

AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR PHYSIOLOGIE II  
PROF. DR. FRANK SCHWEDA  
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Isoliert perfundierte Schweinenierensegmente -  
ein mögliches Modell zur Perfusion menschlichen Nierengewebes**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Biologie und vorklinische Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Thomas C. Beham



AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR PHYSIOLOGIE II  
PROF. DR. FRANK SCHWEDA  
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Isoliert perfundierte Schweinenierensegmente -  
ein mögliches Modell zur Perfusion menschlichen Nierengewebes**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Biologie und vorklinische Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Thomas C. Beham

Dekan:	Prof. Dr. Ralph Witzgall
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Frank Schweda
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Can Martin Sag
Tag der mündlichen Prüfung:	21.04.2026

# Inhaltsverzeichnis

<b>I. EINLEITUNG.....</b>	<b>7</b>
1. GRUNDLEGENDES ZUR NIERE .....	9
1.1. Anatomische Grundlagen .....	9
1.1.1. Makroskopische Betrachtung .....	9
1.1.2. Histologie.....	11
1.2. Physiologische Rolle der Niere .....	13
1.3. Modell Schweineniere.....	14
1.3.1. Das Schwein als medizinischer Modellorganismus.....	14
1.3.2. Anatomische sowie physiologische Relation zur menschlichen Niere.....	15
2. DAS RENIN-ANGIOTENSIN-ALDOSTERON-SYSTEM.....	18
2.1. Grundlegende Funktionsweise.....	18
2.2. Angiotensin.....	19
2.3. Aldosteron .....	19
2.4. Renin.....	20
2.4.1. Reninsynthese und Sekretion .....	20
2.4.2. Zelluläre Mediatoren der Reninsekretion.....	20
2.4.3. Systemische Regulationsmechanismen .....	21
3. ORGANPERFUSION .....	23
3.1. Historie .....	23
3.2. Physiologie des isoliert perfundierten Organs .....	26
3.3. Allgemeiner Aufbau eines Apparats zur isolierten Nierenperfusion .....	28
3.3.1. Grundlegende Komposition des Perfusionsmediums.....	28
3.3.2. Additiva.....	29
3.3.3. Kolloide.....	30
3.3.4. Oxygenierung .....	31
3.3.5. Externe Variablen .....	33
3.4. Übersicht verschiedener Tiermodelle.....	35
3.4.1 isoliert perfundierte Rattenniere.....	35
3.4.2. isoliert perfundierte Mäuseniere .....	36
3.4.3. isoliert perfundierte Schweineniere .....	38
<b>II. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>40</b>
1. KONTROLLIERTE PERFUSION VON NIERENSEGMENTEN.....	40
1.1. Perfusionsapparat .....	40
1.1.1. Grundlegender Aufbau .....	40
1.1.2. Perfusionsbehältnis .....	42

1.1.3 Oxygenierung .....	43
1.1.4 Peristaltikpumpe und zugehörige Steuereinheit .....	43
1.1.5 Schläuche und Kanülen.....	44
1.1.6 in-Line Modifikationen / zwischengeschaltete Gerätschaften .....	47
1.1.7 Temperierung .....	48
<b>1.2. Perfusionsmedium .....</b>	<b>50</b>
1.2.1. Grundkomposition.....	50
1.2.2. Additiva.....	52
1.2.3. Kolloid.....	52
1.2.4. Sauerstoffträger .....	52
<b>1.3. Operationstechnik .....</b>	<b>52</b>
1.3.1. verwendete Materialien.....	53
1.3.2. OP-Protokoll .....	53
<b>1.4. Verwendetes Gewebe .....</b>	<b>54</b>
1.4.1. Schweinenieren .....	54
1.4.2. Transport und Konservierung .....	54
<b>1.5. verwendete Reagenzien.....</b>	<b>54</b>
1.5.1. Isoproternol.....	54
1.5.2. Angiotensin II.....	54
1.5.3. EGTA .....	55
1.5.4. SNAP .....	55
1.5.5. Acetylcholin .....	55
1.5.6. Bumetanid .....	55
1.5.7. Kaliumchlorid.....	55
<b>1.6 Perfusionsprotokoll.....</b>	<b>55</b>
1.6.1. Ablauf der Perfusion .....	55
1.6.2. Nachbereitung der Organe .....	56
<b>1.7. Gütekriterien vitaler Perfusionen.....</b>	<b>56</b>
<b>2. ANALYSE.....</b>	<b>57</b>
<b>2.1. Reninimmunoassay.....</b>	<b>57</b>
2.1.1. Probenakquise .....	57
2.1.2. RIA Protokoll.....	57
<b>2.2. Histologie.....</b>	<b>58</b>
<b>2.3. Ermittlung Gewebsgewicht.....</b>	<b>59</b>
<b>2.4. statistische Auswertung.....</b>	<b>60</b>
<b>3. KORROSIONSPRÄPARATION.....</b>	<b>60</b>
<b>III. ERGEBNISSE .....</b>	<b>61</b>
<b>1. KORROSIONSPRÄPARATION.....</b>	<b>61</b>
<b>1.1. Komplette Schweinenierenpräparate .....</b>	<b>61</b>
<b>1.2. Perfundiertes Gewebe .....</b>	<b>64</b>

2. KOMPLIKATIONEN FRÜHER PERFUSIONEN UND OPTIMIERUNG DES SYSTEMS .....	67
2.1. Auswahl Kanülen / Eigenwiderstand des Systems .....	67
2.2. Auswahl Kolloid .....	70
2.3 Temperaturabhängigkeit des Perfusatflusses .....	71
3. HISTOLOGIE .....	73
4. AUSWERTUNG DER RENINSEKRETION, SOWIE DES GEFÄßWIDERSTANDS BEI GABE VERSCHIEDENER REAGENZIEN .....	74
4.1. Perfusionsprotokolle .....	74
4.1.1. Protokoll I .....	74
4.1.2. Protokoll II .....	74
4.1.3. Protokoll III .....	75
4.1.4. Protokoll IV .....	75
4.2. Interventionen .....	75
4.2.1. Isoproterenol und Recovery .....	75
4.2.2. Ang II und Recovery .....	77
4.2.3. EGTA und Recovery .....	78
4.2.4. SNAP und Recovery .....	81
4.2.5. Acetylcholin .....	82
4.2.6. Bumetanid und Recovery .....	83
4.2.7. Perfusionsdruck und Recovery .....	84
<b>IV. DISKUSSION .....</b>	<b>87</b>
1. INTERPRETATION DES EFFEKTS EINZELNER INTERVENTIONEN AUF FLUSS UND RENINSEKRETION, SOWIE VERGLEICH MIT ISOLATED PERFUSED MOUSE KIDNEY .....	87
1.1. Isoproterenol .....	87
1.2. Ang II .....	88
1.3. EGTA .....	89
1.4. SNAP .....	92
1.5. Acetylcholin .....	93
1.6. Bumetanid .....	94
1.7. Perfusionsdruck .....	96
1.8. Effektstärke in Relation zur isolated perfused mouse Kidney .....	97
2. OPTIMIERUNG DER METHODIK .....	100
2.1. Rezirkulation eines hochwertigen Perfusats .....	100
2.2. Präparation, Transport und Lagerung .....	102
2.3. Leckfluss .....	102
2.4. Pulsatile Perfusion .....	104
2.5. Closed Loop System zur druckkonstanten Perfusion .....	105
3. AUSBLICK .....	106
3.1. Aussagekraft, sowie Praktikabilität des Modells .....	106
3.2. Flussunabhängige Beurteilbarkeit der rein rezeptorvermittelten Reninsekretion .....	107

3.3. Übertragbarkeit auf den Organismus Mensch .....	108
<b>V. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>110</b>
<b>VI. ANHANG .....</b>	<b>111</b>
1. KORROSIONSPRÄPARATE DER PERFUSIONEN .....	111
2. AUSGESCHLOSSENE PERFUSIONEN .....	115
2.1. Protokoll I.....	115
2.2. Protokoll II.....	117
<b>VII. MATERIALIEN UND GERÄTE .....</b>	<b>119</b>
1. REAGENZIEN .....	119
2. VERBRAUCHSMATERIALIEN .....	120
3. LÖSUNGEN UND KITS.....	121
4. LABORGERÄTSCHAFTEN.....	121
5. SOFTWARE .....	123
<b>VIII. LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>124</b>
<b>IX. ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>135</b>
<b>X. ABKÜRZUNGEN .....</b>	<b>138</b>
<b>XI. DANKSAGUNG.....</b>	<b>140</b>
<b>XII. ERKLÄRUNG .....</b>	<b>141</b>
<b>XIII. LEBENS LAUF.....</b>	<b>142</b>

## I. Einleitung

*„Es kann indessen keinem Zweifel unterliegen, dass, je vollkommener die Methode der künstlichen Durchblutung ausgebildet wird und je mehr es gelingt das isolirte Organ unter gleichen Bedingungen wie im lebenden Körper mit Blut zu versorgen, um so mehr Lebenserscheinungen an ihm in normaler Weise erhalten bleiben und dadurch der Untersuchung zugänglich gemacht werden.“*

So urteilt Carl Jacoby 1890 in seiner Arbeit zum „Apparat zur Durchblutung isolirter überlebender Organe“ und bezieht sich darin auf primitiv anmutende Perfusionsapparate, die als Wegbereiter seiner hochmodernen Apparatur zur isolierten Durchblutung von Nieren betrachtet werden können. (1) Seither wurden verschiedenste Gerätschaften verwendet und stetig weiterentwickelt – die gleichen Bedingungen wie im lebenden Körper aber konnten bislang nicht erreicht werden. (2)(3)

Der Vorteil einer isolierten Organperfusion besteht in der Untersuchung der Organfunktion ohne Beeinflussung extraorganischer Parameter, wie Blutdruck, Hormone oder Innervierung. Es existieren verschiedene Möglichkeiten extrarenale Regulationsmechanismen auszuschalten, ohne die für vitale Funktionen notwendige Blutversorgung zu gefährden: Von der wenig invasiven Denervierung in Situ, über die Transplantation in den Blutkreislauf eines Perfusortiers, oder eben auch, als weitestgehende Maßnahme, die totale Entnahme des Organs mit anschließender Installation in einen künstlich geschaffenen Perfusionskreislauf, um eine gänzliche Kontrolle aller extraorganischer Einflüsse zu gewährleisten. (4) Allen Ansätzen der Organisolierung gleich ist der eingegangene Kompromiss zwischen Eliminierung extraorganischer Einflussparameter und möglichst vollständiger Aufrechterhaltung der im gesunden Organismus vorhandenen Organfunktionen. Die isoliert perfundierte Niere (IPN) stellt ein Konzept zur isolierten Betrachtung des Organs unter gleichzeitiger Aufrechterhaltung einer annähernd physiologischen Organmorphologie dar, die weiter desintegrierenden Modellen wie etwa Zellsuspensionen oder Gewebsschnitten in ihrer näheren Approximation der in vivo vorliegenden Zustände überlegen ist. So zeigten erste Versuche der IPN beispielsweise einen deutlich erhöhten Sauerstoffbedarf, um gerichteten Ionentransport zu gewährleisten, als durch vorhergegangene Untersuchungen an Schnitten suggeriert wurde (5). Inzwischen haben neben der isoliert perfundierten Rattenniere auch weitere Tiermodelle Einzug gehalten. Während die isoliert perfundierte Kaninchenniere bevorzugt für chirurgische Fragestellungen Anwendung findet (6), brilliert die isoliert perfundierte Mäuseniere durch eine

Vielfalt an genetisch variablen Tieren. (7) Isolierte Nierenperfusionen stellen heute den Goldstandard zur Untersuchung der Regulation der Reninsekretion dar. Renin ist maßgeblicher Mediator der systemischen Blutdruckregulation. Eine alleinige Betrachtung der Reninsekretion in Zellkulturen ist aufgrund einer Vielzahl beteiligter intrarenaler Signalkaskaden nicht möglich, aber auch eine Betrachtung in vivo ist durch systemische Gegenregulation erschwert. Bisher beschränkt sich die IPN-Technik - mit einigen wenigen historisch bedingten Ausnahmen, denen heute eingeschränkte Relevanz zugemessen werden darf (8) - auf nicht-menschliches Gewebe. Neben ethischen Bedenken, die allen Tierexperimenten anhaften, ergeben sich aus den so gewonnenen Daten also allenfalls Annäherungen an die menschliche Physiologie, die letztlich oftmals nur auf zellulärer Ebene übertragbar sind. (9) Die vollkommene Abbildung komplexer, humanphysiologischer Zusammenhänge ist speziesübergreifenden Differenzen geschuldet aber kaum möglich. Eine Perfusion menschlichen Gewebes stellt entsprechend eine interessante Alternative dar, Experimente am gesunden Organ sind aus offensichtlichen ethischen Gründen aber nicht rechtfertigbar. Beim Großteil derjenigen menschlichen Organe, die für wissenschaftliche Zwecke Verwendung finden, handelt es sich um Tumornephrektomiepräparate. Nur selten ist eine Niere vollständig von Tumor durchsetzt, so dass zumeist gesundes Gewebe, das nicht für weiterführende Diagnostik benötigt wird, verfügbar ist. Ziel dieser Arbeit war daher die Etablierung eines Modells zur isolierten Perfusion von Nierensegmenten, das die Grundlage für Experimente an gesundem, menschlichem Nierengewebe aus Tumornephrektomien legen soll. Hierzu wurden aufgrund der anatomischen Ähnlichkeit Versuche an Schweinenierensegmenten durchgeführt. In isolierten Perfusionen dieser Nierensegmente (isolated perfused pig kidney segments, IPPKS) waren aus Versuchen an isoliert perfundierten Mäuse und Rattennieren bekannte Daten zur Regulation der Reninsekretion replizierbar. Die hier präsentierte Methodik stellt daher einen wichtigen Schritt für die zukünftige Translation der isoliert perfundierten Niere auf menschliches Gewebe dar. Neben des Anspruchs ethischer und rechtlicher Natur, welcher der Arbeit an humanem Gewebe inhärent ist (10)(11), stellt dabei insbesondere die fragmentäre Natur humaner Resektate ein bislang ungekanntes Problem der Organperfusion dar.

