(Suppl): p. 151-156.

16. Nagel, S., O. Hegemann, D.A. Groneberg, and C. Grosse-Siestrup, *An improved model of isolated hemoperfused porcine livers using pneumatically driven pulsating blood pumps*. *Toxicol Pathol.*, 2005. **33**(4): p. 434-40.
17. Deetjen, P. and K. Kramer, *Die Abhängigkeit des O₂-verbrauchs der Niere von der Na-Rückresorption*. *Pflügers Arch. ges. Physiol.*, 1961. **273**: p. 636.
18. Kiil, F., K. Aukland, and H.E. Refsum, *Renal sodium transport and oxygen consumption*. *Am. J. Physiol.*, 1961. **201**(3): p. 511-516.
19. Knox, F.G., J.S. Fleming, and D.W. Rennie, *Effects of osmotic diuresis on sodium reabsorption and oxygen consumption of kidney*. *Am J Physiol*, 1966. **210**(4): p. 751-759.
20. Sejersted, O.M., O. Mathisen, and F. Kiil, *Oxygen requirement of renal Na-K-ATPase-dependent sodium reabsorption*. *Am. J. Physiol.*, 1977. **232**(2): p. F151-F158.
21. Swartz, R.D., P. Silva, R. Hallac, and F.H. Epstein, *The relation between sodium transport and oxygen consumption in isolated perfused rat kidney*. *Curr Probl Clin Biochem*, 1977. **8**: p. 123-32.
22. Mathisen, O., T. Monclair, and F. Kiil, *Oxygen requirement of bicarbonate-dependent sodium reabsorption in the dog kidney*. *Am J Physiol*, 1980. **238**(Renal Fluid Electrolyte Physiol. 7): p. F175 - F180.
23. Cohen, J., *Relationship between energy requirements for Na⁺ reabsorption and other renal functions*. *Kidney Int.*, 1986. **29**(1): p. 32-40.
24. Kelly, K.J., *Heat shock (stress response) proteins and renal ischemia/reperfusion injury*. *Contrib Nephrol.*, 2005. **148**: p. 86-106.
25. Durrani, N., R. Yavuzer, V. Mittal, M. Bradford, C. Loboeki, and B. Silberberg, *The effect of gradually increased blood flow on ischemia-reperfusion injury in rat kidney*. *Am J Surg.*, 2006. **191**(3): p. 334-337.
26. Parekh, N. and U. Veith, *Renal hemodynamics and oxygen consumption during postischemic acute renal failure in the rat*. *Kidney Int.*, 1981. **19**(2): p. 306-316.
27. Donohoe, J.F., M.A. Venkatachalam, D.B. Bernard, and N.G. Levinsky, *Tubular leakage and obstruction after renal ischemia: structural-functional correlations*. *Kidney Int.*, 1978. **13**: p. 208-222.
28. Sone, M., A. Ohno, G.J. Albrecht, K. Thurau, and F.X. Beck, *Restoration of urine concentrating ability and accumulation of medullary osmolytes after chronic diuresis*. *Am J Physiol*, 1995. **269**(4 Pt 2): p. F480-90.
29. Lang, F., *Osmotic diuresis*. *Ren Physiol*, 1987. **10**(3-4): p. 160-173.
30. Thurau, K. and P. Deetjen, *[Diuresis in pressure increases. Importance of hemodynamics of the renal medulla for urine concentration. (with a theoretical contribution concerning H. Guenzler: "Counterflow systems with administration of substance through the external wall").]* *Pflueger Arch. Ges. Physiol.*, 1962. **274**: p. 567-580.
31. Kramer, K. and P. Deetjen, *Beziehungen des O₂-Verbrauchs der Niere zu Durchblutung und Glomerulumfiltrat bei Änderung des arteriellen Druckes*. *Pflügers Arch. ges. Physiol.*, 1960. **271**: p. 782.

Liste der benutzten Abkürzungen und Formeln

Renaler Blutfluss

Renaler Plasmafluss

(Hct = Hämatokrit)

$$RBF = (QB)$$

$$RPF = RBF * (1-Hct)$$

Renaler Widerstand

$$R = (p_{arterial} - p_{venous}) / RBF$$

Renaler Oxygen Verbrauch (O_2 cons)

Hämoglobin-gebundenes O_2 cons

Physikal. (gelöstes) O_2 cons

Total O_2 cons

$$O_2cons_{chem} = RBF \times Hb \times 1.34 \times (SO_{2a} - SO_{2v})$$

$$O_2cons_{phys} = (RPF_a \times pO_{2a} - RPF_v \times pO_{2v}) \times 0.024 / 760$$

$$O_2cons_{total} = O_2cons_{chem} + O_2cons_{phys}$$

Filtration

Glomeruläre Filtrations Rate

Filtrations Fraktion

Load der Substanz x

$$GFR \approx Cl_{crea} = U/P_{crea} * VU$$

$$FF = GFR / RPF$$

$$L_x = GFR * P_x$$

Tubuläre

Resorption/Sekretion

Resorption =Transport (absolut)

Resorptionsfraktion (relativ)

$$T_x = L_x - E_x$$

$$RF_x = T_x / L_x$$

Resorptionsfraktion für Wasser

$$RF_{H_2O} = \left(1 - \left(\frac{1}{\frac{U}{P_{crea}}} \right) \right)$$

Resorptionsfraktion für Natrium

$$RF_{Na} = \left(1 - \left(\frac{\frac{U}{P_{Na}}}{\frac{U}{P_{crea}}} \right) \right)$$

Exkretion

Harnfluss

Exkretion der Substanz x

Quotient U/P der Substanz x

(Konzentration x : P_x - Plasma ; U_x - Urin)

$$VU$$

$$E_x = VU * U_x$$

$$U_x / P_x$$

ADH = antidiuretisches Hormon

COP = kolloidosmotischer Druck

Erklärung zum Anteil des Doktoranden an den Publikationen

der kumulativen DISSERTATION

„**Abschätzung der Nierenfunktion unter isolierter Hämoperfusion - Referenzwerte und Bewertungsverfahren für eine Tierversuchersatzmethode**“

von
Volker Unger

PUBLIKATION	Anteil Doktorand
PUBLIKATION-[1] V. Unger , C. Grosse-Siestrup, D. A. Groneberg. Evaluation of renal functional parameters in different settings of isolated organ hemoperfusions. <i>Physiol. Meas.</i> 27: 1167-1175 (2006).	75%
PUBLIKATION-[2] C. Fehrenberg, H. von Baeyer, V. Unger , R. Schmitt, W. Haider, D. Quarcoo, D. Groneberg, C. Grosse-Siestrup. Protective effects of B2 preservation solution in comparison to a standard solution (Histidine-Tryptophan-Ketoglutarate / Bretschneider) in a model of isolated autologous haemoperfused porcine kidney. <i>Nephron Physiol</i> 96: 52-58 (2004).	20%
PUBLIKATION-[3] J. Höchel D. Lehmann, C. Fehrenberg, V. Unger , D. A. Groneberg, C. Grosse-Siestrup. Effects of different perfusates on functional parameters of isolated perfused dog kidneys. <i>Nephrol Dial Transplant</i> 18(9):1748-1754 (2003).	20%
PUBLIKATION-[4] C. Grosse-Siestrup, V. Unger , M. Meissler, S. Nagel, A. Wussow, C. Peiser, A. Fischer, R. Schmitt, D. A. Groneberg. Hemoperfused Isolated Porcine Slaughterhouse Kidneys as a Valid Model for Pharmacological Studies. <i>J Pharm Sci</i> 92: 1147-1154 (2003).	30%
PUBLIKATION-[5] V. Unger , C. Grosse-Siestrup, C. Fehrenberg, A. Fischer, M. Meissler, D. A. Groneberg. Reference values and physiological characterization of a specific isolated pig kidney model. <i>J.Occup.Med.Toxicol.</i> 2:1 (2007)	60%

Univ.-Prof. Dr. David Groneberg
Betreuer

Dipl.-Ing. Volker Unger
Doktorand

Erklärung über Selbständigkeit

„Ich, Volker Unger, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema:

**„Abschätzung der Nierenfunktion unter isolierter Hämoperfusion -
Referenzwerte und Bewertungsverfahren für eine Tierversuchersatzmethode“**

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

Lebenslauf
von Volker Unger

(Vermerk zum Lebenslauf):
Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mitveröffentlicht.

Wissenschaftlicher Werdegang

Übersicht Publikationen 1974-2007

1. Clevert H.D., Keilbach H., Kleine H.O., Krautzberger W., Unger V., Weidemann H. & Bucherl E.S.:
[The water-, acid-base- and electrolyte-metabolism after total heart replacement by a blood pump (author's transl)]
Langenbecks Arch Chir: 335(1) 239-50., 1974
2. Clevert H.D., Keilbach H., Kleine H.O., Krautzberger W., Affeld K., Baer P., Blumenthal-N-von, Grosse-Siestrup C., Hennig E., Kless H., Mohnhaupt A., Mohnhaupt R., Oh T., Unger V., Wallner W., Weidemann H. & Bucherl E.S.:
[The postoperative course and results after total heart replacement by a blood pump (author's transl)]
Langenbecks Arch Chir: 335(1) 157-70, 1974
3. Keilbach H., Clevert D., Kleine H., Krautzberger W., Affeld K., Hennig E., Mohnhaupt A., Mohnhaupt R., Grosse-Sistrup C., Weidemann H., Unger V., Blumenthal N., Oh T.K. & Bucherl E.S.:
[General results following total heart replacement using incorporated blood pumps]
Langenbecks Arch Chir: Suppl 29-32, 1974
4. Krautzberger W., Clevert H.D., Keilbach H., Kleine H.O., Affeld K., Mohnhaupt A., Hennig E., Unger V. & Bucherl E.S.:
[Haemodynamic after total heart replacement by an incorporated double chamber blood pump (author's transl)]
Langenbecks Arch Chir: 335(1) 171-86, 1974
5. Krautzberger W., Clevert D., Keilbach H., Kleine H., Affeld K., Hennig E., Mohnhaupt A., Mohnhaupt R., Grosse-Sistrup C., Weidemann H., Unger V., Blumenthal N., Oh T.K. & Bucherl E.S.:
[Hemodynamics following total heart replacement using artificial blood pumps]
Langenbecks Arch Chir: Suppl 25-8, 1974
6. Grosse-Siestrup C., Unger V. & Bucherl E.S.:
[The effect of training in the calf]
Berl Munch Tierarztl: 89(20) 394-8., 1976
7. Krautzberger W., Clevert D., Keilbach H., Kleine H.O., Weidemann H., Grosse-Siestrup C., Affeld K., Hennig E., Kless H., Mohnhaupt A., Mohnhaupt R., Unger V. & Bucherl E.S.:
[Observation in 10 calves with a survival time of more than 100 hours after total heart replacement (author's transl)]
Thoraxchir Vask Chir.: 24(4) 232-40, 1976
8. Paepfer H., Hampl H., Unger V., Gahl G., Horn G., Grams G. & Kessel M.:
[Hemodynamic studies during various hemodialysis procedures]
Verh Dtsch Ges Inn Med.: 83 1290-4., 1977
9. Schiessler A., Jaster H.J., Grosse-Siestrup C., Unger V. & Bucherl E.S.:
[Normal values in the calf. Biochemical, hematologic and coagulation values and determination of fluid compartments]
Zentralbl-Veterinarmed-A.: 24(4) 298-310., 1977
10. Hampl H., Paepfer H., Unger V., Ryzlewicz T., Fischer C., Cambi V. & Kessel M.:
Hemodynamic studies, acid-base status and osmolality in different hemodialysis procedures.
Artif Organs: 2(4) 348-52., 1978
11. Lemm W. & Unger V...:
[Protein adsorption on different polymer surfaces in vitro].
Biomed Tech: 23 (Suppl) 171-172, 1978