Ergebnisse der vorliegenden Monographie wurden als Teil der Arbeit „Isolated perfusion of pig kidney segments to study renal function - a translational model for human kidneys“ bei Sage Laboratory Animals 07/2025 zur Veröffentlichung akzeptiert.

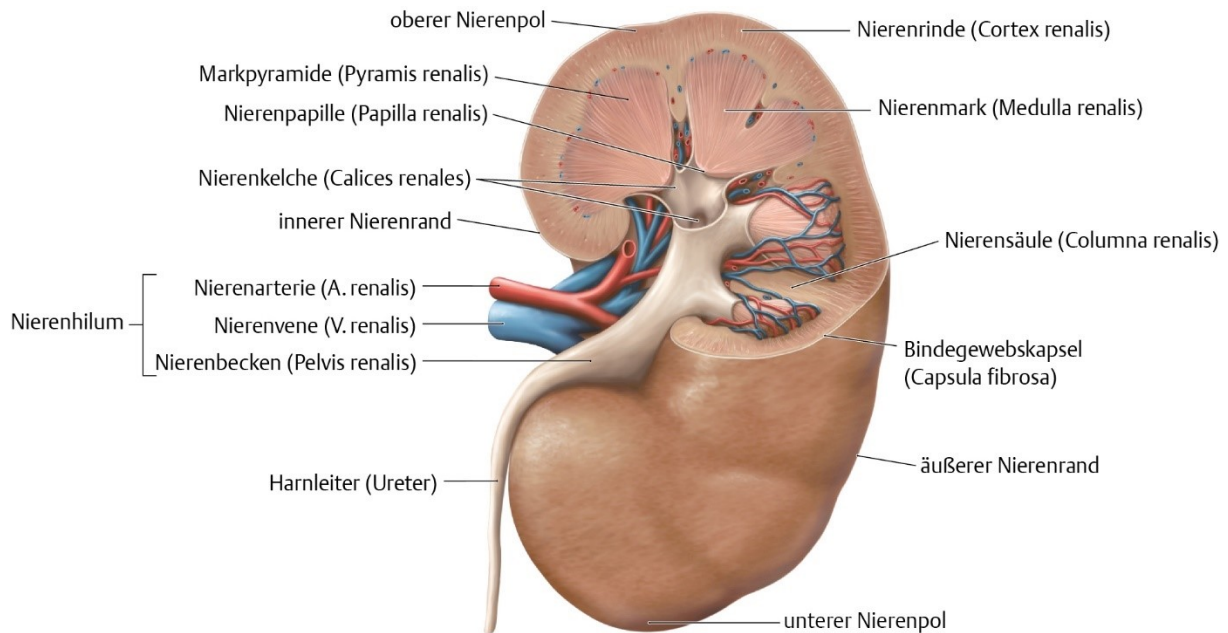
## 1. Grundlegendes zur Niere

Der menschliche Körper besteht zu beinahe zwei Drittel aus Wasser. Die Nieren sind das wichtigste Organ zur Regulation des Flüssigkeitshaushalts und werden ihrer Schlüsselrolle entsprechend mit etwa 1200 ml Blut pro Minute - oder gut 20-25% des Herzzeitvolumens - durchblutet. So sind die Nieren neben der Regulierung von Volumen und Zusammensetzung der extrazellulären Flüssigkeit, welche die Aufrechterhaltung von Plasmaosmolarität, pH und der wichtigsten Elektrolyte, sowie die Ausscheidung von Stoffwechsellendprodukten und Schadstoffen beinhaltet, auch als endokrines Organ über die Sekretion von Renin und Erythropoetin an der Blutbildung und Blutdruckregulation maßgeblich beteiligt. (12)

### 1.1. Anatomische Grundlagen

#### 1.1.1. Makroskopische Betrachtung

Die Nieren des gesunden erwachsenen Menschen sind paarig angelegte, bohnenförmige Organe, die sich im Retroperitonealraum paravertebral etwa auf Höhe der Wirbel Th12-L3 befinden. Am konkaven Medialrand befindet sich der Hilus, welcher eine Pforte für den Durchtritt der Nierenarterie (A. renalis), der Nierenvene (V. renalis) und des Ureters, darstellt. Betrachtet man die Niere im Querschnitt, lässt sich das Gewebe in die blasse Nierenrinde (Kortex), sowie das kräftig gefärbte Mark (Medulla) unterteilen. Die Medulla kann weiter in 10-12 kegelförmige Markpyramiden unterteilt werden, deren Spitzen (Papillae renales) frei in die Nierenkelche hineinragen. Basal der Pyramiden durchsetzt das Mark strahlenartig den Kortex und wird daher als Markstrahlen (Radii Medullares) bezeichnet. (12) Abhängig von verschiedenen Einflussfaktoren können die physiologischen Dimensionen des Organs einen Pol-zu-Pol Durchmesser von 9-13 cm, bei einem transversalem Querschnitt von etwa 4-6 cm x 4-6 cm und ein Gewicht von etwa 100-150g betragen. (13)(14, 15) Das Organ ist von einer derben Bindegewebskapsel umgeben, welche die Niere von der kappenartig dem kranialen Pol angelagerten Nebenniere trennt. Der so gebildete topographische Organkomplex ist in ein Fettlager gebettet, welches wiederum von einem Faszien sack umhüllt wird. Die Gefäße der Niere sind sowohl Vasa publica, als auch vasa privata und dienen somit nicht der alleinigen Versorgung des Organgewebes, sondern stellen auch das Blut für die notwendigen Aufbereitungs- und Regulationsfunktionen der Niere bereit. (16)



Aus: Schünke M, Schulte E, Schumacher U. PROMETHEUS LernAtlas der Anatomie. Illustrationen von Voll M und Wesker K. 5. Auflage. Stuttgart: Thieme; 2018

Abbildung 1 Schaubild Niere [Prometheus Lernatlas der Anatomie 5. Auflage, 2018]

Die **Blutversorgung** der Nieren wird über die aus der Aorta abdominalis abzweigenden Aa. renales gewährleistet. Diese teilen sich noch vor Eintritt in den Hilus des Organs in einen posterioren, superioren und inferioren, sowie in den meisten Fällen wenigstens einen intermediären, medialen oder suprahilären Anteil auf, welche für die Versorgung der apikalen, anterior superioren, anterior inferioren, caudalen und posterioren Nierensegmente als Endarterien (ohne Anastomosen untereinander) zuständig sind. (17). Aus diesen Segmentarterien gehen durch weitere Aufteilung Interlobararterien hervor, die sich ihrem Namen entsprechend in den Columnae renales zwischen den Markpyramiden erstrecken und an der Basis derselben schließlich die Arcuaten abgeben, welche an der Grenze zwischen Mark und Rinde verlaufen. Jede A. Arcuata gibt dabei mehrere senkrecht Richtung Kortex verlaufende Aa. Interlobulares ab, aus denen sich wiederum die afferenten Arteriolen speisen, welche das Kapillarnetzwerk der Glomeruli formen. Die Aa. Interlobulares ziehen dann zwischen den Markstrahlen weiter Richtung Kapsel, wo sie in einem oberflächennahen Kapillarnetzwerk enden. Die aus den Glomeruli der oberflächlichen Nephronen abgehenden efferenten Arteriolen bilden im Anschluss einen peritubulären Kapillarplexus, während sie bei juxtamedullären Nephronen (maßgeblich zum Konzentrationsgefälle des Nierenmarks beitragende marknahe Nephronen mit ins Mark reichender Henle-Schleife) in die Vasa recta übergehen, Richtung Mark ziehen und die Sauerstoffversorgung desselben und der begleiteten

Henleschleife gewährleisten. Die venöse Drainage der peritubulären Kapillaren läuft über die Vv. Interlobares, um dann gemeinsam mit den Vasa Recta in die Vv. Arcuatae zu münden. Ab diesem Punkt folgt der venöse Abfluss dem bereits besprochenem Verlauf der Arterien. Die nervale Innervation der Nieren erfolgt durch den Sympathikus, der das Organ über die Ggll. Aorticorenalia erreicht und überwiegend durch Vasokonstriktion wirkt. Eine mögliche Innervation durch den Parasympathikus gilt weiterhin als umstritten. (16)

### 1.1.2. Histologie

Das **Nephron** stellt die kleinste Funktionseinheit der Niere dar und setzt sich aus dem Glomerulus, sowie der zugehörigen Bowman-Kapsel und dem Tubulussystem zusammen. Der Terminus Glomerulus beschreibt ein komplexes Kapillarknäuel, welches sich aus 30-40 parallelgeschalteten Gefäßen zusammensetzt. Jede Niere besteht dabei aus etwa einer Millionen Nephronen, wobei die genaue Anzahl an Nephronen ebenso hochvariabel ist, wie die individuelle Größe und Filtrationsleistung. Die **glomeruläre Kapillarschlinge** fungiert als Filtereinheit des Nephrons und lässt sich dabei im Wesentlichen in drei Komponenten untergliedern. Das glomeruläre fenestrierte Epithel stellt hierbei mit seinen 70-100nm großen Fenestrae die erste vom Plasma zu überwindende Barriere dar und wirkt als Vorfilter. Darauf folgt die aus einer komplexen Verschaltung von extrazellulären Proteinen aufgebaute – und wie die anderen beiden Schichten - negativ geladene glomeruläre Basalmembran, die wesentlich zur Undurchlässigkeit gegenüber den meisten ebenfalls negativ geladenen Plasmaproteinen beiträgt. Außen sitzen den Kapillaren der Glomeruli Podozyten - sternförmige Zellen, deren Ausläufer die Gefäße rankenartig umfassen - auf und stellen so das viszerale Blatt der Bowman-Kapsel dar. Die von den Ausläufern der Podozyten gebildeten 30-40 nm großen Zwischenräume werden durch sogenannte Schlitzmembranen durchspannt, welche den finalen und feinsten Teil des glomerulären Filters bilden. (18) Diese komplexe glomeruläre Filterbarriere gewährleistet eine größen- und ladungsselektive Filtration der Blutbestandteile. (19)

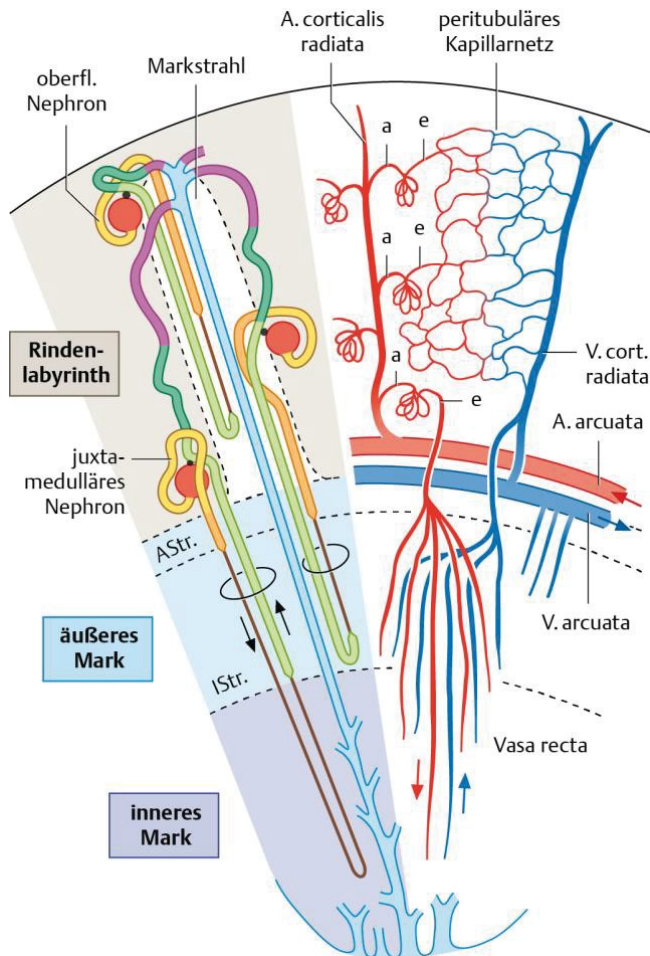


Abbildung 2 Histologischer Aufbau der Niere [Lüllmann-Rauch, Taschenlehrbuch Histologie, 4. Auflage, 2012]

Das so filtrierte Plasma bezeichnet man als Primärharn. Es durchwandert im Anschluss den **Tubulusapparat**, der sich aus proximalem, Intermediär-, sowie distalem Tubulus zusammensetzt und für unerlässliche Sekretions- und Rückresorptionsvorgänge und dadurch letztlich die Konzentration des Primärharns zuständig ist. Der proximale und distale Tubulus lässt sich dabei weiter in einen geraden (pars recta) und einen gewundenen (pars convoluta) Teil untergliedern, der Intermediärtubulus in einen absteigenden (pars descendens) und aufsteigenden (pars ascendens). Die geraden Teile des proximalen und distalen Tubulus bilden zusammen mit dem Intermediärtubulus die Henle-Schleife, die - wie bereits oben erwähnt - für den Konzentrationsgradienten des Nierenmarks unerlässlich ist. Dabei verlaufen die partes rectae in den Markstrahlen, während der Intermediärtubulus weiter ins Mark zieht. Die partes convolutae mehrerer distaler Tubuli münden schließlich ins Sammelrohr, welches nach weiterer Aufkonzentrierung die nun als Sekundärharn bezeichnete Flüssigkeit über die Papillae renales ins Kelchsystem drainiert. Von dort gelangt der Sekundärharn über das Nierenbecken in den Harnleiter und schlussendlich in die Harnblase. (16)

## 1.2. Physiologische Rolle der Niere

Die **glomeruläre Filtrationsrate (GFR)** beschreibt dasjenige Plasmavolumen, welches von den 2 Millionen Nephronen beider Nieren zusammen filtriert wird und entspricht also dem Volumen des produzierten Primärharns. Sie beträgt beim gesunden Erwachsenen etwa  $120 \frac{ml}{min}$  oder 170 l pro Tag und gilt als einer der wichtigsten klinischen Parameter der Nierenfunktion. Um den renalen Perfusionsdruck konstant zu halten, verfügt die Niere über eine ausgeprägte, durch ein geschicktes Zusammenspiel des Bayliss-Effekts und des tubuloglomerulären Feedbacks charakterisierte, **Autoregulation**, die eine weitgehend konstante renale Perfusion im Bereich von 80-180 mmHg ermöglicht. Hierbei beschreibt der Bayliss-Effekt eine auf gestiegenen Gefäßdruck resultierende, kompensatorische Vasokonstriktion(20)

Für das **tubuloglomeruläre Feedback** von maßgeblicher Bedeutung ist der am glomerulären Gefäßpol befindliche juxtaglomeruläre Apparat, der sich aus Macula Densa (MD), dem extraglomerulären Mesangium und den reninsezernierenden juxtaglomerulären Zellen in der Media der afferenten Arteriole zusammensetzt. Bei den Macula Densa-Zellen handelt es sich um dicht gepackte Epithelzellen am Übergang von pars recta auf pars convoluta des distalen Tubulus, welche über einen luminalen  $Na^+/K^+/2Cl^-$  Typ 2 (NKCC2) Cotransporter als Chemosensor fungieren. Das tubuloglomeruläre Feedback unterliegt einer Aktivierung oder Hemmung in Abhängigkeit von der durch die Macula Densa registrierten NaCl-Konzentration. Hierbei kann eine gesteigerte Salzkonzentration an der Macula Densa für eine Überlastung der proximal gelegenen renalen Resorptionsmechanismen sprechen, was zur Freisetzung von Transmittern wie ATP oder dessen Abbauprodukt Adenosin führt. Diese Botenstoffe gelangen zur afferenten Arteriole und lösen dort eine  $Ca^{2+}$ -vermittelte Vasokonstriktion aus. (21) Über das tubuloglomeruläre Feedback hinaus ist der juxtaglomeruläre Apparat via Verbindung zu den reninsezernierenden granulierten juxtaglomerulären Zellen auch maßgeblich an der Freisetzung der Peptidase Renin und somit an der Regulation des Blutdrucks beteiligt.

Außer harnpflichtigen Stoffwechselendprodukten enthält der Primärharn auch lebensnotwendige Blutbestandteile deren Ausscheidung fatale Folgen hätte. Auch Aber kann die nur etwa 20% des effektiven, renalen Plasmaflusses betragende Filtrationsfraktion eine weitere Sekretion von ausscheidungspflichtigen Stoffwechselendprodukten notwendig machen. Die Komposition des Primärharns muss also im Tubulussystem durch **Resorption und Sekretion** noch maßgeblich verändert werden. Neben einer für die Regulation des Volumenstatus bedeutsamen weiteren Harnkonzentrierung erfolgt so auch eine Steuerung des

Elektrolyt- sowie Säure-Basen-Haushalts. Die Resorption erfolgt dabei sowohl aktiv über luminal und basolateral gelegene Transporter in den epithelialen Zellen des Tubulus, als auch passiv durch das osmotische Gefälle in die peritubulären Kapillaren. Die Sekretion folgt denselben Prinzipien, beschreibt aber den genau umgekehrten Weg. (21)

Abgesehen von den bislang besprochenen Aufgaben übernimmt die Niere auch **endokrine Funktionen**, wie etwa die Reninsekretion, auf die wir später noch im Detail zu sprechen kommen.

### 1.3. Modell Schweineniere

#### 1.3.1. Das Schwein als medizinischer Modellorganismus

Die Verwendung von tierischem Gewebe zu biomedizinischen Forschungszwecken hat **lange Tradition**. So berichtet Heinrich von Staden bereits bei den frühhellenistischen Ärzten Herophilus und Erasistratus von ersten überlieferten anatomischen Studien, deren Ergebnisse sich der Spezies der Paarhufer zuordnen lassen. Weiter erwähnt er auch ganz konkret an Schweinen durchgeführte Abhandlungen zum Herz eines ungenannten Autors. Aber auch davor bezog sich bereits Aristoteles beispielsweise in seinem Werk „De Partibus animalium“ (3.4.666b18-21) auf die Physiologie und Anatomie von Schweinen neben anderen Artiodactyla. (22) Man kann daher wohl davon ausgehen, dass nicht überlieferte Experimente noch weit länger zurück reichen. Auch **heute** finden Schweine noch extensive Anwendung als Versuchstiere, wie aus Daten des Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft zu Versuchen nach § 7 Absatz 2 des Tierschutzgesetzes hervorgeht. Demnach wurden in Deutschland im Jahr 2019 18792 Tierversuche an Schweinen gemeldet; 15583 davon zu Zwecken der Grundlagen- und translationalen, sowie angewandten Forschung. Neben den Nagetieren macht dies das Schwein zum bedeutsamsten Modellorganismus unter den Säugern. Wohl der Signifikanz des Schweins für die Fleischerzeugung geschuldet befassten sich gut die Hälfte der durchgeführten Versuche zwar speziell mit Tiererkrankungen und Tierhaltung, in der breiten Auswahl an biomedizinischen Forschungsgebieten, die sich mittlerweile auf (Mini-) Schweine als Versuchstier der Wahl berufen, aber spiegelt sich die Bedeutung des Schweins als Modell für den menschlichen Organismus dennoch unverkennbar wider. (23)

Schon lange wird das **Schwein als Goldstandard** für Xenotransplantation, umweltbedingte Risikoermittlung und Medikamentenentwicklung betrachtet. (24) Während Nagetiere als Mittel der Wahl für viele Bereiche der Grundlagenforschung genutzt werden, sind sie aufgrund von Unterschieden im Bezug auf Lebenserwartung, Größe, Stoffwechsel, und Anatomie, sowie Physiologie nur bedingt für die translationale Forschung geeignet. (25) Das Schwein im

Gegensatz dazu, kommt dem Menschen in all den genannten Punkten deutlich näher, ist ihm etwa auf gentischer Ebene dreimal so ähnlich wie die Maus (als häufigst verwendetes Versuchstier) und spiegelt so die menschliche (Patho)physiologie und Entwicklung deutlich besser wider. Zudem ist die Probengewinnung für Experimente zumeist unkompliziert, und die Tiere zeigen auf viele Medikamente eine dem Menschen ähnliche, dosisabhängige Wirkung.

In Anbetracht **ethischer Bedenken** zur Verwendung von Hunden oder Primaten wird der Aufschrei nach Alternativorganismen laut. (26) Wohl hauptsächlich aufgrund der exzessiven Kultivierung von Schweinen zur Fleischproduktion werden Versuche an Schweinen oft als ethisch weniger verwerflich angesehen. Darüber hinaus kann dadurch aber natürlich auch auf einen reifen Erfahrungsschatz zu Haltungsformen, Zucht, Entwicklung, Immunologie und Krankheitsmanagement zurückgegriffen werden. (24)

Hinzukommend hat die vollständige Entschlüsselung des porzinen Genoms 2012 völlig **neue Wege der Forschung** eröffnet. Die so gewonnenen Daten nämlich ermöglichen eine gezielte Genalteration und gelten daher als Wegbereiter der kontinuierlichen Neuentwicklung verschiedener Schweine-Modellstämme, wie wir sie bereits von Mäusen kennen. Entsprechend ist die Anzahl der Publikationen, die sich mit dem Schwein als biomedizinischen Modellorganismus beschäftigen, in den letzten Jahren rasant gestiegen. (25) Die so stetig wachsende Datenlage ermöglicht eine leichtere Übertragbarkeit der gewonnenen Ergebnisse untereinander, die sich beispielhaft in der Etablierung einheitlicher Referenzwerten abzeichnet. (27) Aufgrund der angemessenen Größe erfreut sich das Schwein desweiteren besonderer Beliebtheit für chirurgische Studien – dient es nicht etwa schon lange dem chirurgischen Training in der ärztlichen Ausbildung. (28) Ganz im Gegensatz dazu sind viele Operationen alleine aufgrund der anatomischen Dimensionen nur schwer an Nagetieren durchführbar. Auch ist eine Übertragung vieler für den menschlichen Organismus bereits lange etablierter Verfahren, wie etwa MRT und PET-CT auf das Schwein möglich. (24) Es ist also wohl kaum übertrieben das Schwein als den biomedizinischen Modellorganismus der Zukunft zu betiteln.

### 1.3.2. Anatomische sowie physiologische Relation zur menschlichen Niere

Zum Zwecke unserer Forschung ist vor allem die Ähnlichkeit der porzinen und humanen Niere von Bedeutung. Dabei spielen anatomischen Überlegungen, die die Entwicklung der notwendigen chirurgischen Präparation erlauben, wie auch funktionelle Betrachtungen eine Rolle, um eine Übertragbarkeit der gemessenen Daten auf den menschlichen Organismus zu gewährleisten.

**Die anatomischen Verhältnisse** des Schweins sind denen der menschlichen Niere sogar ähnlicher als diejenigen anderer Primaten. Die Nieren der Paarhufer sind wie die menschlichen mehrwarzig und glatt, anders als die unipapillären der meisten Versuchstiere. Weitaus wichtiger stellen sich tubuläre, glomeruläre, sowie interstitielle **Schädigungs- und Entzündungsvorgänge** den menschlichen quasi ident dar.

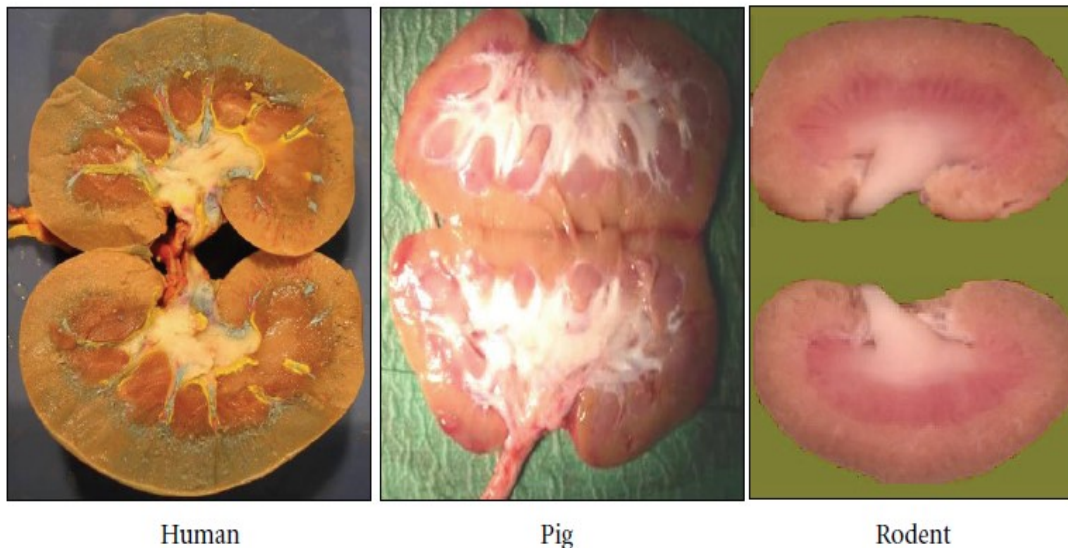


Abbildung 3 Makroskopischer Vergleich Menschenniere (links), Schweineniere (Mitte) und Nagetierniere (rechts) [Giraud S. et al.(2011): Contribution of large pig for renal ischemia-reperfusion and transplantation studies: the preclinical model.]