12. Schiessler A., Kless H., Unger V., Grosse-Siestrup C. & Bucherl E.S.:
[Stable postoperative phase after total artificial heart-replacement in animal-experiments (author's transl)]
 Langenbecks Arch Chir: 346(3) 209-17., 1978
13. Unger V., Clevert D., Grosse-Siestrup C., Gerlach K., Kleine H.O., Krautzberger W., Kuhlmann F. & Bücherl ES.:
[Mechanisms of regulation in circulation and body fluid control after implantation of artificial bloodpumps].
 Biomed Tech: 23 (Suppl) 203-204, 1978
14. Unger V., Hennig E. & Bücherl ES.:
Some Aspects of Total Artificial Heart Regulation in Comparison to Natural Heart Function.
 Pflug Arch Eur J Phy: 377 (Suppl) R1, 1978
15. Bucherl E.S., Affeld K., Baer P., Clevert H.D., Frank J., Gerlach K., Grosse-Siestrup C., Hennig E., Keilbach H., Krautzberger W., Kuhlmann V., Lemm W., Mohnhaupt A., Rennekamp F., Unger V., Weidemann H. & Zartnack F.:
Total artificial heart replacement.
 Adv Enzymol Ramb: 2(3) 141-52, 1979
16. Hampl H., Paepfer H., Unger V. & Kessel M.W.:
Hemodynamics during hemodialysis, sequential ultrafiltration and hemofiltration.
 J Dial: 3(1) 51-71., 1979
17. Unger V., Gerlach K., Grosse-Siestrup C., Hennig E., Kless H., Kuhlmann F. & Bücherl ES.:
[Biorhythms and the artificial heart. An estimate to objectify characteristics of biotechnical hybrid systems (author's transl)]
 Biomed Tech: 24 (Suppl) 311-312, 1979
18. Unger V., Gerlach K., Grosse-Siestrup C., Kuhlmann F., Affeld K., Baer P., Clevert D., Hennig E., Keilbach H., Krautzberger W., Mohnhaupt A. & Bücherl ES.:
Cardiovascular circadian rhythms and the control of the artificial heart.
 Pflug Arch Eur J Phy: 382 (Suppl) R 3, 1979
19. Unger V., Kless H., Grosse-Siestrup C., Gerlach K., Hennig E., Kuhlmann F. & Bücherl ES.:
Biorhythms and the artificial heart - aspects of body autoregulation and technical system's control.
 Artif Organs: 3 (Suppl) 398-404, 1979
20. Hampl H., Paepfer H., Unger V., Fischer C., Resa I. & Kessel M.:
Hemodynamic changes during hemodialysis, sequential ultrafiltration, and hemofiltration.
 Kidney Int Suppl.: 10 S83-8., 1980
21. Lemm W., Unger V. & Bucherl E.S.:
Blood compatibility of polymers: in vitro and in vivo tests.
 Med Biol Eng Comput: 18(4) 521-6, 1980
22. Unger V. & Bücherl ES.:
The Degree of Biorhythmical Coordination - Used for Normal State Indication in Long-term Total Artificial Heart (TAH) Experiments.
 Artif Organs: 4(2) 151, 1980
23. Unger-V.,-Gerlach-K.,-Grosse-Siestrup-C.,-Lemm W. & Bücherl ES.:
[Cell-life of blood components of experimental animals with artificial blood pumps or A-V shunts].
 Biomed Tech: 25 (Suppl) 437, 1980
24. Unger V., Grosse-Siestrup C., Gerlach K., Kuhlmann F., Affeld K., Hennig E., Keilbach H. & Bucherl E.S.:

- [Chronobiological aspects of artificial total heart replacement in long-term animal experiments--a systemanalytic study (author's transl)]**
Wien Med Wochenschr.: 130(2) 86-90, 1980
25. Kaczmarczyk G., Unger V., Mohnhaupt R. & Reinhardt H.W.:
Left atrial distension and intrarenal blood flow distribution in conscious dogs.
Pflug Arch Eur J Phy.: 390(1) 44-8., 1981
 26. Thoma J., Unger V. & Kastenbauer E.:
[Measurement of temperature and sound pressure in the inner ear during application of the argon-laser (author's transl)]
Laryngol Rhinol Otol Stuttg.: 60(11) 587-90., 1981
 27. Thoma J., Unger V. & Kastenbauer E.:
[Functional effect of the argon laser on the hearing organ of the guinea pig]
Laryngol Rhinol Otol Stuttg.: 61(8) 473-6., 1982
 28. Kaczmarczyk G., Jorres D., Rossaint R., Krebs M., Unger V. & Falke K.:
Extracellular volume expansion inhibits antidiuretic hormone increase during positive end-expiratory pressure in conscious dogs.
Clin Sci.: 85(5) 643-9, 1993
 29. Rossaint R., Krebs M., Forther J., Unger V., Falke K. & Kaczmarczyk G.:
Inferior vena caval pressure increase contributes to sodium and water retention during PEEP in awake dogs.
J Appl Physiol.: 75(6) 2484-92, 1993
 30. Unger V.:
Isolated hemoperfused kidney before and after cold storage for testing medical systems and drugs
Int J Artif Organs: 18(8) 458, 1995
 31. von Baeyer H., Stahl K., Hausler M., Meissler M., Unger V., Frank J., Grosse-Siestrup C., Kaczmarczyk G., Affeld K., Flaig H.J. & Steinbach B.:
[A new method of ex vivo whole blood perfusion of isolated mammalian organs, exemplified by the kidney of swine]
Biomed Tech.: 42(3) 61-8, 1997
 32. Fehrenberg C., von Baeyer H., Unger V., Meissler M. & grosse-Siestrup C...:
Special aspects of organ harvesting, preservation and quality control for the isolated hemoperfusion of porcine slaughterhouse organs.
Lab Anim: (Suppl) 69-78, 2000
 33. Unger V., von Baeyer H. & Grosse-Siestrup C...:
Hemoperfused porcine kidney as a valid pharmacological model - effects of furosemide.
Lab Anim: (Suppl) 137-143, 2000
 34. Grosse-Siestrup C., Nagel S., Unger V., Meissler M., Pfeffer J., Fischer A. & Groneberg D.:
The isolated perfused liver. a new model using autologous blood and porcine slaughterhouse organs.
J Pharmacol Toxicol.: 46(3) 163., 2001
 35. 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.: 30(6) 749-54., 2002
 36. Grosse-Siestrup C., Unger V., Fehrenberg C., v Baeyer H., Fischer A., Schaper F. & Groneberg D.A.:
A model of isolated autologously hemoperfused porcine slaughterhouse kidneys.
Nephron: 92(2) 414-21., 2002

37. Grosse-Siestrup C., Wiemer P.M., Fischer T.C., Fehrenberg C., Unger V., Fischer A. & Groneberg D.A.:
Isolated hemoperfused porcine skin as a valid model to assess percutaneous absorption.
 J Invest Dermatol.: 119(1) 197-9., 2002
38. Grosse-Siestrup C., Unger V., Meissler M., Nagel S., Wussow A., Peiser C., Fischer A., Schmitt R. & Groneberg D.A.:
Hemoperfused isolated porcine slaughterhouse kidneys as a valid model for pharmacological studies.
 J Pharm Sci.: 92(6) 1147-54., 2003
39. Hochel J., Lehmann D., Fehrenberg C., Unger V., Groneberg D.A. & Grosse-Siestrup C.:
Effects of different perfusates on functional parameters of isolated perfused dog kidneys.
 Nephrol Dial Transpl.: 18(9) 1748-54., 2003
40. Fehrenberg C., Baeyer, von, H., Unger V., Schmitt, R., Haider W, Quarcoo D, Groneberg D.A. & Grosse-Siestrup C.:
Protective Effects os B2 Preservation Solution (Histidine-Tryptophan-Ketoglutarate/ Bretschneider) in a Model of Isolated Autologous Hemoperfused Porcine Kidney.
 Nephron Physiol.: 96(1) 52-58., 2004
41. V. Unger, C. Grosse-Siestrup, D. A. Groneberg.
Evaluation of renal functional parameters in different settings of isolated organ hemoperfusions.
 Physiol Meas. 27: 1167-1175 (2006)
42. V. Unger, C. Grosse-Siestrup, C. Fehrenberg, A. Fischer, M. Meissler, D. A. Groneberg.
Reference values and physiological characterization of a specific isolated pig kidney model.
 J.Occup Med Toxicol. 2:1 (2007)

Danksagung

Zuerst möchte ich Herrn Prof. Dr. David Groneberg danken für die Betreuung bei dieser Arbeit. Ich habe von ihm stets aufmunternden, freundlich-professionellen Rat und Ansporn erfahren zur Verwirklichung dieses meines Dornröschen-Vorhabens einer Promotion.

Wesentliche Prägungen in meinem Werdegang als Wissenschaftler verdanke ich einmal dem verstorbenen Chirurgen Professor Dr. med. Emil Sebastian Bücherl, der als Leiter der Forschergruppe „Künstliches Herz“ Pionierarbeit in Europa und weltweit auf dem Feld der künstlichen Herzersatzsysteme leistete, sowie zum anderen Frau Professor Dr. med. Gabriele Kaczmarczyk, die mir in der Physiologie von Niere und Wasserhaushalt geduldig und freundlich-kritisch zu wesentlichem Rüstzeug verhalf.

Ohne die meist spontan verwirklichte Präsenz und Kompetenz zweier weiterer Hochschullehrer und ohne die sich anschliessenden vielen Diskussionen und Herausforderungen hätte die Thematik dieser Arbeit so nicht entwickelt werden können, wofür ich danke:

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. vet. Christian Große-Siestrup, der als Leiter der Tierexperimentellen Einrichtung der Charité in vielen Jahren immer wieder die mal offenen mal versteckten Widersprüche „Tierversuch - Tierschutz“ hat ausgleichen wollen und müssen und der das Forschungsmodell „Isoliert hämoperfundiertes Organ“ als Tierversuchersatzmethode massgeblich und führend mitformte.

Herrn Prof. Dr. med. Hans von Baeyer, der mir als Nephrologe mit seinem schier unerschöpflichen Wissen auf die Sprünge half und ohne den es diesen Perfusionsaufbau („künstliche Kieme“) und diverse „Gebräue“ (Konservierungslösung, Dialysat) so garnicht geben würde.

Für die freundliche und kameradschaftliche Unterstützung und Hilfe bei der Durchführung der Perfusionsexperimente möchte ich mich sehr herzlich bei allen Kollegen, DoktorandInnen und Freunden in der Tierexperimentellen Einrichtung bedanken, insbesondere bei den Mitgliedern des OP- und Perfusionsteams: Vildan Oyanik, Ayshe Pollin, Jenny Wolder, (jetzigen Dipl. - Ing.) Olaf Hegemann und Dr. med. vet. Michael Meissler. Der langjährigen Projektleiterin und mir freundschaftlich verbundenen Zimmernachbarin Frau Dr. med. vet. Claudia Fehrenberg danke ich für die vielen, gerade auch kritischen Diskussionen und Reflektionen.

Darüber hinaus möchte ich mich ebenfalls bei meinen weiteren Koautoren bedanken, die mir im Rahmen von Kooperationen halfen, die in dieser kumulativen Dissertation beschriebenen Ergebnisse zu publizieren. Dies sind neben den bereits oben Erwähnten: Herr Prof. Dr. Axel Fischer, Herr Dr. med. vet. Stefan Nagel, Herr Dr. Dr. Christian Peiser, Herr Dr. David Quarcoo, Herr Dr. Roland Schmitt und Frau Dr. A. Wussow

Dem Bundesministerium für Bildung und Forschung danke ich für die Förderung der Organperfusionen.

„Last“ aber nichts weniger als „least“ geht mein Dank an meine Gefährtin Anne für ihre mit sanfter Kraft und Geduld gelebte, liebevolle Begleitung und Unterstützung und an meine Töchter Charlotte und Katharina, die mir allein schon durch ihr Dasein immer wieder Freude, Gewissheit und Antrieb geben, sich zu mühen und an eine gestaltenswerte Zukunft zu glauben.

Ohne meine aufopferungsvollen Eltern, derer ich hier postum dankbar gedenke, wäre dies alles nicht.