Die **porzine A. renalis** teilt sich in eine obere (Abb.4, B1) und untere Segmentarterie (Abb.4, B2), während sich die humane Nierenarterie zunächst in einen ventralen (Abb.4, A1) und dorsalen Ast (Abb.4, A2) aufteilt. (28) Während die menschliche A. renalis oftmals paarig angelegt ist, entspringt beim Schwein stets nur ein Gefäß pro Niere, welches dann, wie eben angesprochen, in eine kraniale und kaudale Segmentarterie aufzweigt, die schließlich je einen ventralen (Abb.4, B3) und dorsalen Ast (Abb.4, B4) bilden. Beim Menschen ist das Aufteilungsschema deutlich komplexer (s. 1.1.1 Makroskopische Betrachtung) und endet in vier oder fünf Segmentarterien (Abb.4, A3). (29) Die Schweineniere lässt sich nach ihrer Gefäßversorgung dementsprechend in zwei bis fünf Segmente unterteilen, wobei das kraniale und kaudale Segment (entsprechend der primären Aufteilung der Nierenarterie) die bedeutsamsten sind. Sie sind bei allen Nieren ausgebildet und versorgen unabhängig von nachfolgenden Gefäßaufteilungen den größten Anteil der Niere. Die menschliche Niere untergliedert sich zumeist in vier bis fünf Segmente, von denen der ventrale und dorsale Anteil am bedeutsamsten ist. (30) Sowohl beim Menschen als auch Schwein lässt sich daher im kranialen Nierensegment eine ventrale und eine dorsale Segmentarterie antreffen (Abb.4,

A4/A5, bzw. B3/4), eine apikale Arterie dagegen nur bei etwa einem Drittel der Schweine, aber quasi bei jedem Menschen. Auch im dorsalen Mittelsegment ist aufgrund der relativen Kontinuität im Verlauf der posterioren Segmentarterie ebendiese bei quasi allen Menschen anzutreffen (Abb.4, A3), dagegen aber nur bei gut der Hälfte der untersuchten Schweine (Abb.4, B5). Lediglich im ventralen Mittelsegment ist sowohl beim Menschen als auch Schwein in gut zweidrittel der Fälle ein medialer Ast anzutreffen. Im kaudalen Segment teilte sich in über 80% der Schweine- und 60% der Menschennieren die untere Segmentarterie in einen ventralen und dorsalen Ast auf (Abb.4, A6/7; B6/7) , während bei den restlichen Niere die Versorgung des dorsale Anteils aus der hinteren, respektive oberen (beim Menschen) Segmentarterie geliefert wurde. Auf die oben beschriebenen Parallelen der intrarenalen Gefäßaufzweigung fußt unsere Wahl des kaudalen Nierenpols als präferiertes Gewebestück für Perfusionen. (29)

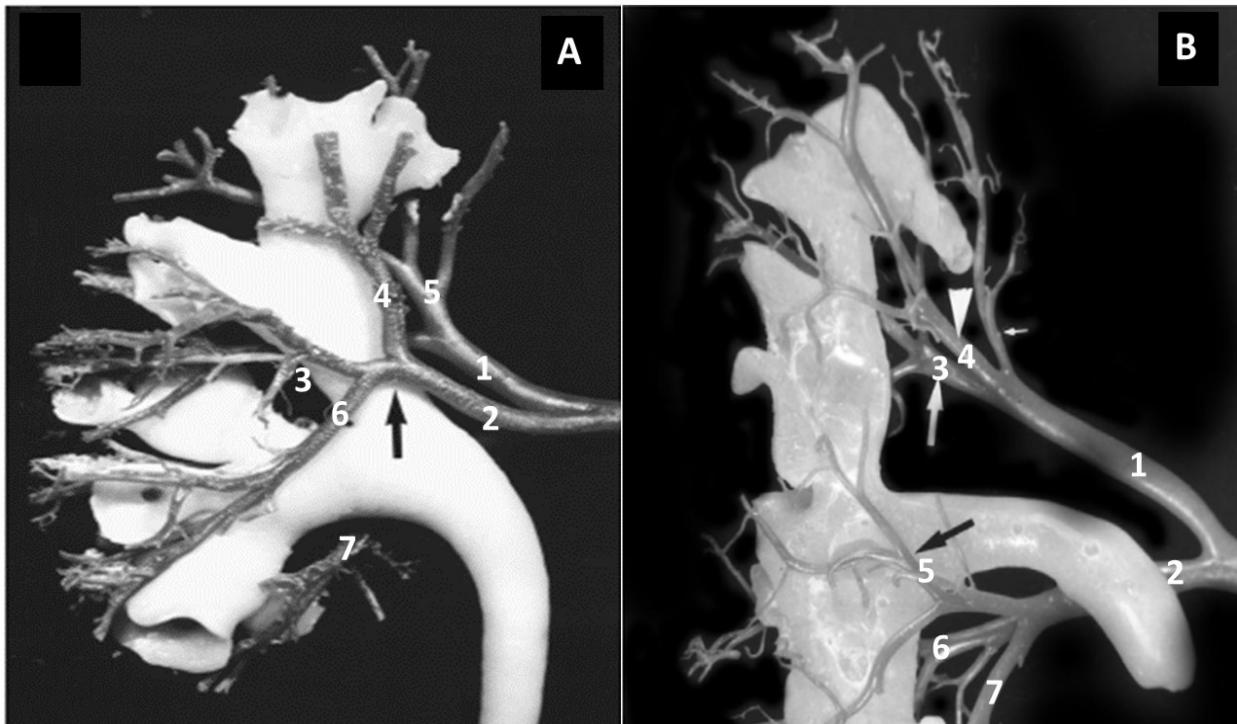


Abbildung 4 Vergleich Gefäß- sowie Kelcharchitektur der menschlichen (A), sowie porcinen Niere (B). Es handelt sich hierbei, um eine linke Schweineniere und eine rechte menschliche Niere. Zur besseren Anschaulichkeit wurde das Bild der menschlichen Niere hier gespiegelt. Jeweils dorsale Ansicht. [Pereira-Sampaio MA et al. (2004): Pig kidney: anatomical relationships between the intrarenal arteries and the kidney collecting system. Applied study for urological research and surgical training. J Urol. 172(5 Pt 1):2077-81.]

Das **Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)** betreffend existieren einige interspezielle Differenzen der Struktur von Renin, Angiotensin I und Angiotensin II. (31) Renin zeigt dabei eine ausgeprägte Substratspezifität, was das humane Angiotensinogen zu einem schlechten Substrat für das Schweinerenin macht. (32) (31)

## 2. Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

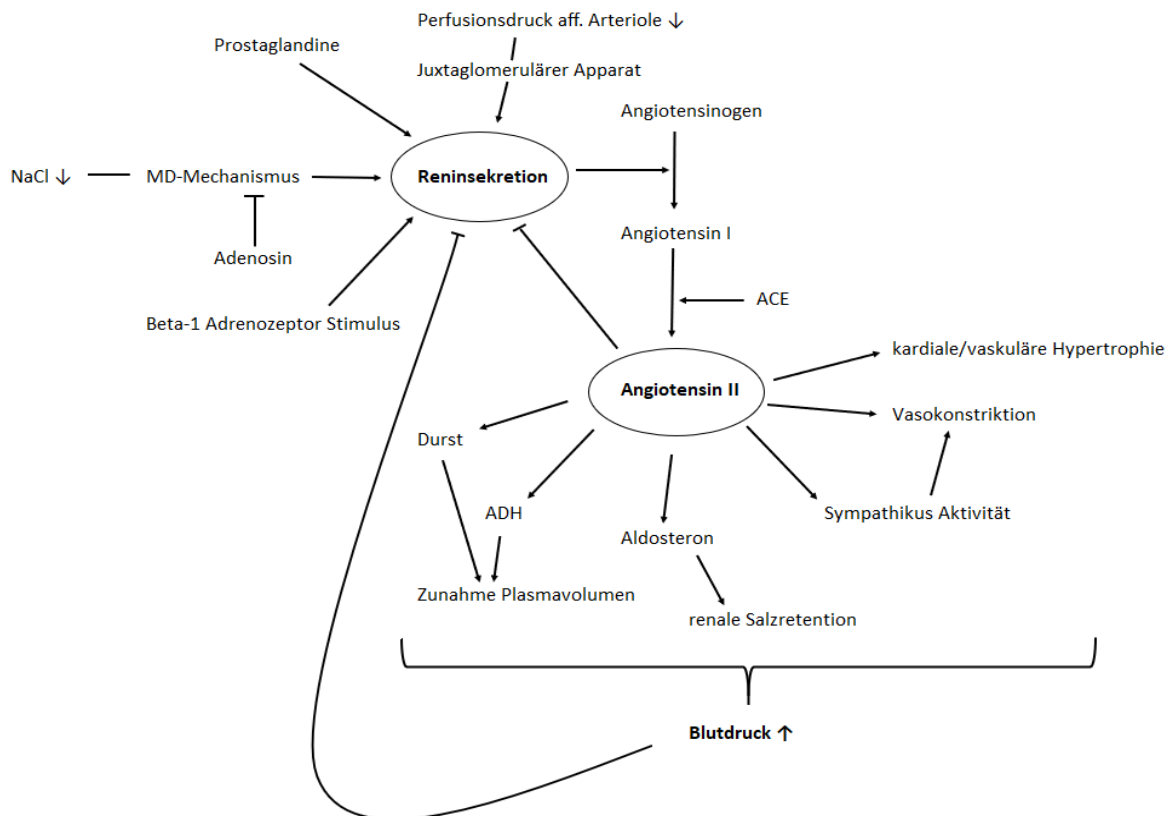


Abbildung 5 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System oder kurz RAAS bezeichnet eine hormonelle Kaskade zur Regulation des Salz- und Wasserhaushalts und des Blutdrucks.

### 2.1. Grundlegende Funktionsweise

Renin spaltet im ersten Schritt der Reaktionskette das kontinuierlich in der Leber gebildete Precursor-Protein Angiotensinogen N-terminal, sodass das Hormon Angiotensin I (Ang I) entsteht. Da es sich hierbei um den reaktionskinetisch langsamsten Schritt handelt, nimmt die Reninfreisetzung maßgeblichen Einfluss auf die Aktivität des RAAS. Das Dekapeptid Ang I wird von der ubiquitär membrangebundenen Zink-Metalloprotease Angiotensin Converting Enzyme durch C-terminale Hydrolyse in das aktive Oktapeptidhormon Angiotensin II (Ang II) umgewandelt. (33)(34) Neben der Hydrolyse von Ang I, ist ACE auch am Abbau von vasodilatatorisch wirkenden Prostaglandinen, wie etwa Bradykinin und Kallidin beteiligt.

## 2.2. Angiotensin

**Angiotensin II** ist ein starker Vasokonstriktor und ist der wesentliche Vermittler der physiologischen Funktionen des RAAS. Allerdings gibt es Hinweise darauf, dass auch die durch weitere hydrolytische Abspaltung N-terminaler Aminosäuren aus Ang II entstehenden Abbauprodukte **Angiotensin III (Ang III) und Angiotensin IV (Ang IV)** als Blutdrucksregulatoren im Gewebe fungieren. (34) (35) Bislang sind vier Angiotensin Rezeptoren (AT<sub>1</sub>-AT<sub>4</sub>) bekannt, wobei die klassische Wirkung von Ang II über den **AT<sub>1</sub>-Rezeptor** vermittelt wird. Dies beinhaltet neben der bekannten Vasoreaktion unter anderem eine Steigerung der renalen Salzretention und des Blutdrucks, eine Aktivierung des Sympathikus, sowie gesteigerte Aldosteronsekretion aus der Nebennierenrinde und ADH-Freisetzung aus dem Hypophysenhinterlappen in Kombination mit Durstgefühl. (34)(36) Auch die negative Rückkopplung der Feedbackschleife, welche bei ansteigender Angiotensin II-Freisetzung die Reninsekretion inhibiert, wird über AT<sub>1</sub> mediiert. Eine pathologische Überaktivierung wird für verschiedene Krankheitsprozesse verantwortlich gemacht. Neben kardialer und vaskulärer Hypertrophie und daraus resultierender Fibrosierung, beinhaltet dies auch oxidativen Stress und inflammatorische Prozesse. (34)

## 2.3. Aldosteron

Das Mineralcorticoid Aldosteron wird in der Zona Glomerulosa des Nebennierencortex gebildet und vermittelt als finaler endokriner Botenstoff im RAAS durch eine gesteigerte Na<sup>+</sup> Resorption mit konsekutivem osmotischen Wassernachzug, einen Anstieg des Plasmavolumens und dadurch eine Steigerung des systemischen Blutdrucks. An der Zielzelle wirkt das Hormon über zytosolische **Mineralcorticoidrezeptoren (MR)**, um dann als Transkriptionsfaktor die Expression verschiedener Gene zu regulieren. Primär geschieht dies durch eine stimulierte Expression, sowie Offen-Wahrscheinlichkeit des epithelialen Na<sup>+</sup>-Kanals (ENaC) im distalen Tubulus und Sammelrohr – aber auch im Kolon, sowie in Schweiß- und Speicheldrüsen, der die Resorption von Natrium im Austausch gegen Kalium entsprechend ihres Konzentrationsgradientens ermöglicht. (37),(38) Zur Aufrechterhaltung dieses Konzentrationsgefälles als treibende Kraft des Ionenaustauschs ist weiterhin eine simultane Hochregulation der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase nötig. (36)

## 2.4. Renin

Die Regulation des RAAS hängt wie bereits anskizziert ganz wesentlich von der Aktivität der Endopeptidase Renin ab.