Anhang:

Titelseiten und Abstracts der in der Publikationsdissertation von Volker Unger zusammengefassten Arbeiten

(Beschränkung aus Lizenzgründen für die Publikationen 1-4;

Der Volltext ist eventuell unter den angegebenen Pubmed-Adressen erreichbar)

PUBLIKATION-[1]

V. Unger, C. Grosse-Siestrup, D. A. Groneberg. Evaluation of renal functional parameters in different settings of isolated organ hemoperfusions. *Physiol. Meas.* 27: 1167-1175 (2006).

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Retrieve&dopt=AbstractPlus&list_uids=17028409

PUBLIKATION-[2]

C. Fehrenberg, H. von Baeyer, **V. Unger**, R. Schmitt, W. Haider, D. Quarcoo, D. Groneberg, C. Grosse-Siestrup. Protective effects of B2 preservation solution in comparison to a standard solution (Histidine-Tryptophan-Ketoglutarate / Bretschneider) in a model of isolated autologous haemoperfused porcine kidney. *Nephron Physiol* 96: 52-58 (2004).

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Retrieve&dopt=AbstractPlus&list_uids=14988662

PUBLIKATION-[3]

J. Höchel D. Lehmann, C. Fehrenberg, **V. Unger**, D. A. Groneberg, C. Grosse-Siestrup. Effects of different perfusates on functional parameters of isolated perfused dog kidneys. *Nephrol Dial Transplant* 18(9):1748-1754 (2003).

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Retrieve&dopt=AbstractPlus&list_uids=12937220

PUBLIKATION-[4]

C. Grosse-Siestrup, **V. Unger**, M. Meissler, S. Nagel, A. Wussow, C. Peiser, A. Fischer, R. Schmitt, D. A. Groneberg. Hemoperfused Isolated Porcine Slaughterhouse Kidneys as a Valid Model for Pharmacological Studies. *J Pharm Sci* 92: 1147-1154 (2003).

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Retrieve&dopt=AbstractPlus&list_uids=12761804

PUBLIKATION-[5]

V. Unger, C. Grosse-Siestrup, C. Fehrenberg, A. Fischer, M. Meissler, D. A. Groneberg. Reference values and physiological characterization of a specific isolated pig kidney model. *J. Occup. Med. Toxicol.* 2:1 (2007)

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Retrieve&dopt=AbstractPlus&list_uids=17261183

Evaluation of renal functional parameters in different settings of isolated organ hemoperfusions

Volker Unger, Christian Grosse-Siestrup and David A Groneberg

Department and Facilities of Experimental Animal Sciences, Charité—Universitätsmedizin Berlin, Free University and Humboldt University, D-13353 Berlin, Germany

E-mail: volker.unger@charite.de

Received 5 July 2006, accepted for publication 29 August 2006

Published 20 September 2006

Online at stacks.iop.org/PM/27/1167

Abstract

Isolated porcine kidneys are commonly used to study physiological and pathophysiological aspects of renal homeostasis but standardized evaluation procedures of renal function in this model do not exist so far. A double-logarithmical nomogram is established for filtration and reabsorption functions in isolated and hemoperfused porcine kidneys using different perfusion settings. Model validity was demonstrated by the levels of urine flow and sodium excretion showing expected alteration levels of lowering in the ADH-group and increasing in the furosemide-group of isolated kidneys. Creatinine-clearance values were in constant ranges within each specific perfusion group as indicated by the nomogram procedure. The present studies used a nomogram method to analyze the effects of different renal perfusion settings in a porcine model of kidney perfusion. The method may be of use to differentiate various kidney perfusion parameters both at the experimental and clinical levels.

Keywords: isolated kidney, perfusion, pig, renal function, creatinine clearance, sodium reabsorption

1. Introduction

Numerous isolated perfused kidney models have been established as models for conducting research in renal physiology and transplantation medicine.

The 'close to *in vivo*' situation of the isolated perfused kidney model, especially when the kidneys are perfused normothermically with autologous blood, exhibits unique possibilities for developing new strategies to improve graft function after transplantation. As the donor kidneys are subject to warm and cold ischemia due to the surgical process of explantation and the preservation eventually thereafter, the investigation of ischemia- and reperfusion-related injuries (Goligorsky 2005, Schrier *et al* 2004, Singbartl and Ley 2000, Zimmerman

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

Claudia Fehrenberg^a Hans von Baeyer^a Volker Unger^a Roland Schmitt^c
Wolfram Haider^a David Quarcoo^a David A. Groneberg^b
Christian Grosse-Siestrup^a

Departments of ^aComparative Medicine and Experimental Animal Science, ^bPediatric Pneumology and Immunology/Medicine, Charité School of Medicine, and ^cInstitute of Anatomy, Humboldt University, Berlin, Germany

Key Words

Isolated kidney · Autologous blood perfusion · Porcine kidney · Preservation solutions

Abstract

Reperfusion injuries after organ transplantation affect graft function and influence long-term graft survival. As hypothermic storage, which minimizes the extent of unspecific tissue injury after ischemia and reperfusion, is significantly influenced by the composition of preservation solutions, strategies to optimize the different components may lead to longer graft survival. In the present study the effects of the preservation solution B2 on early renal function and histopathological changes were compared to histidine-tryptophan-ketoglutarate solution (HTK, Bretschneider) in a model of isolated blood-perfused porcine kidneys. B2-preserved kidneys displayed a lower renal resistance and significantly better creatinine clearance as compared to HTK. Mean differences were also found for filtration fraction and sodium fraction reabsorption. The functional data were also related to histopathological changes. Together, these data indicate

that the recently developed preservation solution B2 offers new principles of preservation and is a useful preservation solution for experimental isolated perfused kidney models. B2 may also be an interesting model for optimizing preservation within other organ perfusion models.

Copyright © 2004 S. Karger AG, Basel

Introduction

Kidney transplantation is the most common organ transplantation worldwide and is established as the preferred treatment for end-stage renal failure [1]. However, dysfunction of the graft organ is a common complication that derives from numerous factors [2]. As cadaveric donor kidneys are subject to various degrees of warm and cold ischemia during the explantation and transplantation process, the development of ischemia/reperfusion injury minimizing techniques can lead to better graft function [3].

The main factor associated with reperfusion injury is cellular stress due to a prolonged lack of oxygen supply

KARGER

Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2004 S. Karger AG, Basel
1660-2137/04/0962-0052\$21.00/0

Accessible online at:
www.karger.com/nep

Claudia Fehrenberg, DVM
Biomedical Research Center, BMFZ Forum 4
Augustenburger Platz 1
DE-13353 Berlin (Germany)
Tel. +49 30 450 576141, Fax +49 30 450 576908, E-Mail claudia.fehrenberg@charite.de

Original Article

Effects of different perfusates on functional parameters of isolated perfused dog kidneys

Joachim Höchel¹, Dörte Lehmann¹, Claudia Fehrenberg², Volker Unger², David A. Groneberg^{2,3} and Christian Große-Siestrup²

¹Institute of Veterinary Physiology, Freie Universität Berlin, Berlin, ²Department of Comparative Medicine and Experimental Animal Sciences and ³Department of Pediatric Pneumology and Immunology, Charité Campus Virchow, Humboldt-University, Berlin, Germany

Abstract

Background. The isolated perfused canine kidney has been established as a valid model for conducting both renal physiology and transplantation research. This model is of particular importance for developing new strategies to improve graft function after renal transplantation. In the present study, a newly developed method using isolated haemoperfused porcine kidneys was adapted for use in canine kidneys. In contrast to haemoperfusion, synthetic perfusion media can be standardized and can prevent the initiation of blood-mediated reperfusion reactions. Thus, an additional aim was to determine whether blood could be replaced by synthetic cell-free perfusion solutions.

Methods. Canine kidneys ($n=30$) were harvested from donors euthanized in veterinary practices for causes unrelated to the present study. The kidneys were isolated and perfused with autologous blood or cell-free synthetic electrolyte buffer (Tyrode solution). During perfusion, we monitored renal perfusate flow (RPF), glomerular filtration rate (GFR), electrolyte and glucose reabsorption, oxygen consumption and urine concentration.

Results. Changes in perfusion medium did not affect the RPF. In contrast, GFR, urine concentration and oxygen consumption were significantly higher, whereas fractional excretion of sodium and glucose were significantly lower in blood- than in Tyrode-perfused kidneys.

Conclusions. This system offers a simple model for studying whole-organ functional alterations after acute renal ischaemia. Renal function indicators were below values reported during *in vivo* physiological conditions. These functions were better conserved when kidneys were perfused with autologous blood than with Tyrode.

Keywords: dog; functional state; haemoperfusion; isolated perfused kidney; perfusion solutions

Introduction

As the most frequent whole-organ transplantation worldwide, kidney transplants have been established in recent years as routine treatment for various severe renal diseases [1]. However, dysfunction of transplanted organs, which probably derives from numerous factors [2], is a common complication that limits prognosis. The development of appropriate techniques to minimize organ ischaemia and reperfusion injuries may lead to improvements in graft organ function and prognosis [3].

The isolated perfused kidney (IPK) has been established as a valid model for investigating renal functions [4–8], and may also be of great value for assessing preservation techniques [9]. Recently, a method has been developed that uses porcine slaughterhouse kidneys for IPK studies [10]. This method is based on harvesting organs during the commercial slaughter process, subsequent cold preservation and normothermic reperfusion with autologous blood. This technique is of value for transplantation research because it uses controlled renal perfusion conditions while providing an alternative to animal experiments.

In the present study, the newly developed isolated haemoperfused porcine kidney method was adapted for use in canine kidneys. Since experiments in living animals, particularly in dogs, are under increasing public criticism, these studies are of value because they allow a species-specific link between existing renal function data from canine studies and newly established IPK experiments. In particular, we studied the effects of different perfusates on renal function in order to determine whether blood as the perfusion medium

Correspondence and offprint requests to: Dr Joachim Höchel, Schering AG, Pharmacokinetics, D-13342 Berlin, Germany. Email: hoechel@vetmed.fu-berlin.de

Hemoperfused Isolated Porcine Slaughterhouse Kidneys as a Valid Model for Pharmacological Studies

CHRISTIAN GROSSE-SIESTRUP,¹ VOLKER UNGER,¹ MICHAEL MEISSLER,¹ STEFAN NAGEL,¹ ANKE WUSSOW,³ CHRISTIAN PEISER,² AXEL FISCHER,² ROLAND SCHMITT,² DAVID A. GRONEBERG^{1,4}

¹Department of Comparative Medicine and Facilities of Experimental Animal Sciences, Charité Campus Virchow, Humboldt University, D-13353 Berlin, Germany

²Departments of Medicine/Pediatric Pneumology and Immunology, Charité Campus Virchow, Humboldt University, D-13353 Berlin, Germany

³Department of Occupational Medicine, University of Lübeck, 23538 Lübeck, Germany

⁴Department of Medicine, Research Center Borstel, Parkallee 35, University of Lübeck, 23845 Borstel, Germany

Received 21 June 2002; revised 27 August 2002; accepted 8 January 2003

ABSTRACT: Mammalian models of isolated perfused kidneys provide an important tool to study pharmacological, toxicological, and physiological properties of drugs, hormones, and vasoactive substances. As organs from small laboratory animals are difficult to compare to human conditions, porcine and bovine kidneys permit better approaches to simulate human conditions. We developed an alternative model for pharmacological studies using isolated hemoperfused porcine kidneys from slaughterhouse animals to reduce laboratory animal experiments. Controlled pharmacological studies were established using furosemide (2 mg/100 g organweight) as a model drug. Kidneys were hemoperfused after a preservation period of 4.6 ± 1.7 h. In comparison to the control period, furosemide application led to significant changes in renal parameters with urine flow: $4.2/1.7$ mL/min*100 g (furosemide/control), urine-sodium: 108/77.5 mmol/L, sodium excretion: $0.47/0.14$ mmol/min*100 g; all differences significant, $p < 0.01$. The parameters stabilized to normal values as found in the control period within a period of 80 min. A second group of laboratory-harvested kidneys was examined for differences and revealed limitations of the slaughterhouse organs in parameters such as oxygen consumption. In summary, the present study demonstrates the valid use of hemoperfused slaughterhouse kidneys as a pharmacological model of renal function within the limits of the use of slaughterhouse organs, and indicates that future studies using this alternative approach could reduce animal experiments. © 2003 Wiley-Liss, Inc. and the American Pharmaceutical Association *J Pharm Sci* 92:1147–1154, 2003