### 2.4.1. Reninsynthese und Sekretion

Die Reninfreisetzung wird von verschiedenen Einflussfaktoren bestimmt: Einerseits durch direkte Stimulation von Barorezeptoren der afferenten Arteriole, als Antwort auf Abweichungen vom Sollwert des Perfusionsdrucks, zum anderen indirekt in Form einer Diskrepanz der gemessenen NaCl-Konzentration an der Macula Densa als Korrelat renaler Hypotonie, die über den juxtaglomerulären Apparat mediiert wird. (s. I.1.2.). Darüber hinaus spielt auch Beta-1-Adrenozeptor-vermittelte sympathische Innervation, sowie durch die Ang II-Konzentration bestimmte negative Rückkopplung eine wichtige Rolle. (34)

Hinter der Exozytose von Renin steckt ein komplexer **Mechanismus**. Renin wird als Pre-Prorenin synthetisiert und auf dem Weg zum Endoplasmatischen Retikulum durch Abspaltung der Signalsequenz in das Vorgängermolekül Prorenin umgewandelt, welches so zum Golgiapparat gelangt. Von dort spalten sich die zur regulierten Sekretion ausgewiesenen Vesikel in Form von Dense Core Secretory Granules ab. Sie beinhalten zu diesem Zeitpunkt neben Prorenin verschiedene Proteasen und Protonenpumpen, die einen intrazellulären pH-Wert im Bereich von 4-6 gewährleisten. Das so geschaffene Milieu ermöglicht die Autoaktivierung der Proteasen, welche schließlich wiederum die ebenso pH-abhängige Umwandlung von Prorenin durch N-terminale Abspaltung des Propeptids ins aktive Renin ermöglichen. (39)

### 2.4.2. Zelluläre Mediatoren der Reninsekretion

Auf zellulärer Ebene wird die Reninsekretion essentiell durch die **cAMP-Signalkaskade** bestimmt. So ist eine Stimulation der Reninfreisetzung sowohl durch Aktivierung der Adenylatzyklase mit resultierendem Anstieg der cAMP-Konzentration und cAMP-Analoga, als auch über Inhibition der cAMP-Phosphodiesterasen (PDEs), welche für den Abbau von cAMP zuständig sind, möglich. (40)

Eine Besonderheit der zellulären Kontrolle der Reninsekretion ist eine augenscheinlich antinome Antwort auf den Anstieg der **intrazellulären Calciumkonzentration**. (40) Führt Calcium in anderen sekretorischen Zellen zu einer gesteigerten Exozytose, so korreliert die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in juxtaglomerulären Zellen reziprok mit der Reninausschüttung, wie anhand einer Inhibition der Reninsekretion durch Calcium-mobilisierende Substanzen, wie Endothelin, Angiotensin II oder Vasopressin gezeigt werden

konnte; eine Beobachtung, die den Terminus des Calcium-Paradoxons der Reninsekretion geprägt hat. Ursächlich für das Calcium-Paradoxon ist die inverse Beziehung zwischen Calcium- und cAMP-Konzentration in juxtaglomerulären Zellen. (39)

Darüber hinaus wird die Reninsekretion durch das **Membranpotential** mitbestimmt. So führt Hyperpolarisation zu einer gesteigerten Exozytose von Renin, während Depolarisation den gegenteiligen Effekt hat. Eine komplexe Rolle in der Reninsekretionskaskade übt **cGMP** aus. Geringe Aktivierung der membranständigen Guanylatzyklase (GC), sowie cGMP-Analoga wirken über Proteinkinase G (PKG) inhibierend, während ausgeprägte Stimuli, sowohl der membrangebundenen, als auch der zytosolischen GC, vermutlich über eine PDE3-Hemmung einen Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration und dadurch einen Stimulus medieren. (40)

### 2.4.3. Systemische Regulationsmechanismen

Wie bereits angesprochen inhibieren calciummobilisierende Hormone, wie Endothelin, Vasopressin und Ang II, aber auch Hemmstoffe der ATPase des endoplasmatischen Retikulums (SERCA), wie etwa Thapsigargin über einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration die Reninfreisetzung. (39) Adenosin sowie Ang II bedingen über rezeptorvermittelte Inhibition der Adenylatzyklase eine verminderte cAMP-Konzentration. (40) Im Gegensatz dazu wird durch  $\beta$ 1-Adrenozeptoraktivierung oder andere Mediatoren einer gesteigerten Adenylatzyklaseaktivität die Reninsekretion stimuliert. (39)(40) ANP stellt einen Stimulus für die membrangebundene Guanylatzyklase dar und führt somit, ebenso wie membrängängige cGMP-Analoga zu einer gehemmten Reninexozytose, während NO, wie auch NO-Donoren über die zytosolische Variante wirken und somit eine gesteigerte Reninsekretion vermitteln. (40)

Prominenterweise wird der Reninhaushalt lokal über die Komposition des tubulären Ultrafiltrats, sowie den Blutdruck der afferenten Arteriole reguliert. Der **Barorezeptor** vermittelte Effekt auf die Reninsekretion wird in vivo dadurch verfälscht, dass ein erhöhter Perfusionsdruck zu einer gesteigerten Salzmenge an der Macula Densa führt, die ebenfalls zur Reninregulation beiträgt. Experimentelle Befunde, bei denen trotz Hemmung des Chemosensors der Macula Densa die Druckabhängigkeit der Reninsekretion erhalten wurde, allerdings vermögen die Existenz eines solchen Barorezeptors, wie auch dessen Bedeutsamkeit zu verdeutlichen. (40) Der genaue Mechanismus dahinter ist bislang noch unklar, allerdings scheint für die inverse nonlineare Beziehung eine physiologische extrazelluläre Calciumkonzentration, sowie die intakte Verbindung der juxtaglomerulären Zellen über Gap Junctions von Bedeutung zu sein. Weiterhin spielt für den vermittelten inhibitorischen Effekt

bei erhöhten Drücken A1-Rezeptor-Aktivierung durch Adenosin eine Rolle, während der stimulatorische Effekt durch Prostaglandine und NO mediiert zu sein scheint. (40) Dass Ang II einen potenten Vasokonstriktor darstellt und in dieser Funktion Barorezeptor-vermittelt eine Hemmung der Reninausschüttung bewirkt, lässt Rückschlüsse darauf zu, dass das Peptidhormon einen Teil seiner negativen Rückkopplung AT1 unabhängig vermittelt. (41)

Die salzabhängige Regulation der Reninsekretion durch den **Macula Densa Mechanismus** (s. I.1.2.) war lange nur Thema von Spekulationen. Abschließend belegt werden konnte sie erst dadurch, dass Furosemidgabe (ein Schleifendiuretikum, das den als Chemosensor der MD dienenden NKCC2 hemmt) in isolierten afferenten Arteriolen nur bei Assoziation mit Macula Densa Zellen eine Stimulation der Reninsekretion gewährleistet. Die Interpretation dieser Datenlage ist in vivo dadurch erschwert, dass Furosemid diesen stimulatorischen Effekt nicht exklusiv durch Überbrückung des MD-Chemosensors, sondern auch über sinkenden Perfusionsdruck, sowie Inhibition des juxtaglomerulären NKCC1, der eine direkte Steigerung der Reninexozytose bewirkt, veranlasst. (40) (42) Eine hohe Aktivität des NKCC2, wie sie sich aus einer gesteigerten Salzlast bei erhöhtem Perfusionsdruck ergibt, wirkt also inhibitorisch auf den Reninhaushalt und eine niedrige Aktivität umgekehrt stimulierend. Dennoch wird der Effekt des Chemosensors nicht wie lange Zeit angenommen über die Natriumkonzentration reguliert; vielmehr scheint die Chloridaufnahme durch MD-Zellen die Funktion des Mechanismus maßgeblich zu bestimmen, wie sich aus Substitutionsversuchen von  $\text{Na}^+$  und respektive  $\text{Cl}^-$  ergab. (42)

Das Verständnis der Funktion von **NO als parakriner Faktor** leidet unter der komplexen Interaktion mit verschiedenen Zelltypen, sowie der Möglichkeit einer zur stimulatorischen Funktion, oppositären inhibitorischen Wirkung. Inhibitoren der NO-Synthase (NOS) entkoppeln den MD mediierten, stimulatorischen Effekt niedriger NaCl-Konzentrationen auf die Reninfreisetzung. Einer angesprochenen inhibitorischen Rolle, welche möglicherweise bei unphysiologisch hohen NO Konzentrationen dominiert, scheint NO dabei über direkte Aktivierung cGMP abhängiger Proteinkinasen gerecht zu werden. (42)

### 3. Organperfusion

#### 3.1. Historie

*„Mais si l'on pouvoit suppléer au cœur par une sorte d'injection, et si en même temps on avoit, pour fournir à l'injection d'une manière continue, une provision de sang artériel, soit naturel, soit formé artificiellement, en supposant qu'une telle formation soit possible, on parviendroit sans peine à entretenir la vie indéfiniment dans quelque tronçon que ce soit“<sup>1</sup>*

So proklamierte Julien Jean La Gallois in seiner 1812 erschienenen Abschrift „Expériences sur le principe de la vie“ den revolutionären Gedanken, der den Grundstein der Jahrhunderte umfassenden Entwicklung der Organperfusion bilden sollte. Gallois selbst führte dabei keine Perfusionen im eigentlichen Sinne aus; seine Erkenntnisse beruhen auf einer Reihe aus heutiger Sicht krude anmutender Vivisektionsexperimente an Kaninchen, in denen der Autor schrittweise Teile des Versuchstierkörpers resezierte, und schließlich urteilte, dass das Restgewebe, solange nur eine intakte Verbindung zu Herz und künstlich beatmeter Lunge gewahrt werden konnte, bis zu 45 Minuten am Leben erhalten werden kann. (43)

**Erste Versuche** einer vom restlichen Organismus getrennten, also isolierten Durchblutung der Niere werden Carl Eduard Loebell attestiert. Im Jahre 1849, beschrieb er einen Versuchsaufbau, in dem defibriniertes Blut durch eine Schweineniere getrieben wurde. (44)(45) Dem primitiven Aufbau des Perfusionsapparats geschuldet sollte hierbei eher von einem **Durchflussversuch** gesprochen werden, wie er auch 1877 von Bunge und Schmiedeberg zum Nachweis der PAH-Synthese in Hundenieren bemüht wurde. (46) Die treibende Kraft für die Durchströmung stellte hierbei nämlich keine Pumpe dar, sondern ein 1,75 m über der Niere befestigter Ballon, der als Reservoir für das defibriniertem Blut diente. (47, 48)

Eine **Weiterentwicklung** erfuhr die Technik 1862 in Ernst Bidders Inaugural-Dissertation „Beiträge zur Lehre von der Function der Nieren“ durch Implementierung eines Druckapparats, der ein Anlegen eines beliebigen renal-arteriösen Drucks über eine Quecksilbersäule ermöglichte. Er stellte fest, dass der maximale Durchfluss mit etwa 500 ml in 30 Minuten, trotz des artifiziell hohen Drucks von 160-200 mmHg, nur einem Bruchteil des eigentlich erwarteten Volumens entsprach. (45) Sicherlich spielte dabei eine reflektorische Konstriktion der