Keywords: furosemide; isolated kidney; perfusion; pig; renal function

INTRODUCTION

Several types of isolated perfused kidney models have been proposed for the study of a wide variety

of pharmacological and physiological parameters.^{1–3} However, the use of small laboratory animal organs has often been unsatisfactory because drug response and renal architecture of these species may largely differ in comparison to human conditions.⁴

In contrast to rodents, drug interaction and organ geometry in porcine models are more similar to human physiology; therefore, porcine kidneys are often used in nephrology and transplantation

Correspondence to: David Groneberg (Telephone: 49-30-450-559839; Fax: 49-30-450-55951; E-mail: david.groneberg@charite.de)

Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 92, 1147–1154 (2003)
© 2003 Wiley-Liss, Inc. and the American Pharmaceutical Association

Research

Open Access

Reference values and physiological characterization of a specific isolated pig kidney perfusion model

Volker Unger*¹, Christian Grosse-Siestrup¹, Claudia Fehrenberg¹, Axel Fischer², Michael Meissler¹ and David A Groneberg^{3,4}

Address: ¹Department of Comparative Medicine and Facilities of Experimental Animal Sciences, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Free and Humboldt-University Berlin, Augustenburger Platz 1, D-13353 Berlin, Germany, ²Allergy-Centre-Charité, Otto-Heubner-Centre, Pneumology and Immunology, Charité – Universitätsmedizin Berlin; Augustenburger Platz 1, D-13353 Berlin, Germany, ³Institute of Occupational Medicine, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Ostpreussendamm 111, D-12207 Berlin, Germany and ⁴Department of Respiratory Medicine, Hannover Medical School, Carl-Neuberg-Str. 1 OE 6870, D-30625 Hannover, Germany

Email: Volker Unger* - volker.unger@charite.de; Christian Grosse-Siestrup - Christian.Grosse-Siestrup@charite.de; Claudia Fehrenberg - claudia.fehrenberg@charite.de; Axel Fischer - axel.fischer@charite.de; Michael Meissler - michael.meissler@charite.de; David A Groneberg - david.groneberg@charite.de

* Corresponding author

Published: 29 January 2007

Received: 16 November 2006

Journal of Occupational Medicine and Toxicology 2007, **2**:1 doi:10.1186/1745-6673-2-1

Accepted: 29 January 2007

This article is available from: <http://www.occup-med.com/content/2/1/1>

© 2007 Unger et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: Models of isolated and perfused kidneys are used to study the effects of drugs, hazardous or toxic substances on renal functions. Since physiological and morphological parameters of small laboratory animal kidneys are difficult to compare to human renal parameters, porcine kidney perfusion models have been developed to simulate closer conditions to the human situation, but exact values of renal parameters for different collection and perfusion conditions have not been reported so far. If the organs could be used out of regular slaughtering processes animal experiments may be avoided.

Methods: To assess renal perfusion quality, we analyzed different perfusion settings in a standardized model of porcine kidney hemoperfusion with organs collected in the operating theatre (OP: groups A-D) or in a public abattoir (SLA: group E) and compared the data to in vivo measurements in living animals (CON). Experimental groups had defined preservation periods (0, 2 and 24 hrs), one with additional albumin in the perfusate (C) for edema reduction.

Results: Varying perfusion settings resulted in different functional values (mean \pm SD): blood flow (RBF [ml/min*100 g]: (A) 339.9 \pm 61.1; (C) 244.5 \pm 53.5; (D) 92.8 \pm 25.8; (E) 153.8 \pm 41.5); glomerular filtration (GFR [ml/min*100 g]: (CON) 76.1 \pm 6.2; (A) 59.2 \pm 13.9; (C) 25.0 \pm 10.6; (D) 1.6 \pm 1.3; (E) 16.3 \pm 8.2); fractional sodium reabsorption (RF_{Na} [%] (CON) 99.8 \pm 0.1; (A) 82.3 \pm 8.1; (C) 86.8 \pm 10.3; (D) 38.4 \pm 24.5; (E) 88.7 \pm 5.8). Additionally the tubular coupling-ratio of Na-reabsorption/O₂-consumption was determined (T_{Na}/O₂-cons [mmol-Na/mmol-O₂] (CON) 30.1; (A) 42.0, (C) 80.6; (D) 17.4; (E) 23.8), exhibiting OP and SLA organs with comparable results.

Conclusion: In the present study functional values for isolated kidneys with different perfusion settings were determined to assess organ perfusion quality. It can be summarized that the hemoperfused porcine kidney can serve as a biological model with acceptable approximation to in vivo renal physiology, also if the organs originate from usual slaughtering processes.

Background

A variety of isolated and perfused kidney models has been used for the study of renal functional parameters [1-6]. If the kidneys are perfused normothermically with autologous blood, they exhibit unique possibilities for pharmacology and toxicology studies and for the improvement of the graft function after transplantation. As the donor kidneys are subject to warm and cold ischemia due to the explantation process and the preservation [7-10], the investigation of ischemia- and reperfusion-related injuries [11-15] which cause a great number of organ failures, is still very important.

While easy in use, the perfusion of small laboratory animal kidneys has often been unsatisfactory since the renal function of these animals largely differ in comparison to the human organ [16-18]. In contrast to the situation in rodent organisms, the functional morphology of porcine kidneys is closer to the situation in humans. Therefore porcine kidney perfusion systems are often used in experimental nephrology [1,19-21].

Next to the renal anatomy and function, a further advantage of porcine organs is based on the availability of organs from commercially slaughtered animals. The use of these slaughterhouse kidneys can lead to the reduction in the number of experimental animals. Legally, slaughterhouse kidney perfusion studies are not defined as animal experiments and therefore fulfill international standards in terms of establishing alternatives to animal experimentations [22].

Many perfusion settings exist for porcine kidney perfusion models but reference values for different perfusion conditions have not been defined so far. Physiological reference values out of *in vivo* animal studies are of limited meaning for the validation of the isolated kidney function due to the organ's separation from extra-organic nervous and humoral control mechanisms. For example strong poliuric states with urine flow rates of 10 ml/min and more may occur, caused partly by the absence of ADH control in this kidney model.

Therefore the present study was performed, to define comparative values of renal functional parameters in both, laboratory and slaughterhouse harvested isolated porcine kidneys. The organs were studied under different preservation and perfusion conditions and were compared to the *in vivo* renal function of pigs. Physiologically the focus was set 1.) on the glomerular filtration, determined by the exogenous creatinine clearance [23-25] and 2.) on post-glomerular mechanisms, controlling renal sodium handling. Sodium reabsorption is an active, oxygen-consuming process dependent upon sodium potassium pumps [26-28]. This had been studied already for the iso-

lated kidney of the rat [29] and also for the state of post-ischemic acute renal failure [30]. The metabolic coupling between the sodium reabsorption and the oxygen consumption [31-34] therefore is used here as a further indicator for the performance of the isolated pig kidney.

Materials and methods

Animals and experimental groups

After approval of the local official veterinarian institutions, German landrace female pigs (age six months) were used. Six differently treated groups (table 1) were analyzed for reference values. Kidneys from four groups were collected from laboratory animals in an operating theatre (A-D), kidneys of group E originated from slaughterhouse animals at an abattoir. Whereas in group (A) no preservation at all took place, the organs of the groups B-E were preserved before hemoperfusion (B, C, : 2 hrs, D 24 hrs, E about 5 hours due to the process of slaughtering and transport). In group C, albumin was added to the perfusate to approximate physiological colloid osmotic pressure with the two aims: 1.) to normalize effective filtration pressure relations in the glomerula of the kidney and 2.) to reduce the danger of edema.

The control group (CON) originated from 8 living laboratory animals, kept under controlled conditions for 1 week in the stables of the facility, inhouse with the laboratories and the operation room. The animals were provided with blood access via a cannulated external jugular vein for three days. On the second day of this period the individual animals were held in a metabolic cage for the purpose of 24 hour urine collection. The individual three day mean values of the blood samples and the 24 hour urine values were used as basic data for the CON group.

Selected results from group CON had already been presented in part in a previously published methodological study [35] to demonstrate a new graphical depiction method.

Blood collecting

For the collection of blood of the slaughterhouse animals, as previously described in detail [19,36], the cervical vessels (Venae jugularis dex.et sin., V. cava cranialis) were punctured and the collected blood was anticoagulated with sodium citrate (18 ml/l) and heparine (5.000 IE/l). The blood was then filtered (Biotest TNSB-3 transfusion device, 200 µm) and stored in sterile blood bags [2]. Alternatively, in the laboratory animals group, blood was collected under sterile conditions via the cannulated external jugular vein.

Organ collecting

The pigs of the slaughterhouse groups were electrically stunned and then exsanguinated. Then the organs were

Table 1: Isolated kidney experimental groups

Group	Organ Harvesting	Preservation time (ca. hrs)	Preservation medium	Oncotic medium	Organ numbers
A	OP	no	no	-	16
B	OP	2	B2	-	16
C	OP	2	B2	ALB	16
D	OP	24	B2	-	8
E	SLA	5	B2	-	16
CON	-	-	-	-	8

(OP: laboratory animal kidneys collected in the operating theatre; SLA: slaughterhouse organs; B2: von Baeyer solution; ALB: albumin added to the perfusate)

removed by en bloc technique, arterially cannulated and flushed with preservation solution (4°C) containing 5.000 IE/L heparine (Liquemin N, Roche). 500 ml of preservation solution (see table 2 for B2-solution pursuant to von Baeyer [8]) was then applicated into the artery and the kidneys were transferred under sterile, hypothermic (4°C) conditions from the abattoir to the laboratory.

Kidneys from laboratory animals were handled in the same way after being removed surgically. For organ harvesting by surgery, pigs were set under general anesthesia undergoing median laparotomy. The right external jugular vein was cannulated and the animal was heparinized (300 IE/kg body weight). Kidneys were removed and cannulated one by one before the animal was exsanguinated. Normally one kidney was perfused immediately and the other underwent the preservation procedure before the reperfusion.

Perfusion procedures

Perfusion procedures were carried out as previously established for kidneys and other organs [19,37,38]. Ureteral and vascular catheters were implanted and a period of warm rinsing with 500 ml of preservation solution was performed before hemoperfusion with autologous blood was conducted. The hemoperfusion started with an arterial flow of 50–100 ml/min and a mean arterial pressure never allowed to exceed 100 mmHg to ensure an optimal organ warming up and the beginning of renal autoregulation under reperfusion. Blood and urine samples for assessment of parameters were collected after entering a steady state usually after 20–30 min. Then, within clearance periods of 30 min, urine collection and blood sampling was performed and immediately followed by blood gas analysis using an automated blood gas analyser (Radiometer Copenhagen, ABL) to assess pH- and electrolyte status. Further sample fractions were stored for a later

Table 2: Preservation solutions [8]

		B2	HTK	Euro Collins
Osmolality (mosm/kg)		323	310	406
Ions (mmol/l)	Na ⁺	22	15	10
	K ⁺	150	9	115
	Mg ⁺⁺	10	4	
	Cl ⁻	10	50	15
	SO ₄ ⁻	85		
Buffers (mmol/l)	PO ₄ ⁻⁻⁻	6		
	HPO ₄ ⁻			43
	H ₂ PO ₄ ⁻			15
	HCO ₃ ⁻			10
	Histidin		198	
Osmotics (mmol/l)	Glucose			198
	Mannitol		30	
	Saccharin	40		
Colloids (mmol/l)	PEG	25		

transfer to the laboratory for analysis of multiple other parameters as listed below. Also, venous and arterial pressures and arterial flow were recorded online using ultrasonic flow transducers (Transonic Systems Inc., T206). Organ weight was also assessed directly after surgical resection (prior to eventual cold storage) and before and after reperfusion.

Perfusion system

The perfusion system consisted of separated blood and dialysis circuits as described [2], that may also be used for the perfusion of other organs and tissues, like the liver [39,40], the heart [41] or the skin [38]. The volume of heparinized (20.000 IE/l) blood was 600 ml, added with standard electrolyte solution (modified Tyrode's solution) to adjust pressures and hemoglobin concentration and to replace urine fluid loss.

The blood was pumped from the reservoir to a low-flux polysulfon dialysis system (model F7, Fresenius, Bad Homburg). Next to dialysis processes, the blood was also oxygenized in this module and then transported to the organ with a second roller-pump. After passage through the organ, the blood reached the reservoir due to hydrostatic pressure differences.

The dialysis circuit containing 10 000 ml of dialysate medium (modified Tyrode's solution) was driven by a roller pump. The dialysate circuit meets the metabolic demands of the organ and, therefore, is permanently oxygenated and nutritional substrates are added as well as cre-

atinine for the determination of the exogenic creatinine-clearance. The substrates are periodically controlled for a steady state in the composition of the dialysate. The temperature was adjusted to 38°C. Controlling of ultrafiltration und thus the perfusate dilution was maintained by continuously weighing the blood reservoir and balancing the afferent and efferent blood roller pumps. The kidneys were kept in a body warm plexi-glass chamber. Urine was collected by way of a ureteral catheter in calibrated glass cylinders.

Parameters

Apart from basic experimental data (table 3: weight parameters, ischemia time, perfusion time), hemodynamics and blood gases, hemoglobin, blood and urine pH and different electrolytes, the following parameters were measured: free hemoglobin (mg/dl), total blood protein (g/dl), creatinine-concentration in blood (mg/dl) and urine (g/l), urine flow (ml * min⁻¹ * 100 g⁻¹). By use of the described formulae (see appendix) the following parameters were determined: creatinine clearance (Cl_{crea}, ml * min⁻¹ * 100 g⁻¹), fractional water reabsorption (RF_{H2O}, %), fractional sodium reabsorption (RF_{Na}, %), tubular sodium transport (T_{Na}, mmol * min⁻¹ * 100 g⁻¹). Results are presented for the steady state of the model as 60 min values (hematology: table 4; blood, urine laboratory: table 5) and additionally with the 3 hour state for hemodynamics and renal functional parameters (table 6).

Table 3: Basic experimental data for isolated kidney experimental groups and for the control group CON of living pigs

group			CON	A	B	C	D	E
Kidney-Weight	g	mean	86,1	116,9	113,1	103,9	144,1	165,3
		SD	8,3	11,4	17,3	18,6	22,5	57,6
Preservation- Time	hrs	mean	•	•	2,04	2,01	24,14	5,20
		SD	•	•	0,35	0,04	1,04	0,84
Warm Ischemia Time	min	mean	•	7,3	8,8	6,9	7,9	17,8
		SD	•	2,1	2,8	1,6	2,4	7,3
		Signif.)*		EE	E	EE		D
Perfusion-Time	min	mean	•	206,9	218,5	213,8	207,3	197,3
		SD	•	12,9	28,9	10,6	17,3	18,4
Weight Gain Preservation	%	mean	•	•	10,3	11,9	5,1	9,8
		SD	•	•	10,2	12,7	5,6	9,4
		Signif.)*			D	D		D
Weight Gain Perfusion	%	mean	•	39,6	28,7	15,3	26,0	31,2
		SD	•	19,2	17,5	11,1	9,1	21,1
		Signif.)*		B;CC;D	C	D		D

(Signif* = Significance is denoted by capital letters labelling the resp. target group for comparison, as well as the level of significance: simple (p < 0.05) = single capital, high (p < 0.01) = twin capitals)

Table 4: Hematology values at 60 min hemoperfusion for isolated kidney experimental groups and for the control group CON of living pigs

			Blood					
			CON	A	B	C	D	E
	groups							
Hemoglobin	g/dl	mean	9,1	7,0	7,5	9,1	10,2	7,2
		SD	0,4	1,3	1,4	1,6	2,7	1,5
		Signif.)*	A;E					
Hematocrit		mean	0,32	0,22	0,24	0,29	0,31	0,23
		SD	0,02	0,04	0,04	0,05	0,09	0,05
		Signif.)*	A;E					
Free Hemoglobin	mg/dl	mean	6,1	12,9	26,8	11,4	93,0	46,8
		SD	1,3	6,1	33,6	4,1	26,1	29,7
		Signif.)*	AA	DD;EE	DD	DD;EE		
COP	mmHg	mean	17,4	6,4	6,9	16,8	6,3	5,8
		SD	3,1	1,9	2,9	5,2	2,4	2,2
		Signif.)*	AA	CC	CC	DD;EE		

(Signif* = Significance is denoted by capital letters labelling the resp. target group for comparison, as well as the level of significance: simple ($p < 0.05$) = single capital, high ($p < 0.01$) = twin capitals)

Constructing the diagram (figure 1)

To analyze the influence of multiple determinands on complex kidney function parameters, a grapho-analytical method was used, which is described in detail in a previously published article for analyzing nephrological parameters [35]. This nomogram-like method is applied here to examine the creatinine clearance used as approximation of the glomerular filtration rate (GFR).

The creatinine clearance represents the mathematical product of the U/P_{crea} quotient and the urine-flow VU. Directly displaying these two terms in a x-y diagram leads to certain curves for similar Cl_{crea} values in each experimental group, which are difficult to be distinguished from each other. Therefore the x, y data are transformed into logarithmic scaling and linear lines instead of curves are resulting for constant values of the creatinine clearance. In that way figure 1 was constructed and the interrelation of the following parameters can be analyzed: creatinine U/P quotient (U/P_{crea}), urine-flow (VU), creatinine-clearance (Cl_{crea}). As a fourth parameter, the fractional reabsorption of water RF_{H_2O} (see appendix for the formula) can be displayed, since the reciprocal expression of the U/P_{crea} quotient, arranged as $(1 - P/U_{crea})$, represents the water reabsorption along the tubular system which is numerically present in the second scale of the y-axis in figure 1.

Statistics

All assessed data are expressed as mean \pm standard deviation (SD). Statistical significance ($p < 0.05$) was tested using StatView 4.5 for Apple Macintosh: the Mann-Whitney-U test for interindividual (group) differences, the Wil-

coxon matched pairs test for intraindividual (pairwise) testing and ANOVA regression statistics.

Results

Value differences determined as statistically significant ($p < 0.05$) are denoted in the tables and notation is explained in the respective captions in detail.

General parameters

The basic experimental data are presented in table 3. The studies in groups A-D with kidneys obtained in the operating theatre (OP) were performed under comparable conditions regarding animals, organs, harvesting protocols and warm ischemia time. The latter is significantly increased in group E, the abattoir originating organs (SLA) (table 3). The weight gain of the organs after preservation shows a homogenous range of about 10 % with the significant exception of group D (5.1 %). The weight gain of the organs after reperfusion exhibits comparable values of about 30 % for groups B, D, E. Significant alterations were found for group A with 39.6 % and with a decrease to 15.3 % for the albumin group C.

Blood and urine parameters

Hematology values are presented in table 4. The hemoglobin (and also the hematocrit in direct proportionality) shows comparable value levels of about 7 g/dl for groups A, B, E, increased values of 9.1 g/l for groups CON, C and a maximum of 10.2 g/l for group E. The free plasma hemoglobin exhibits the lowest value of 6.1 mg/dl in the CON-group, light elevated values of 11.4 mg/dl (group C) and 12.9 mg/dl (group A) and significant alterations from

Table 5: Laboratory values for blood and urine at 60 min hemoperfusion of isolated kidney experimental groups and for the control group CON of living pigs

			Blood						Urine							
groups			CON	A	B	C	D	E	CON			A	B	C	D	E
Potassium	mean	mmol/l	3,84	3,8	4,6	4,7	5,9	5,7	mmol/l	87,1	8,7	18,5	12,7	20,3	25,7	
	SD		0,13	0,6	0,4	0,9	0,7	0,9		3,3	6,1	11,9	7,0	17,1	13,9	
	Signif.)*		B;D;E	D;E						AA;BB;CC; DD;EE	B;D;E					
Sodium	mean	mmol/l	141,7	140,7	136,2	139,1	131,2	134,7	mmol/l	25,1	108,9	82,2	88,8	131,1	83,9	
	SD		1,2	5,2	4,6	5,2	1,6	3,6		2,5	18,7	16,0	23,6	38,4	24,4	
	Signif.)*		D	D						AA;BB;CC; DD;EE	B;C;D;E	D	D		D	
Osmolality	mean	mosm/kg	291,2	281,5	283,7	288,1	275,8	289,9	mosm/kg	685,9	244,8	221,4	255,2	311,5	274,7	
	SD		8,4	9,9	7,7	11,4	2,1	8,9		90	24,0	33,1	63,2	133,7	57,6	
	Signif.)*									AA;BB;CC; DD;EE	D	D	D			
Creatinin	mean	mg/dl	1,05	2,5	3,4	3,5	4,9	3,7	g/l	0,98	0,13	0,15	0,34	0,08	0,22	
	SD		0,12	0,7	0,6	0,4	1,5	0,9		0,13	0,07	0,07	0,41	0,06	0,08	
	Signif.)*		A;B;C;D;E	D						AA;BB;C; DD;EE	C	C	D		D	
Urea	mean	mg/dl	21,1	19,1	22,6	22,7	27,8	24,5	g/l	17,6	0,66	0,74	1,13	0,58	0,96	
	SD		1,5	3,9	2,5	1,7	3,0	2,2		4,0	0,18	0,28	0,38	0,34	0,17	
	Signif.)*									AA;BB;CC; DD;EE	C		D		D	
Glucose	mean	mg/dl	109,4	135,3	115,8	124,6	112,8	112,3	g/l	<= 0,1	0,24	0,17	0,38	1,13	0,63	
	SD		9,2	17,9	15,0	22,7	9,5	6,7			0,19	0,14	0,29	0,16	0,34	
	Signif.)*									(AA;BB;CC; DD;EE)	DD;E	DD;E	DD		D	
Protein	mean	g/dl	5,4	3,8	4,0	5,7	3,8	2,7	mg/l	117	233	435	1087	10008	1862	
	SD		0,2	0,9	1,0	1,0	0,8	0,8		25	207	423	1203	3570	2340	
	Signif.)*		A	C				C		A;BB;CC; DD;EE	B;C;DD;E	C;DD;E	D		D	
pH	mean		7,38	7,44	7,39	7,55	7,53	7,53		6,13	6,89	6,70	7,07	6,31	6,88	
	SD		0,15	0,17	0,09	0,24	0,08	0,09		0,19	0,24	0,33	0,26	0,47	0,39	
	Signif.)*									A;B;C;E						

(Signif* = Significance is denoted by capital letters labelling the resp. target group for comparison, as well as the level of significance: simple (p < 0.05) = single capital, high (p < 0.01) = twin capitals)

this level for groups E (46.8 mg/dl) and D (93 mg/dl). The colloid osmotic pressure (COP) shows a comparable value level of around 6 mmHg for groups A, B, D, E with significant exceptions for group CON (17.4 mmHg) and the albumin group C (16.8 mmHg).

Laboratory parameters for both blood and urine are presented in table 5 for the collection time at 60 min after start of the perfusion. Generally the blood parameters were kept in approximation to the physiological ranges by periodically controlling the composition of the dialysate (see methods section) and therefore no significant alterations were found, with the exception of creatinine. Creatinine was added to the perfusate for the purpose of determination of the exogenous creatinine clearance, resulting in 3–4 fold concentration levels in comparison

to the natural blood values, determined as 1.05 mg/dl in the CON-group.