---

<sup>1</sup> sinngemäß übersetzt: „Wenn wir das Herz allerdings mit einer Art Injektion versorgen könnten, und gleichzeitig einen Vorrat an arteriellem Blut natürlichen oder artifiziellen Ursprungs hätten, um diese Injektion kontinuierlich zu speisen, dann wäre - unter der Annahme der Possibilität einer derartigen Formation [hierbei bezieht der Autor sich möglicherweise auf eine vorher im Text beschriebene vorhandene intakte Verbindung des Gewebes zu Herz und Lunge]- eine Lebenserhaltung jeglicher Sektionen ohne weiteres möglich.“

afferenten Arteriole auf den unphysiologisch hohen Druck eine Rolle - als alleinige Erklärung ist sie aber nicht ausreichend; so sollte sich diese Beobachtung in den Ergebniskanon zukünftig durchgeführter Experimente einreihen. Auch stellte der Autor im Einklang mit Loebell einen Flüssigkeitsverlust des Blutes nach Durchlaufen der Niere fest, der allerdings im Verlauf der Experimente abnahm, was auf einen Verlust der glomerulären Filtrationsrate bei prolongierter Versuchsdauer hinzuweisen schien. (45)

Eine feste **Etablierung der Methodik** gelang erst Carl Ludwig und dessen Mitarbeiter Alexander Schmidt. (3) Im Zeitraum von 1867-1869 entwickelten die Forscher im Rahmen von Experimenten zum Gashaushalt arteriellen und venösen Blutes den Perfusionsapparat stetig weiter. (46) Sie führten eine kontinuierliche Reperfusion des aufgefangenem venösen Perfusats, sowie Regulation der Temperatur auf 37 - 40°C ein. (49) Auch diese Forscher dokumentierten eine drastische Vasokonstriktion im Verlauf ihrer Experimente, die sich durch einen Anstieg des Initialdrucks von 60 mmHg auf zuletzt etwa 400 mmHg bei konstanten Flussverhältnissen zeigte. (50)

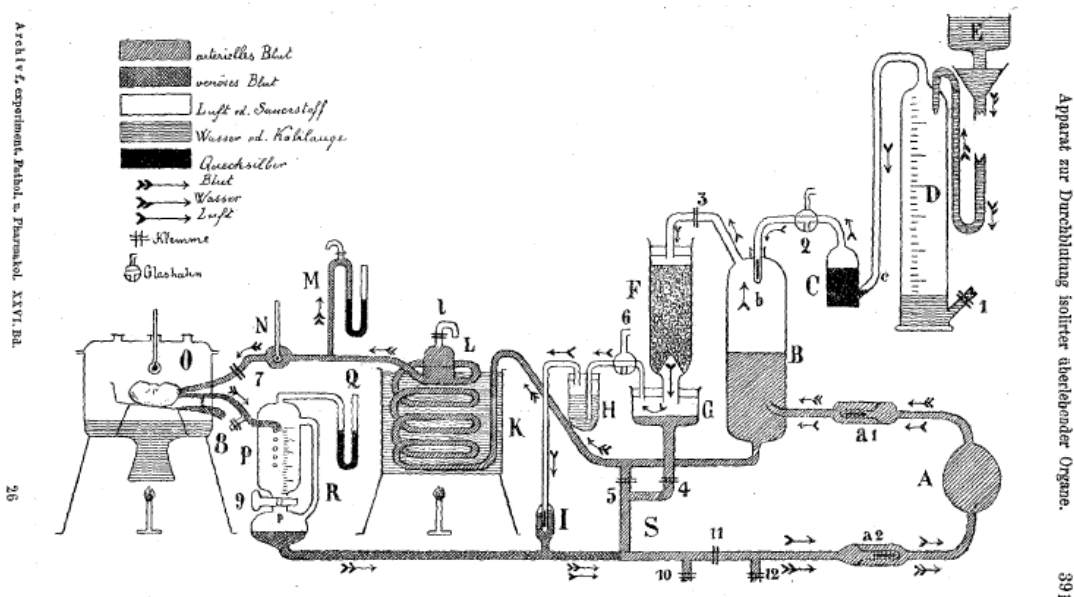


Abbildung 6 Apparat zur Durchblutung isolierter Organe nach Jacoby. A: Künstliches Herz; B: Reservoir für Luft und Blut; D: Sauerstoffgasometer H: Kohlensäureabsorber; K: Glasspirale zur Erwärmung des Blutes; O: Gefäß zur Aufnahme des Organes; P: Messzylinder zur Bestimmung des Blutflusses. [Archiv f. experiment. Pathol. und Pharmakol. 1890; 26:S. 388-400]

1890 veröffentlichte Carl Jacoby in seiner Arbeit „**Apparat zur Durchblutung isolierter überlebender Organe.**“ eine detaillierte Schilderung eines hochmodernen Perfusionsapparats - bezeichnet als Hämatasator (51) - der Elemente einer 1885 von Frey und Gruber entwickelten Anlage, wie etwa eine pulsatile Ballonpumpe und einen kontinuierlichen Oxygenator, übernahm, dem aber innovative Neuimplementationen hinzufügte, die sich in ihrem Prinzip bis in erste Herz-Lungen-Maschinen, aber auch heutige Perfusionsapparate erhalten haben.

Zwischen venösem Auffang und arteriellem System wurde das Blut fortwährend durch ein Gasometer oxygeniert und CO<sub>2</sub> im Gasgemisch durch Kalilauge gebunden. Für seine Experimente betrieb er die Pumpe in pulsartigen Intervallen von 60-80 Kompressionen pro Minute im Bereich von 120-160 mmHg, der Druckpegel und die Rate der Kontraktion dabei allerdings war beliebig variierbar. Auch dieser Autor beschrieb einen geringeren Fluss als erwartet und dunkelvioletten venösen Ausfluss. (3)

1895 fügte Jacobj diesem Aufbau eine künstlich beatmete Lunge als Oxygenator hinzu, um den schädlichen Kontakt des Blutes mit der Luft zur Arterialisierung zu vermeiden, was die Perfusion beider Organe – des zu untersuchenden und der Lunge – notwendig machte. (52)

Die Zahl der Neuentwicklungen und Verbesserungen seither sind zahlreich. Dem zweifellos stetesten Drang nach Veränderung unterworfen war aber die Form der Oxygenierung, die ultimat in der Schaffung der ersten Dialysatoren gipfeln sollte. In wachsendem Bewusstsein um die Folgen von Hypokapnie, wie sie sich in der vasokonstriktorischen Wirkung reinen Sauerstoffs manifestieren, wurde dem Gas schließlich ein Teil an CO<sub>2</sub> zugesetzt. (53)

Eine Beobachtung die sich aber trotz aller Bemühungen und Verbesserungen durch die Protokolle der frühen mit Vollblut durchgeführten Perfusionen zieht, stellt die **unerklärte Vasokonstriktion** dar, die sich in den beschriebenen niedrigen Flussraten sowie dunkelviolettem venösen Effluat widerspiegelte.<sup>2</sup> Wie Hemmingway zeigen konnte, konnte der konstriktorische Effekt durch Zwischenschalten einer physiologischen Lunge, entkoppelt werden, bei Entnahme des Organs aus dem Perfusionskreislaufs aber ging dieser inhibitorische Effekt mit ihm verloren. (54) Dies legte die Vermutung einer Inaktivierung des vasokonstriktorischen Faktors durch die Lunge, oder eine Ablagerung von Lipoproteinen in der Niere mit resultierender Fettembolie nahe. Eine weitere Möglichkeit der Umgehung dieser Vasokonstriktion bietet die Perfusion mit künstlichen Perfusionslösungen, die im Zuge eines gesteigerten Bedürfnisses an vollkommener Regulationsfähigkeit aller Perfusionsvariablen Einzug gehalten hat. (5) (55)

Besonders hervorgehoben werden soll abschließend noch die Einführung des Modells der **isoliert perfundierten Rattenniere** 1959 durch Ch. Weiss. In seiner Arbeit zur Autoregulation der Niere, schildert der Autor die Durchblutung einer isolierten Rattenniere mit dextranhaltigem zellfreiem Perfusat, wie wir es im Rahmen unserer Versuche auch verwendet haben. Bis dahin wurden lediglich deutlich größere Säugetiere wie Schweine, Kälber, Hunde und Kaninchen verwendet. (56) Erfolgreiche Bemühungen um eine weitere Deskalierung des

---

<sup>2</sup> Eine Ausnahme hierzu sollten die Experimente Jacobjs mit dem modifizierten Hämatisator (1895) darstellen, zu denen allerdings keine Ergebnisse auffindbar waren.

analytischen Handwerkszeugs sollten kommenden Forschergenerationen die Verwendung noch kleinerer Versuchstiere, wie etwa auch der Maus ermöglichen. (5)

Heute beschränkt sich die Anwendung von Perfusionsapparaten längst nicht mehr auf Zwecke der Forschung alleine, sind nicht Herz-Lungen-Maschine, ECMO und Maschinelle Perfusionsvorrichtungen für Organtransplantate gleichermaßen ihrem Wesen nach Perfusionsapparate.

### 3.2. Physiologie des isoliert perfundierten Organs

Die isoliert perfundierte Niere ist ein **Kompromiss** zwischen einer möglichst vollständigen Erhaltung der Organfunktionen und einer Desintegration der Niere, in die ihr gegebenen physiologischen Eigentümlichkeiten. Jede Perfusion führt letztendlich bei entsprechender Perfusionsdauer zum Zelltod. Für diese Kausalität existieren verschiedene Erklärungsansätze, die von einem Verlust der Integrität des Endothels bis über Vasospasmen oder embolische Ereignisse reichen und je nach Aufbau des Perfusionsapparats mehr oder weniger wahrscheinlich wirken. (57) Folkman und Cohen sehen etwa in einer **unzureichenden Sauerstoffversorgung** des Gewebes, die in anaerober Glycolyse und durch das entstehende Energiedefizit im Ausfall der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase resultiert, den Grund für den Zelltod. So kommt es zum Eintritt von Flüssigkeit in die renalen Zellen, was den Austritt lysosomaler Enzyme und dadurch die Entstehung von Ödemen bedingt. (58) Weiterhin führt Ischämie zu einer erhöhten vaskulären Permeabilität, was ebenso **Ödembildung** begünstigt. Aber auch durch unzureichend Kolloidkonzentration oder erhöhten Perfusionsdruck können Ödeme entstehen, die zu einem Verlust der Organfunktionen führen. (59) Als Frühzeichen des bevorstehenden hypoxischen Zelltods kann sich ein Anstieg des Gefäßwiderstands manifestieren, der durch Gefäßokklusion, möglicherweise durch Fettemboli, zustande kommt. (58) Bei flusskonstanter Perfusion führt dies zu einem Anstieg des Perfusionsdruck und daher letztlich wiederum zu Ödembildung. Bei druckkonstanter Perfusion resultiert ein reflektorischer weiterer Rückgang des Perfusatflusses, was einem circulus vitiosus entsprechend weitere Hypoxie begünstigt.

Um einen Vergleich der physiologischen Kapazitäten isoliert perfundierten Niere mit dem Organ in vivo zu ermöglichen, wird in dieser Arbeit Bezug auf das kontinuierlich verwendet und verbesserte Modell der isoliert perfundierten Rattenniere im Rezirkulationsverfahren genommen. Die wesentlichen Prinzipien dieser Apparatur sind - mit wenigen Ausnahmen, die sich aus unterschiedlichen Zusammensetzungen der Perfusatkomposition oder auch der Natur der Rezirkulation ergeben - auch auf unseren Apparat übertragbar.

Die Funktion der **glomerulären Filterbarriere** scheint im Wesentlichen gut erhalten zu sein, wie sich aus einer zwar erhöhten, aber physiologischen Albuminkonzentration des glomerulären Ultrafiltrats zeigt. (60) Dennoch fällt die gemessene **GFR** durchweg niedriger als im Organismus aus und nimmt im Verlauf der Experimente kontinuierlich weiter ab. (4) Im Gegensatz zur glomerulären Filtrationsrate nimmt der Perfusatfluss deutlich höheren Werte als der renale Blutfluss in vivo an, was vermutlich der niedrigen Viskosität des Perfusats im Vergleich zum Vollblut geschuldet ist. Ein Großteil der Autoren beschreiben eine kontinuierliche Steigerung des Flusses im Verlauf der Experimente, wobei eine sichere Beteiligung von Denervation oder eines Mangels an vasokonstriktorisches Faktoren, wie auch Ang II nicht belegt werden kann. (4) Der **hohe Perfusatfluss** ist für die zellfreie Perfusion unabdinglich um eine ausreichende Oxygenierung zu gewährleisten. Eine Reduktion des Flusses also durch Zugabe von Ang II oder anderen Vasokonstriktoren, wie sie von verschiedenen Autoren zur Flussnormalisierung bemüht wurde, führt daher lediglich zur Hypoxie und dadurch zum weiteren Funktionsverlust des Organs. (60)

Der verminderten GFR geschuldet gelangt weniger Natrium in den Primärharn als im unberührten Organ, wodurch lediglich eine verminderte Natriumresorption zu Stande kommen kann. Da der renale Sauerstoffverbrauch wesentlich mit der Resorption von Natrium, als treibender Motor für die Mehrzahl der Resorptions- und Sekretionsprozesse, korreliert, manifestiert sich dieses Defizit in einem **verringerten renalen Sauerstoffverbrauch** im Vergleich zum Zustand in vivo. (4) Wie Berkowitz et al. zeigen konnten kommt es weiterhin im Verlauf des Experiments zu einer steten Steigerung der Reninsekretion, die etwa als Anzeichen eines unzulänglichen Perfusionsdruck mit erniedrigter NaCl-Konzentration an der Macula Densa, oder aber auch schlichtweg als Zeichen des Zelltodes interpretiert werden kann. (61) Mikropunktionsversuche zeigen eine gute Konservierung aller **Transportprozesse**, die im proximalen Tubulus ablaufen, während Prozesse, die zum Teil oder ganz in nachgeschalteten Tubuli ablaufen in ihrer Funktion beeinträchtigt zu sein scheinen. Die eingeschränkte tubuläre Transportfähigkeit spiegelt sich im weitgehend isoosmolaren Urin aufgrund einer mangelnden Feinregulation der Endosmolarität wider. (60) Hinzu kommt die hohe Flussrate der Vasa recta, die den Aufbau eines kortikomedullären Konzentrationsgradienten unterbinden. (4)

Die Methodik scheint auf Zugabe verschiedener **Interventionen** wie das Organ in vivo zu reagieren. Die Eigentümlichkeiten der isolierten Perfusion allerdings machen einen direkten Vergleich mit der Datenlage zum unversehrten Organ schwierig und bedingen einige Abweichungen zur erwarteten Funktionsweise. Während verschiedene Autoren dem isoliert perfundierten Organ etwa ein ähnliches Ansprechen auf Schleifendiuretika wie dem Organ in

vivo attestieren, zeigt eine Gabe von ADH zwar verminderte Ödembildung, ist aber aufgrund der Auswaschung des Konzentrationsgradienten im Mark nicht fähig hypertonen Urin zu produzieren. (4)

Auch unser Apparat verfügt über Limitationen, wie etwa die fragmentäre Natur der verwendeten Resektate, die mit einer möglichen Beschädigung, sowie dem Verlust von (insbesondere juxtamedullären) Tubuli einhergeht. Dadurch sind Studien zur Filtration einschränkt – zumal ohnehin keine getrennte Gewinnung von Urin und venösem Abfluss möglich ist. Diese Eigenheit können wir uns allerdings auch zunutze machen, um Untersuchungen anzustellen, die auf einen Ausschluss des tubulären Apparates beharren, etwa zur isolierten Darstellung des direkt medierten Effekts von Schleifendiuretika auf die Reninsekretion unter Ausschluss des Macula Densa Mechanismus, wie sie im Diskussionsteil weiter ausgeführt wird.

### **3.3. Allgemeiner Aufbau eines Apparats zur isolierten Nierenperfusion**

Im Wesentlichen besteht jeder Apparat zur isolierten Perfusion einer Niere aus einer Pumpe, einem Apparat zur Oxygenierung des Perfusionsmediums, dem Perfusionsmedium, sowie einer Sauerstoffquelle, bei der es sich zumeist um Carbogen handelt. Hinzu kommen temperierbare Gefäße in denen das Perfusat und auch das perfundierte Organ aufbewahrt sind, sowie der venöse Abfluss aufgefangen wird. Die genannten Gerätschaften können sich dabei in Aufbau und Funktion je nach Forschungsfrage erheblich unterscheiden und durch verschiedene zusätzliche Instrumente erweitert werden. Dies umfasst verschiedene Messinstrumente, die etwa eine Bestimmung des Durchflusses, sowie des arteriellen Drucks erlauben, aber auch Modifikationen des gesamten Apparats, um eine kontinuierliche Zirkulation des Perfusats im Sinne einer Rezirkulation zu gewährleisten.

#### **3.3.1. Grundlegende Komposition des Perfusionsmediums**

Wie bereits angesprochen stellt Blut ohne Zweifel das ideale Perfusionsmedium für Organe im Organismus dar. So sind die Blutbestandteile perfekt gegeneinander abgewogen, um den Nährstoffbedarf der Organe zu befriedigen und dabei den idealen onkotischen Druck bei günstiger Viskosität zu gewährleisten. Darüber hinaus sind Erythrozyten künstlichen Sauerstoffträgern in vieler Hinsicht überlegen, wie ich zu einem späteren Zeitpunkt ausführen möchte. Dennoch muss Blut als eigenes, flüssiges Organ betrachtet werden. (62) Eine Perfusion mit Vollblut als Medium kann daher aufgrund unvorhersehbarer Variablen wohl kaum als isolierte Perfusion bezeichnet werden. Heute werden in den allermeisten Versuchen synthetische Perfusionsmedien verwendet, unter denen man zwischen zellfreien und

semisynthetischen Varianten mit zugegebenen Blutbestandteilen unterscheidet. Solche Perfusionsmedien basieren grundsätzlich auf einer isotonischen Ringerlösung mit Kochsalz, Kaliumchlorid und Calciumchlorid, sowie Bikarbonat als Puffer. Dieser Komposition werden meistens noch verschiedene Additiva, sowie Kolloide und oftmals Sauerstoffträger zugegeben. (59) Unter den bekanntesten Lösungen vom Typ Tyrode, Krebs-Ringer und Krebs-Henseleit, ist heute nur letztere in Form eines **Krebs-Henseleit-Bicarbonatpuffers** relevant. Dieser setzt sich aus Natriumchlorid, Kaliumchlorid, Magnesiumsulfat, Calciumchlorid, Kaliumdihydrogenphosphat, Glucose und Bicarbonat, in Konzentrationen, die denen des Blutplasmas entsprechen zusammen. (5) Dennoch hätte eine Verwendung dieser Lösung ohne Zugabe von Kolloiden und weiteren Additiva aufgrund des mangelnden onkotischen Drucks, mit drohender Ödembildung, fatale Konsequenzen für die Stabilität der Perfusion. (63)

### 3.3.2. Additiva

Die Beobachtung einer funktionellen Stabilisierung der isolierten Organperfusion durch Zugabe verschiedener Stoffwechselmetaboliten, etwa der Glycolyse oder des Zitratzyklus hat zur Verbesserung dieses recht simplen Puffers im Sinne einer möglichst effizienten Imitation der komplexen Struktur des Blutes durch Zugabe verschiedener Blutbestandteile geführt. (5) So konnten verschiedene Studien eine Verbesserung der tubulären Natriumresorption mit Steigerung des Sauerstoffverbrauchs bei Zugabe von Butyrat, oder langkettigen Fettsäuren zeigen. (5)

Die essentiellste Addition aber stellt sicher **Glucose**, als Hauptenergiequelle des perfundierten Gewebes dar, die ihrer Bedeutungsschwere nach bereits im unmodifizierten Krebs-Henseleit-Puffer enthalten ist. Neben der Funktion als Energielieferant trägt der Metabolit weiterhin zur Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Drucks bei. (59)

Die Zugabe von **Aminosäuren** führt zu einer signifikant verbesserten Erhaltung der Perfusion, insbesondere im Bezug auf tubuläre (Natrium-)Resorption. (60) Besonders hervorzuheben ist unter den Aminosäuren Arginin, welches in seiner Funktion als NO-Vorläufer zu einer verbesserten Langzeitstabilität der Perfusions beiträgt. (5) Ebenso bedeutungsvoll erscheint die Inklusion von Glutamat, Cystein und Glycin als Edukte der Glutathionsynthese, welche zu einer vermehrten Bildung des zellprotektiven Radikalfängers beiträgt. Wie Epstein et al. zeigen konnten manifestiert sich dieser protektive Effekt besonders im Ausbleiben der normalerweise im äußeren Mark eintretenden hypoxischen Schäden der Henle-Schleife, was zu einer deutlichen Verbesserung der Natriumresorption und als Folge des tubuloglomerulären

Feedbacks schließlich auch der GFR führt. Weiterhin konnten die Autoren eine verbesserte Regulation der Urinosmolarität verzeichnen. Interessanterweise konnte die GFR und tubuläre Natriumresorption durch Zugabe aller 20 kanonischen Aminosäuren weiter gegenüber der reinen Zugabe der Glurathionvorläufer verbessert werden. Diese Beobachtung ist vorm Hintergrund des breiten Spektrums an physiologischen Funktionen der Aminosäuren, wie etwa in Form von Asparat und Glutamat für den Malat-Zyklus, sowie für Regenerations- und Erneuerungsprozesse wenig verwunderlich. (64)

Die Unfähigkeit der Urinkonzentrierung durch die isoliert perfundierte Niere, macht die Zugabe eines schlecht resorbierbaren Substrats, wie etwa **Kreatinin**, notwendig, das die intratubuläre Osmolarität im Sammelrohr erhöhen soll, um Natriumrückresorption, welche für die Aufrechterhaltung des Natriumgradienten trotz Wassernachzug (aufgrund des ausgeprägt hypoosmolaren Primärharns) notwendig ist, zu ermöglichen. (60)

Da die große Mehrheit der Perfusionsexperimente in unsterilem Umfeld ablaufen, werden dem Perfusionsmedium häufig **Antibiotika**, besonders vom betalaktam- und aminoglycosidtyp zugegeben, um einer bakteriellen Kontamination des Perfusionsmediums vorzubeugen. (59)

Spricht man von semisynthetischen Perfusaten, so sind meistens künstliche Perfusionsmedien mit Zugabe von Erythrozyten als **Blutzellen** gemeint. Im Labor Folkmans konnten in den späten 1960er Jahren allerdings interessante Ergebnisse durch Zugabe von weiteren Blutzellen gewonnen werden. Konträr den Erwartungen zeitgenössischer Autoren konnte die physiologische Erhaltung des Endothels durch Zugabe von Thrombozyten zum Perfusionsmedium gesteigert werden und so die Gefäßintegrität für bis zu 24 Stunden erhalten werden, während sich in der Vergleichsgruppe bereits nach wenigen Stunden Einblutungen und deutliche endotheliale Schäden abzeichneten. (65)

### 3.3.3. Kolloide

Wie bereits angesprochen führt die Perfusion mit modifizierter Krebs-Henseleit-Lösung ohne Zugabe von Kolloiden zu Ödembildung und damit einhergehend zu rapidem Verlust der physiologischen Organfunktionen, die sich im Rückgang der tubulären Resorptionsvorgänge abzeichnet. (63) Der Großteil der verfassten Arbeiten verwendet zu diesem Zweck **bovines Serumalbumin (BSA)**, das sich durch nahezu physiologische Flüssigkeits- und Elektrolytresorption bei bestmöglicher Viskosität und GFR aller häufig verwendeten Kolloide auszeichnet. (60)(5) Aus Kostengründen aber bleibt die Verwendung von BSA Rezirkulationsversuchen oder Single-Pass-Perfusionen mit niedrigem Flussaufkommen, wie

etwa der isoliert perfundierten Mäuseniere vorbehalten. (7) Weitere Limitationen ergeben sich aus dem natürlichen Ursprung des Kolloids, der im Gegensatz zu synthetischen Ersatzstoffen eine aufwertige Aufbereitung durch Dialyse- und Filterschritte erfordert, um etwaige Kontaminationen durch Vasokonstriktoren, gebundene Lipide oder Schadstoffe zu entfernen und so die Replizierbarkeit der Experimente zu gewährleisten. (5) Aus diesen Gründen wurden zunehmend günstigere klinisch verwendete **Volumenersatzstoffe** in den Kanon der Kolloide aufgenommen. Dazu gehören etwa Hydroxyethylstärke (HES), Gelatinverbindungen wie Haemaccel, hochmolekulares Dextran (70 kDa) oder Mannitol, deren Molekulargewicht im Vergleich zu BSA allerdings deutlichen Schwankungen unterlegen kann. (5) Wie bereits angesprochen wurde **Dextran** bereits bei der ersten Beschreibung der isoliert perfundierten Rattenniere durch Weiss et al. zum Nachweis der erythrozytenunabhängigen renalen Autoregulation verwendet. (56) Neben ihrer Funktion als Plasmaexpander verfügen Dextranlösungen über antithrombotische Eigenschaften, was sie insgesamt zu beliebten Ersatzkolloiden, besonders für Perfusionen mit Vollblut, macht. (59) Im Vergleich mit Albuminlösungen wird allerdings eine wesentlich höhere Viskosität benötigt, um vergleichbaren onkotischen Druck auszuüben, was den Perfusatfluss und dadurch letztendlich den effektiven Sauerstoffaustausch im Gewebe behindert. Außerdem verfälscht Dextran das Ergebnis der gebräuchlichen Anthron-basierten Inulinbestimmung, weswegen zur Bestimmung der Inulin-Clearance auf alternative Verfahren zurückgegriffen werden muss.