For all measured urine parameters the situation between the control group CON and all experimental groups A-E is characterized by statistically strong significant (p < 0.01) differences (compare table 5). Additionally there were some significant value differences between single experimental groups for the following parameters:

Potassium concentration with 8.7 mmol/l for group A was found significantly lower than the values for groups B (18.5 mmol/l), D (20.3 mmol/l) and E (25.7 mmol/l). Sodium for group A (108.9 mmol/l) was significantly different from lower values in groups B, C, E and also from the increased value measured for group D (131.1 mmol/l). Creatinine concentration ranged between 0.13 and

Table 6: Hemodynamic and renal functional parameters at 60 and 180 min hemoperfusion of isolated kidney experimental groups and for the control group CON of living pigs

		group	CON	A	B	C	D	E
RBF Bloodflow	ml/min*100 g	60 min	●	339.9	224.8	244.5	92.8	153.8
		SD	•	61.1	28.4	53.5	25.8	41.5
		Signif.)*		BB;CC;DD;EE	DD;E	DD;EE		D
		180 min	●	363.0	241.1	285.5	107.9	160.1
		SD	•	58.0	19.4	48.5	28.4	54.8
R Organ- Resistance	mmHg/(ml/min*100 g)	60 min	●	0.29	0.44	0.37	1.26	0.61
		SD	•	0.05	0.06	0.11	0.49	0.17
		Signif.)*		BB;C;DD;EE	DD;E	DD;EE		DD
		180 min	●	0.28	0.4	0.29	1.01	0.61
		SD	•	0.08	0.03	0.07	0.31	0.19
O2-cons Oxygen- Consumption	μmol/min*100 g	60 min	●	263.9	214.3	141.6	120.8	206.4
		SD	•	49.4	22.3	21.6	27.6	43.5
		Signif.)*		BB;CC;DD;EE	CC;DD	EE		DD
		180 min	●	246.4	213.6	142.9	116.2	198.9
		SD	•	39.4	22.9	19.0	27.6	36.8
VU Diuresis	ml/min*100 g	60 min	0.87	13.4	7.2	5.1	0.7	3.0
		SD	0.25	6.1	4.7	3.8	0.3	2.3
		Signif.)*	AA	BB;CC;DD;EE	DD;E	DD;E		DD
		180 min	●	14.4	8.9	5.7	0.4	3.2
		SD	•	6.2	5.1	3.2	0.3	2.4
Cl_{crea} Creatinine Clearance	ml/min*100 g	60 min	76.1	59.2	27.6	25.0	1.64	16.3
		SD	6.2	13.9	7.5	10.6	1.26	8.2
		Signif.)*	A	BB;CC;DD;EE	DD;EE	DD;E		DD
		180 min	●	65.9	30.5	24.1	1.04	15.2
		SD	•	10.5	4.8	7.5	0.89	9.7
FF Filtration- Fraction	%	60 min	●	22.5	15.7	14.9	2.7	13.3
		SD	•	7.2	6.7	5.3	2.5	6.4
		Signif.)*	•	B;CC;DD;EE	DD	DD		DD
		180 min	●	24.8	16.4	11.7	1.1	11.9
		SD	•	7.2	2.5	3.6	1.1	7.2
RF_{H2O} Water- Reabsorption- fraction	%	60 min	98.9	76.7	72.4	79.6	35.4	81.6
		SD	0.3	9.5	12.8	13.2	31.3	17.2
		Signif.)*	AA	DD	DD;E	DD		DD
		180 min	●	76.0	70.9	72.6	36.1	74.4
		SD	•	11.1	15.8	23.3	31.6	30.0
RF_{Na} Sodium- Reabsorption- fraction	%	60 min	99.8	82.3	83.1	86.8	38.4	88.7
		SD	0.1	8.1	10.4	10.3	24.5	5.8
		Signif.)*	AA	DD	DD	DD		DD
		180 min	●	80.9	79.4	81.0	46.5	89.4
		SD	•	7.9	13.9	18.3	31.4	6.0
T_{Na} Sodium- Reabsorption	mmol/min*100 g	60 min	10.8	6.83	3.16	2.91	0.12	1.98
		SD	1.0	2.1	1.0	1.3	0.1	1.08
		Signif.)*	AA	BB;CC;DD;EE	DD	DD		DD
		180 min	●	7.82	3.43	2.77	0.09	2.02
		SD	•	1.6	0.7	1.0	0.1	1.1

(Signif* = Significance is denoted by capital letters labelling the resp. target group for comparison, as well as the level of significance: simple (p < 0.05) = single capital, high (p < 0.01) = twin capitals)

0.15 g/l for groups A and B and differed significantly from this level in group C (0.34 g/l) and D (0.08 g/l).

Urea showed a value range from 0.58 to 0.74 g/l for groups A, B, D with a significant difference for group C (1.13 g/l).

A glucose concentration range between 0.17 and 0.38 g/l for groups A, B, C was significantly surpassed in group D (1.13 g/l).

Protein urine concentration measurements revealed three groups with significantly increased levels: group C (1.09

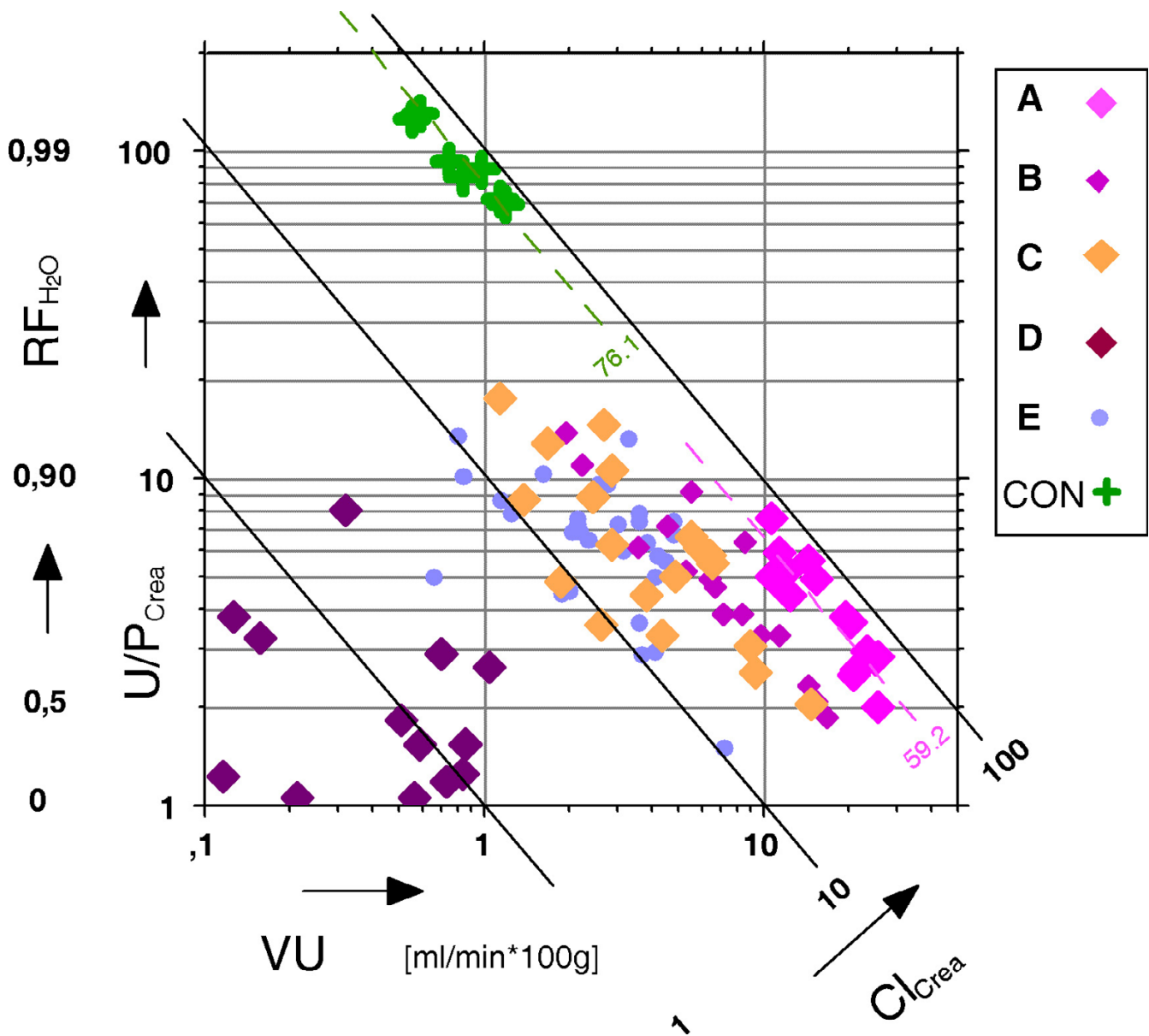


Figure 1
 The U/P quotient of creatinine U/P_{crea} versus urine flow VU for isolated kidney experimental groups A – E and for the control group of living pigs (CON) (Cl_{crea} = clearance of creatinine; RF_{H_2O} = fractional water reabsorption).

g/l), D (10.0 g/l) and E (1.86 g/l) when compared to groups A and B with a value range from 0.23 to 0.44 g/l.

Functional parameters

Table 6 shows functional parameters for the hemodynamics, oxygen consumption and for the renal functions at two perfusion time levels: 60 and 180 min. Value differences determined as statistically significant are denoted in table 6 in detail.

Hemodynamics

Hemodynamics were kept in controlled constant ranges along the group internal perfusion course concerning the arterial blood pressure, never allowed to exceed 100 mmHg in the mean. Large intergroup differences in the organ vascular resistances R are therefore reflected in significant differences of the blood flow with a maximum value at group A (339.9 ml/min*100 g) and a minimum at D (92.8 ml/min*100 g). A decreasing vascular resist-

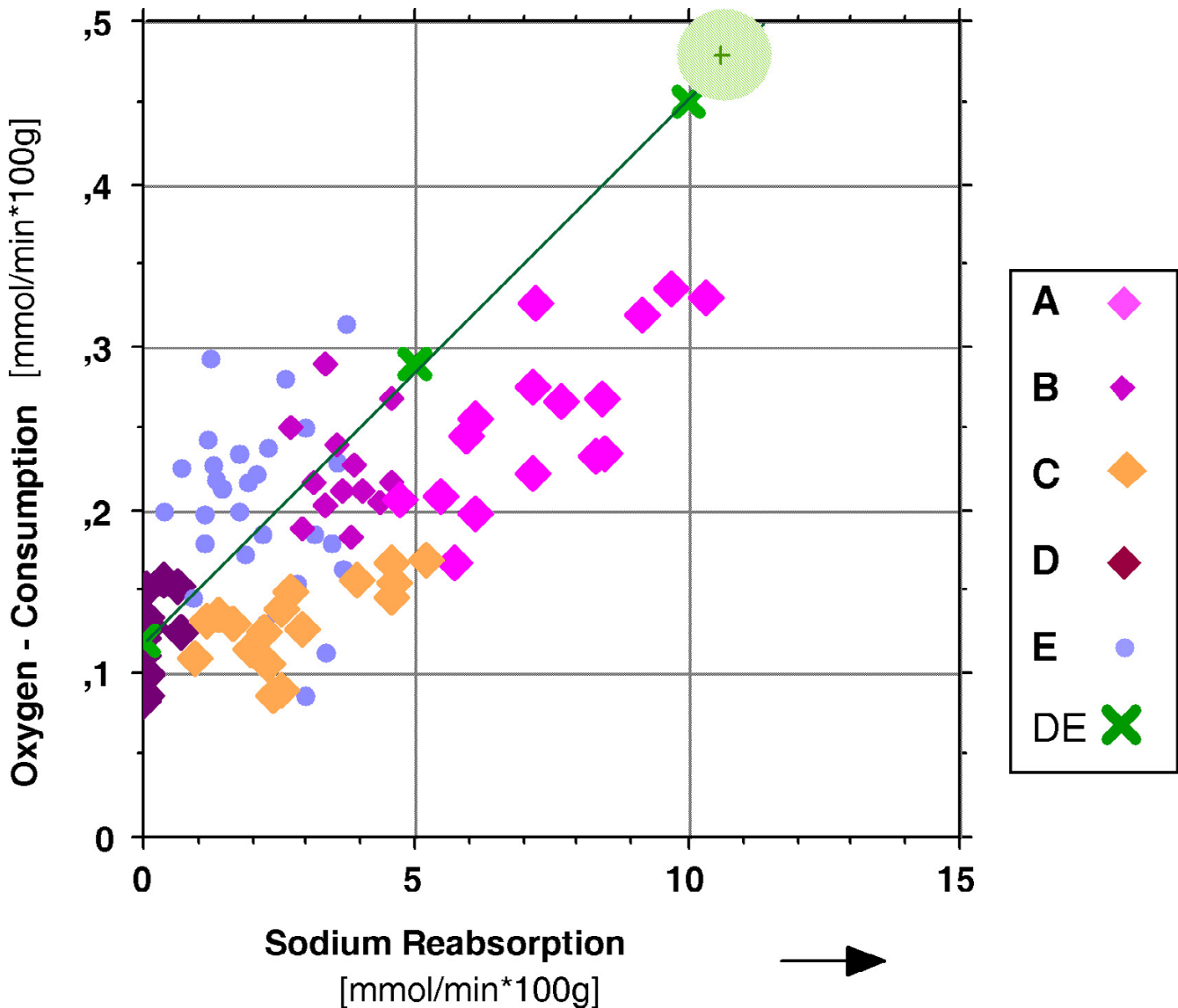


Figure 2
 Oxygen consumption O_2 cons versus fractional sodium reabsorption RF_{Na} for isolated kidney experimental groups A – E, for the control group CON of living pigs (green shadowed area) and for in vivo measurements DE (modified from: [50]).

ance in all experimental groups during the perfusion course allowed the blood flow to increase within 5–17 % (maximal in group C) between the 60 min and the 180 min state.

Oxygen consumption (O_2 cons)

The oxygen consumption exhibits analogy to the described hemodynamic situation at the 60 min state with values ranging between 263.9 $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot 100 \text{ g}$ (group A) and 120.8 $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot 100 \text{ g}$ (D).

Hemodynamics and oxygen consumption were not measured in the control animals (CON).

Diuresis (VU)

The diuresis was 15-fold in group A compared to the control value of intact animals (0.9 ml/min*100 g). The other groups ranged between 3.0 (group E) and 7.2 ml/min*100 g (group B). In group D a minimum of 0.7 ml/min*100 g was measured.

Creatinine clearance (Cl_{cred})

Creatinine clearance values reached approx. 80% of the control (76.1 ml/min*100 g) in group A (59.2 at 60 min, 65.2 ml/min*100 g at 180 min) and dropped to 2% in group D.

Table 7: Regression equations and T_{Na}/O₂ cons quotient of isolated hemoperfused porcine kidneys and of kidneys in alive animals (DE)

group	equation of regression (O ₂ cons = a + b * T _{Na})	R ²	quotient T _{Na} /O ₂ cons
A	= 0.081 + 0.024 * T _{Na}	0.56	42.0
B	= 0.131 + 0.02 * T _{Na}	0.06	50.6
C	= 0.098 + 0.012 * T _{Na}	0.43	80.6
D	= 0.109 + 0.058 * T _{Na}	0.16	17.4
E	= 0.138 + 0.042 * T _{Na}	0.05	23.8
DE	= 0.121 + 0.033 * T _{Na}	0.97	30.1

Water reabsorption fraction (RF_{H2O})

The fractional reabsorption of water showed levels between 70–80 % of the control in groups A-C, E and a minimum of 35% in group D.

Sodium reabsorption fraction (RF_{Na})

The sodium fractional reabsorption for all groups was found to be nearer to the control level than that of water: with maximal values in groups E (88.7 %) and group C (86.8 %) and a minimum at group D (38.4 %).

Sodium transport (T_{Na})

The absolute sodium reabsorption paralleled the creatinine-clearance value courses with 10.8 mmol/min*100 g for the control group (CON) and with values between 6.8 (group A) and 0.12 mmol/min*100 g for group D.

Discussion

Standards in kidney transplantation have been significantly improved during the past years [7,42-44]. They were accompanied by a large number of experimental

Table 8:

Renal blood flow	RBF
Renal plasma flow (Hct = hematocrit)	RPF = RBF * (1-Hct)
Renal resistance	R = (P _{arterial} - P _{venous})/RBF
Renal oxygen consumption	(O ₂ cons)
Hemoglobin-bound O ₂ cons	O ₂ cons _{chem} = RBF * Hb * 1.34 * (SO _{2a} - SO _{2v})
Physical (solute) O ₂ cons	O ₂ cons _{phys} = (RPF _a * pO _{2a} - RPF _v * pO _{2v}) * 0.024/760
Total O ₂ cons	O ₂ cons _{total} = O ₂ cons _{chem} + O ₂ cons _{phys}
Filtration	
Glomerular filtration rate	GFR ≈ Cl _{crea} = U/P _{crea} * VU
Filtration fraction	FF = GFR/RPF
Load of substance x	L _x = GFR * P _x
Tubular reabsorption/secretion	
Transport (absolute)	T _x = L _x - E _x
Fractional reabsorption (relative)	RF _x = T _x /L _x
Reabsorption fraction for water	$RF_{H_2O} = \left(1 - \left(\frac{1}{\frac{U}{P} \text{crea}} \right) \right)$
Reabsorption fraction for sodium	$RF_{Na} = \left(1 - \left(\frac{\frac{U}{P} Na}{\frac{U}{P} \text{crea}} \right) \right)$
Excretion	
Excretion of water = urine flow	VU
Excretion of substance x	E _x = VU * U _x
Quotient U/P for substance x	U _x /P _x
(concentration of substance x:	
P _x - plasma ; U _x - urine)	

studies using animal kidney perfusion models [1-5,16,45,46] However, exact reference values for different perfusion conditions have not been described so far and the present studies aimed to address this issue by defining reference values of renal functional parameters in both laboratory and slaughterhouse animal kidneys under different perfusion conditions.

When analyzing the blood parameters of the perfusion groups, a slight increase for free plasma hemoglobin was found in all groups. This increase can be explained by a moderate cell damage by the blood pumps which is commonly found in perfusion systems [4,41]. Also, there was a slight decrease in total blood protein in all perfusion groups that might be explained by protein adsorption at the perfusion system tubes [47] and a certain urinary protein excretion. Likewise, the slight decrease in blood hemoglobin can be explained by a loss of erythrocytes due to blood sampling as previously found in different perfusion settings [19,41].

Kidney function was studied at first at the level of glomerular filtration and four parameters: creatinine U/P quotient (U/P_{crea}), urine-flow (VU), creatinine-clearance (Cl_{crea}) and water-reabsorption (RF_{H_2O}) were analyzed by help of a special grapho-analytical method (figure 1).

This separating analysis is crucial since the Cl_{crea} is commonly used as the approximation of the glomerular filtration rate and thus can be taken as one of the principal indicators of renal function quality with a physiological mean value in the control group of 76.1 ml/min*100 g (table 6), represented in figure 1 as the dotted green line and as cross symbols for the single measurements. In comparison to this physiological *in vivo* control, the measurements for group A kidneys, presented in figure 1 and table 6, resulted in a mean value of 59.2 at 60 min of perfusion duration what is fairly comparable to the control level of the creatinine clearance.

Comparable levels of Cl_{crea} , as depicted in figure 1, means that the different values arrange along straight declining lines in the nomogram. Using this approach, two hypergroups or clusters of kidneys were found (figure 1): The first cluster containing groups CON and A arrange in a falling linear band (dotted lines) between 60–80 ml/min*100 g. The second cluster consists of groups (B, C, E) showing a broader Cl_{crea} value scattering than CON and A with a range of mean values between 27.6 ml/min*100 g (B) and 16.3 ml/min*100 g (E). A minimum Cl_{crea} of 1.6 ml/min*100 g was found in group D.

Focussing only on the parameter creatinine-clearance, group A seems to contain the best performing experimen-

tal kidneys so far. This could be supposed since group A consists of OP kidneys with no preservation at all.

Comparing the closely related Cl_{crea} levels of groups CON and A, however, one has to consider the different underlying physiological conditions (see figure 1): In the CON group the Cl_{crea} values are determined under a normal diuresis of about 1 ml/min*100 g with an U/P_{crea} of about 100. In group A, contrarily a strong poliuric state is present under isolated perfusion conditions with a 15-fold increased diuresis. Concomitant with this finding an extremely low U/P_{crea} value of 5.2 indicates a significantly reduced water reabsorption RF_{H_2O} of 76.7 % (against 98.9 % in the control kidneys). This can be explained in part by the absence of ADH control in the isolated kidney [5,48].

After kidney function analysis on the basis of these 4 parameters it seems to be doubtful to define group A as best performing in the sense of comparability to normal organ function in living animals. Rather one could presume that isolated organs partly follow their own rules, thus exhibiting a functional behaviour what could be defined as "free-running". This state is due to the kidney's secession from any higher organ control (humoral and nervous system).

With regard to the oppositional postglomerular water flow situations, observed between group A and the control group, it seems to be necessary, to consider further renal parameters and also functional and metabolic mechanisms to qualify the outcome of the isolated kidney.

In this respect, considering the nephron's handling of substrates, the tubular reabsorption of sodium is a further prominent mechanism and the fractional reabsorption of sodium RF_{Na} is the representative parameter for this function.

An application of RF_{Na} as an useful indicator to qualify renal function under isolated organ perfusion has been demonstrated in a previously published study [35] for isolated pig kidneys with differing experimental protocols.

In the experiments of the actual study however, the RF_{Na} value means of groups A, B, C, and E exhibit almost equal levels in a range from 82.3 % (A) to 88.7 % (E) without any significant differences. Only group D separates significantly with a low value of 38.4 %.

Sodium reabsorption is an energy consuming process and the physiological coupling between sodium reabsorption and oxygen consumption appeared to be a further promising tool to analyze renal sodium handling in the isolated kidney. This process is described in the literature as of lin-

ear proportionality for the mammalian kidney [31-34,49]. That relation is illustrated in figure 2 and table 7 for the experimental groups of kidneys examined in this study : The line which connects the cross symbols (denoted DE) in figure 2 in an almost ideal regression between the oxygen consumption on the y-axis and the sodium reabsorption on the x-axis, represents the physiological in-vivo situation. That part of the diagram (group DE) was adapted from in vivo studies [50] resulting in the following regression equation:

$$O_2\text{-consumption} = 0.121 + 0.0332 * T_{Na}$$

The first term on the right side of the equation (0.121) represents the basal oxygen consumption of the kidney without any sodium transport at all. The second term in its reciprocal expression equals in the following value: 30.1 mmol Na/mmol O₂, representing the number of Na-ions per oxygen-molecule actively and O₂-consuming being transported back into the blood. The equation and the values are very similarly reported in other studies [32,33,51].

Out of the isolated kidney groups in figure 2 there were found statistically acceptable (R² > 0.4) regression lines only for groups A and C (see table 7) with the following T_{Na}/O₂ cons qotients: group A 42.0 and group C: 80.6.

Taking the slope of the green line in figure 2 as the in vivo standard, steeper angles of regression lines, as could be constructed for groups D, E, would result in values of the T_{Na}/O₂ cons coupling qotient lower than the normal 30.1 mmol Na/mmol O₂. This situation is sometimes discussed as "decoupled". Because there is more than normal oxygen per unit sodium consumed, the generation of heat shock proteins (HSPs) is proposed [52] as one reason of that imbalance. These HSPs play a major roll in renal ischemia and reperfusion injury [14,53], as occurring in perfusion studies, here for the experimental groups D (longest cold ischemia) and E (longest warm ischemia).

In contrast to this situation, as found for groups A, B, C, reduced slopes of regression lines (resulting in higher T_{Na}/O₂ cons quotients, with more than the physiologically normal 30.1 Na-ions per consumed O₂-molecule, appearing in the renal venous blood), may represent tubular leakage processes [30,54].

Conclusion

The isolated perfused porcine kidney model used in our experiments, displays a useful approach towards simulating renal functions, even if the organs are collected at a commercial abattoir. It was the aim of the present study to assess renal perfusion quality under specific settings. The perfusion is affected by numerous influences and as pres-

ently indicated, large differences in renal function may appear. To evaluate the functional performance of isolated perfused kidneys, besides classical clinical parameters such as the glomerular filtration rate, water and sodium excretion, one additionally should use metabolic efficiency indices as presently discussed. While the model offers a simple way for studying whole organ functional alterations after interventions of clinical or experimental interest, caution should be paid to the exact interpretation of data.

Abbreviations

Conflict of interest statement

The author(s) declare that they have no competing interests.

Acknowledgements

The authors acknowledge the help of all members of the Isolated Hemoperfused Organs Research Group, especially Ms. Vildan Oyanik for preparing the chemical solutions and maintaining the perfusion system; Charité School of Medicine, Free University and Humboldt University Berlin. We appreciate the valuable discussions and the advice from Professor Hans von Baeyer concerning renal function and metabolism. This study had been supported by a grant of the BMBF (0311021) and the Deutsche Nierenstiftung (DAG).

References

- Hosgood S, Harper S, Kay M, Bagul A, Waller H, Nicholson ML: **Effects of arterial pressure in an experimental isolated haemoperfused porcine kidney preservation system.** *British J of Surgery* 2006, **93**:879-884.
- Grosse-Siestrup C, Unger V, Meissler M, Nagel S, Wussow A, Peiser C, Fischer A, Schmitt R, Groneberg DA: **Hemoperfused isolated porcine slaughterhouse kidneys as a valid model for pharmacological studies.** *J Pharm Sci* 2003, **92**:1147-1154.
- Höchel J, Lehmann D, Fehrenberg C, Unger V, Groneberg DA, Grosse-Siestrup C: **Effects of different perfusates on functional parameters of isolated perfused dog kidneys.** *Nephrol Dial Transplant* 2003, **18**:1748-1754.
- Arnaud FG, Khirabadi BS, Fahy GM: **Normothermic blood perfusion of isolated rabbit kidneys. II. In vitro evaluation of renal function followed by orthotopic transplantation.** *ASAIO J* 2000, **46**:707-718.
- Cuyper Y, Vandenreijt I, Bipat R, Toelsie J, Van Damme B, Steels P: **The functional state of the isolated rabbit kidney perfused with autologous blood.** *Pflügers Arch* 2000, **440**:634-642.
- Nizet A: **The Isolated Perfused Kidney: Possibilities, Limitations and results.** *Kidney International* 1975, **7**:1-11.
- Agarwal A, Murdock P, Fridell JA: **Comparison of histidine-tryptophan ketoglutarate solution and University of Wisconsin solution in prolonged cold preservation of kidney allografts.** *Transplantation* 2006, **81**:480-482.
- Fehrenberg C, Baeyer von H, Unger V, Schmitt R, Haider W, Quarcoo D, Groneberg DA, 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, **218**.
- Arnaud FG, Khirabadi BS, Fahy GM: **Normothermic blood perfusion of isolated rabbit kidneys. III. in vitro physiology of kidneys after perfusion with Euro-Collins solution or 7.5 M cryoprotectant (VS4).** *Transpl Int* 2002, **15**:278-289.
- Bishop MC, Ross BD: **Evaluation of hypertonic citrate flushing solution for kidney preservation using the isolated perfused rat kidney.** *Transplantation* 1978, **25**:235-239.
- Goligorsky MS: **Whispers and shouts in the pathogenesis of acute renal ischaemia.** *Nephrol Dial Transplant* 2005, **20**:261-266.

12. Schrier RW, Wang W, Poole B, Mitra A: **Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis and therapy.** *J Clin Invest* 2004, **114**:5-14.
13. Singbartl K, Ley K: **Protection from ischemia-reperfusion induced severe acute renal failure by blocking E-selectin.** *Crit Care Med* 2000, **28**:2507-2514.
14. Zimmerman BJ, Granger DN: **Reperfusion injury.** In *Surg Clin N A Volume 72*. Edited by: Kahan B. Philadelphia, W.B. Saunders Company; 1992:65-83.
15. Lieberthal W, Wolf EF, Rennke HG, Valeri CR, Levinski NG: **Renal ischemia and reperfusion impair endothelium-dependent vascular relaxation.** *Am J Physiol* 1989, **256**:F894-F900.
16. Sola A, Palacios L, Lopez-Marti J, Ivorra A, Noguera N, Gomez R, Villa R, Aguilo J, Hotter G: **Multiparametric monitoring of ischemia-reperfusion in rat kidney: effect of ischemic preconditioning.** *Transplantation* 2003, **75**:744-749.
17. Maack T: **Physiological evaluation of the isolated perfused rat kidney.** *Am J Physiol* 1980, **238**:F71-8.
18. Reach G, Nakane H, Nakane Y, Auzan C, Corvol P: **Cortisol metabolism and excretion in the isolated perfused rat kidney.** *Steroids* 1977, **30**:621-635.
19. Grosse-Siestrup C, Unger V, Fehrenberg C, Baeyer von H, Fischer A, Schaper F, Groneberg DA: **A model of isolated autologously hemoperfused porcine slaughterhouse kidneys.** *Nephron* 2002, **92**:414-421.
20. Kohrmann KU, Back W, Bensemann J, Florian J, Weber A, Kahmann F, Rassweiler J, Alken P: **The isolated perfused kidney of the pig: new model to evaluate shock wave-induced lesions.** *J Endourol* 1994, **8**:105-110.
21. Goujon JM, Vandewalle A, Baumert H, Carretier M, Hauet T: **Influence of cold-storage conditions on renal function of autotransplanted large pig kidneys.** *Kidney Int* 2000, **58**:838-850.
22. Grosse-Siestrup C, Fehrenberg C, Baeyer von H, Groneberg DA: **Multiple-organ harvesting for models of isolated hemoperfused organs of slaughtered pigs.** *Altex* 2002, **19**:9-13.
23. Waldmann H, Wendt M, Bickhardt K: **Kreatinin-Clearance als Grundlage klinischer Nierenfunktionsbestimmung beim Schwein.** *Tierärztliche Praxis* 1991, **19**:373-380.
24. Wendt M, Waldmann KH, Bickhardt K: **Vergleichende Untersuchung der Inulin- und Creatinin-Clearance beim Schwein.** *J Vet Med A* 1990, **37**:752-759.
25. Maack T: **Renal Clearance And Isolated Kidney Perfusion Techniques.** *Kidney International* 1986, **30**:142-151.
26. Sejersted OM, Mathisen O, Kiil F: **Oxygen requirement of renal Na-K-ATPase-dependent sodium reabsorption.** *Am J Physiol* 1977, **232**(2):F151-F158.
27. Torelli G, Milla E, Faelli A, Constantini S: **Energy requirement for sodium reabsorption in the "in vivo" rabbit kidney.** *Am J Physiol* 1966, **211**:576-580.
28. Thaysen JH, Lassen NA, Munk O: **Sodium transport and oxygen consumption in the mammalian kidney.** *Nature (London)* 1961, **190**:919-921.
29. Swartz RD, Silva P, Hallac R, Epstein FH: **The relation between sodium transport and oxygen consumption in isolated perfused rat kidney.** *Curr Probl Clin Biochem* 1977, **8**:123-132.
30. Parekh N, Veith U: **Renal hemodynamics and oxygen consumption during postischemic acute renal failure in the rat.** *Kidney Int* 1981, **19**:306-316.
31. Cohen JJ: **Relationship between energy requirements for Na⁺ reabsorption and other renal functions.** *Kidney Int* 1986, **29**:32-40.
32. Mathisen O, Monclair T, Kiil F: **Oxygen requirement of bicarbonate-dependent sodium reabsorption in the dog kidney.** *Am J Physiol* 1980, **238**:F175 - F180.
33. Knox FG, Fleming JS, Rennie DW: **Effects of osmotic diuresis on sodium reabsorption and oxygen consumption of kidney.** *Am J Physiol* 1966, **210**:751-759.
34. Kiil F, Aukland K, Refsum HE: **Renal sodium transport and oxygen consumption.** *Am J Physiol* 1961, **201**:511-516.
35. Unger V, Grosse-Siestrup C, Groneberg DA: **Evaluation of renal functional parameters in different settings of isolated organ hemoperfusions.** *Physiol Meas* 2006, **27**:1167-1175.
36. Fehrenberg C, von Baeyer H, Unger V, Meissler M, Grosse-Siestrup C: **Special aspects of organ harvesting, preservation and quality control for the isolated hemoperfusion of porcine slaughterhouse organs.** *Lab Anim Suppl* 2000:69-78.
37. Grosse-Siestrup C, Nagel S, Unger V, Meissler M, Pfeffer J, Fischer A, Groneberg D: **The isolated perfused liver: a new model using autologous blood and porcine slaughterhouse organs.** *J Pharmacol Toxicol Methods* 2002, **46**:163.
38. Grosse-Siestrup C, Fehrenberg C, Groneberg DA: **Isolated hemoperfused porcine skin as a valid model to assess percutaneous absorption.** *J Invest Dermatol* 2002, **119**:197-199.
39. Grosse-Siestrup C, Unger V, Pfeffer J, Dinh, QT, Nagel, S, Springer, J, Witt, C., Wussow A, Groneberg, DA.: **Hepatotoxic effects of polidocanol in a model of autologously perfused porcine livers.** *Arch Toxicol* 2004, **78**:697-705.
40. Groneberg DA, Grosse-Siestrup C, Fischer A: **In vitro models to study hepatotoxicity.** *Toxicol Pathol* 2002, **30**:394-399.
41. Modersohn D, Eddicks S, Grosse-Siestrup C, Ast I, Holinski S, Konertz W: **Isolated hemoperfused heart model of slaughterhouse pigs.** *Int J Artif Organs* 2001, **24**:215-221.
42. Axelrod DA, Guidinger MK, Metzger RA, Wiesner RH, Webb RL, Merion RM: **Transplant center quality assessment using a continuously updatable, risk-adjusted technique (CUSUM).** *Am J Transplant* 2006, **6**:313-323.
43. Nyberg SL, Baskin-Bey ES, Kremers W, Prieto M, Henry ML, Stegall MD: **Improving the prediction of donor kidney quality: deceased donor score and resistive indices.** *Transplantation* 2005, **80**:925-929.
44. Danovitch GM, Cohen DJ, Weir MR, Stock PG, Bennett WM, Christensen LL, Sung RS: **Current status of kidney and pancreas transplantation in the United States, 1994-2003.** *Am J Transplant* 2005, **5**:904-915.
45. Dittrich S, Groneberg DA, von Loeper J, Lippek F, Hegemann O, Grosse-Siestrup C, Lange PE: **Influence of cold storage on renal ischemia reperfusion injury after non-heart-beating donor explantation.** *96* 2004, **3**.
46. Hauet T, Baumert H, Amor IB, Goujon JM, 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**:1569-1575.
47. Lemm W, Unger V, Bucherl ES: **Blood compatibility of polymers: in vitro and in vivo tests.** *Med Biol Eng Comput* 1980, **18**:521-526.
48. Sone M, Ohno A, Albrecht GJ, Thurau K, Beck FX: **Restoration of urine concentrating ability and accumulation of medullary osmolytes after chronic diuresis.** *Am J Physiol* 1995, **269**:F480-90.
49. Kramer K, Deetjen P: **Beziehungen des O₂-Verbrauchs der Niere zu Durchblutung und Glomerulumfiltrat bei Änderung des arteriellen Druckes.** *Pflügers Arch ges Physiol* 1960, **271**:782.
50. Deetjen P, Kramer K: **Die Abhängigkeit des O₂-verbrauchs der Niere von der Na-Rückresorption.** *Pflügers Arch ges Physiol* 1961, **273**:636.
51. Thurau K: **Renal Na-reabsorption and O₂ uptake in dogs during hypoxia and hydrochlorothiazide infusion.** *Proc Soc exp Biol (NY)* 1961, **106**:714-717.
52. Kelly KJ: **Heat shock (stress response) proteins and renal ischemia/reperfusion injury.** *Contrib Nephrol* 2005, **148**:86-106.
53. Durrani NK, Yavuzer R, Mittal V, Bradford MM, Loboocki C, Silberberg B: **The effect of gradually increased blood flow on ischemia-reperfusion injury in rat kidney.** *Am J Surg* 2006, **191**:334-337.
54. Donohoe JF, Venkatachalam MA, Bernard DB, Levinsky NG: **Tubular leakage and obstruction after renal ischemia: structural-functional correlations.** *Kidney Int* 1978, **13**:208-222.