#### 3.3.4. Oxygenierung

Allen aeroben Lebensformen ist die Notwendigkeit von Sauerstoff zur oxidativen Energiegewinnung gemein. Selbstredend ist eine Versorgung des perfundierten Gewebes mit Sauerstoff daher unabdingbar, um eine möglichst lange aufrechterhaltung lebensnotwendiger chemischer Prozesse zu gewährleisten. Unter den heute gebräuchlichen Perfusionsmedien muss dabei zwischen **zellfreien** und **semisynthetischen Perfusionsmedien** mit zugegebenen Erythrozyten unterschieden werden, während die Verwendung von Vollblut nur in Ausnahmefällen Anwendung findet. Ein Vorteil zellfreier Perfusionsmedien ergibt sich aus ihrer unkomplizierten und kostengünstigen Zubereitung, die auch in großen Mengen, wie sie für Single-Pass Experimente benötigt werden, ohne weiteres möglich ist. Außerdem ist eine freie Variation der genauen Zusammensetzung der Lösung möglich ohne Rücksicht auf die Erhaltung von Blutzellen nehmen zu müssen. Die bestmögliche Replizierbarkeit und absolut isolierte Betrachtung des Organs ist nur durch vollsynthetische Perfusionsmedien gewährleistet. Nachteile wiederum ergeben sich aus dem verminderten onkotischen Druck,

der ein Risiko für Ödembildung darstellt und daher die Zugabe von Kolloiden notwendig macht. Die so gestiegene Viskosität reduziert den Perfusatfluss und vermindert dadurch die - gerade bei Perfusion ohne Sauerstoffträger notwendige - hohe Flussrate. (59)

Um eine möglichst effiziente Versorgung dieses Gewebes mit Sauerstoff zu gewährleisten ist daher die Addition von **Sauerstoffträger**, wie Erythrozyten, notwendig. Um die optimalen Eigenschaften von verdünntem Vollblut ohne vasokonstriktorische Störfaktoren nutzen zu können, werden dem synthetischen Perfusionsmedium **gewaschene Erythrozyten** zugegeben. (59) Die Quelle der Erythrozyten spielt dabei keine vordergründige Rolle, weshalb aus Stabilitätsgründen häufig bovine Erythrozyten verwendet wurden, sich heute aber auch menschliche, aufgrund der einfachen Gewinnung in Form abgelaufener Blutkonserven, großer Beliebtheit erfreuen. (5) Die Inklusion von Erythrozyten bringt aber auch Nachteile mit sich, wie etwa das Risiko der mechanischen Hämolyse mit folgender Vasokonstriktion. Außerdem handelt es sich bei Erythrozyten, wie auch bei Albumin um Substanz natürlichen Ursprungs, deren absolute Reinheit auch trotz sorgfältiger Aufbereitung nicht immer gewährleistet werden kann. Neben etwaigen Störfaktoren durch potentielle Kontamination, sollte auch immer das Risiko von Inkompatibilitätsreaktionen bei Verwendungen homologer Blutzellen berücksichtigt werden. (59)

Zur Eliminierung derartiger Störvariablen, ohne auf den verbesserten Gasaustausch durch Sauerstoffträger zu verzichten, wurden vielmals Versuche mit verschiedenen **synthetischen Sauerstoffträgern** realisiert, die jedoch allesamt bisher keinen Einzug in den Methodenkanon finden konnten. (5, 59, 66, 67, 68)

Grundsätzlich erfordert die Verwendung eines Bicarbonatpuffers die Begasung mittels Carbogen, also einem O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> Gemisch, zur Regeneration der Pufferkapazitäten. (59) Die einfachste Form der Begasung stellt sicherlich die **direkte Begasung** des Perfusats dar. Als Weiterentwicklung kann die Oxygenierung des Perfusats über eine Glasfritte betrachtet werden, die die Vorbefeuchtung des Gasgemischs zur Vermeidung von Evaporationsverlusten erlaubt. Bei diesen Methoden können allerdings weder Erythrozyten noch BSA verwendet werden, da die Addition zu massiver Schaumbildung und damit einhergehendem Risiko einer Luftembolie, sowie der Denaturierung des BSA, der Hämolyse der Erythrozyten respektive, führt. (5) Erst die Entwicklung der **Membran-, sowie Kapillaroxygenatoren** ermöglichte die suffiziente Oxygenierung von albumin- oder erythrozytenhaltigen Perfusionsmedien bei größeren Tieren. Wie der Name bereits impliziert, wird bei ersteren das Perfusat in dünnen Schichten zwischen

große Membranen geleitet, die von einer Gasatmosphäre umgeben sind, während sich Kapillarioxygenatoren Kunststoffkapillaren für dieses Prinzip der Oberflächenvergrößerung zunutze machen und der Aufbau daher wesentlich kompakter gestalten werden kann. (5)

Die modernste Form der Oxygenierung stellt die **kontinuierliche Dialyse** eines zellfreien, carbogenbegasteten Bicarbonatpuffers gegen das BSA und rote Blutkörperchen enthaltende Perfusionsmedium dar. Neben einer schonenden, aber effektiven Oxygenierung zeichnet sich dieser Aufbau durch die Vorteile einer integrierten Dialyse aus: Durch die Einsparung an Erythrozyten und Albumin im Dialysat, kann ein beliebig Großes Volumen gewählt werden, das durch Erneuerung der verbrauchten metabolischen Substanzen, wie etwa Arginin oder Glucose, sowie Filtration sich akkumulierender Stoffwechsendprodukte zur kontinuierlichen Regeneration des Perfusats und somit der Aufrechterhaltung konstanter Versuchsparameter beiträgt. Die Implementation eines Dialysators zur Oxygenierung führt somit im Vergleich zum Membranoxygenator zu einer deutlichen Steigerung der GFR, mit stabiler Aufrechterhaltung der tubulären Natriumresorption und damit auch des Sauerstoffverbrauchs. (69)

### 3.3.5. Externe Variablen

Grundsätzlich muss je nach Fragestellung zwischen einer druckkonstanten oder flusskonstanten Perfusion unterschieden werden, bei der entweder der Fluss variiert wird um einen bestimmten Druck aufrecht zu erhalten, oder der Fluss konstant gehalten wird um eine physiologische Regulation des Gefäßdrucks zu erlauben. Aus historischem Kontext wurden flusskonstante Perfusionen aufgrund des einfach Versuchsaufbau bevorzugt verwendet, da keine manuelle Änderung der Pumpförderleistung notwendig ist. Es ist allerdings naheliegend, dass sich Vorteile für den Erhalt der Perfusion aus druckkonstanter Perfusion ergeben. So bleibt dem Organ die autoregulatorische Selbstbestimmung einer an die physiologische Situation angepassten Flussrate erhalten, wobei ein Rückgang des Perfusatflusses als Zunahme des vaskulären Widerstands und vice versa gedeutet werden kann, während Vasokonstriktion unter flusskonstanten Bedingungen zelluläre Schäden verursachen kann, aber das Flussaufkommen nicht zu reduzieren vermag. (59)

Daher findet die **flusskonstante Perfusionstechnik** bevorzugt bei Untersuchungen zur Vasoreaktion, oder aber auch biochemischen und pharmakologischen Studien Anwendung, bei denen der einfachen Umsetzbarkeit höhere Bedeutungsschwere als der bestmöglichen Organkonservierung zugemessen wird. (5)

Die **druckkonstante Perfusion** erfordert eine technisch aufwendige kontinuierliche Anpassung der Pumpförderleistung an den gemessenen Gefäßdruck, die in Form einer fortwährenden Manipulation an der Pumpe, oder eines elektrischen Regelapparats erfolgen kann. Wichtig dabei ist die Messung des arteriellen Drucks möglichst nahe am Gefäß, um systemischen Widerstand zu negieren, so wie die Verwendung eines Windkessels, um pulsatile Spontanoszillationen der Pumpleistung zu verhindern. (5)

Eine weitere Unterscheidung von Perfusions-Modi erlaubt die Unterteilung in **Single-Pass und Rezirkulation**. Wie der Name bereits impliziert handelt es sich bei Perfusionen vom **Single-Pass** Typen, um Versuchsaufbauten bei denen das Perfusionsmedium das Organ nur einmal durchwandert, um im Anschluss für Messungen aufgefangen oder verworfen zu werden. Dieser offene Versuchsaufbau bringt die Möglichkeit der einfachen Zugabe und Wegnahme von Reagenzien oder Medikamenten mit sich und verhindert die Akkumulation von metabolischen Substanzen. Da sich also die Komposition des Perfusats im Verlauf des Experimentes nicht wesentlich ändert eignen sich Single-Pass Perfusionen besonders für metabolische Studien, sowie Untersuchungen der endokrinen Funktion, wie etwa der Reninsekretion. Single-Pass Versuche ermöglichen die sukzessive Gabe verschiedener Interventionen, solange ein Recovery-Intervall zur Regeneration des physiologischen Zustandes eingehalten wird, während Rezirkulationsversuche einen kontinuierlichen Verbrauch von Edukten, sowie eine Anhäufung von metabolischen Produkten oder Botenstoffen erlauben. (70) Allerdings erschweren Single-Pass Versuche die wirtschaftliche Verwendung von BSA oder anderer teurer Additiva, da größere Perfusatsmengen benötigt werden, um ein Verwerfen nach einmaligem Durchfluss zu ermöglichen. Single-Pass Versuche beschränken sich daher häufig auf Fragestellungen die eine explizite Absenz von Kolloid erfordern, oder wie die isoliert perfundierte Mäuseniere mit geringen Perfusatsvolumina auskommen.

Die eben genannten Kritikpunkte des geschlossenen **Rezirkulationssystems** kann man sich in Form von Untersuchungen zu biochemischen und pharmakologischen Effekten zunutze machen, die sich durch eine Kumulation von Stoffwechselmetaboliten und den damit einhergehenden additiven Effekten eindeutiger Ergebnisse versprechen. Durch die Einsparung an Perfusat ist auch eine Perfusion von Organen größerer Tiere, sowie aufwendige Versuchsdurchführungen mit Albuminzugabe möglich. Grundsätzlich gilt aber dennoch: je kleiner das rezirkulierte Volumen, umso instabiler wird die Perfusion aufgrund des schnellen Verbrauchs eines geringen Vorrats an metabolischen Substanzen, wie etwa Glucose und Arginin, sowie der verringerten Pufferfähigkeit für die Akkumulation von

Stoffwechselendprodukte. Durch Rückführung des produzierten Urins kann eine verlängerte Kontinuität des Perfusats erwirkt werden, wobei dies mit dem Risiko der Okklusion renaler Kapillaren, etwa durch Epithelabschilferungen, einhergeht. Als Verbesserung des Rezirkulationsverfahren kann daher die Implementation eines Dialysators zur Oxygenierung und Regenerierung des Perfusats betrachtet werden. Diese technisch anspruchsvolle Weiterentwicklung ermöglicht eine kosteneffiziente Verwendung des Perfusionsmediums ohne dabei durch kumulative Veränderungen der Perfusatzkomposition an Replizierbarkeit einzubüßen und ermöglicht somit eine breite Anwendung von Rezirkulationsversuchen. (62)

Schließlich existieren auch zwei grundverschiedene Ansätze der Temperaturregulation des perfundierten Organs: Zum einen die **normotherme**, also physiologische, Temperaturerhaltung, zum anderen die **hypotherme** Perfusion, durch die der zelluläre Metabolismus, sowie der zugrundeliegende Sauerstoffverbrauch verlangsamt werden soll, um eine möglichst lange Organkonservierung zu gewährleisten. Dies ermöglicht zum einen die suffiziente Oxygenierung bei Perfusion mit niedrigem Perfusatfluss ohne Sauerstoffträger und dadurch eine bessere Erhaltung der Mikrozirkulation, zum anderen spezifische Fragestellungen, wie etwa eine Überbrückung der tubulären Resorptionsvorgänge. Andererseits besteht das Risiko der gesteigerten Produktion freier Radikale, durch verminderte Glutathionproduktion und die Reduktion des renalen Metabolismus, sowie einer eingeschränkten Entzündungsantwort, welche die Translatierbarkeit der Ergebnisse erschweren können. Der Großteil experimenteller Fragestellungen verlangt daher nach normothermer Perfusion. (59)

### 3.4. Übersicht verschiedener Tiermodelle

#### 3.4.1 isoliert perfundierte Rattenniere

Die Popularität der isoliert perfundierten Rattenniere (Isolated perfused rat kidney, IPRK) kann neben einer breiten Datenlage, auch in der geeigneten Größe der Tiere, sowie der daraus resultierenden niedrigen Anschaffungs- und Unterhaltskosten und einer für physiologische Fragestellungen vorteilhaft aufgeprägten genetischen Uniformität gesucht werden. (71)(63) Bereits früh erfolgte die Eruierung verschiedenster physiologischer Parameter und Normwerte der isoliert perfundierten Rattenniere, die Untersuchern eine bessere Übertragbarkeit, sowie Interpretation ihrer Ergebnisse ermöglichen sollte. (60) Heute stellt die IPRK die **gebräuchlichste Spezies** unter den Modellen der isolierten Nierenperfusion dar und kommt aufgrund der vergleichbar einfach umsetzbaren Technik neben physiologischen und

biochemischen Fragestellungen auch zur Studie pharmakologischer Fragestellungen zum Einsatz. (72)

Die häufigste operative Präparation der Niere stellt die **Bowman-Modifikation der Nishiitsutsuji-Uwo Prozedur** dar, die eine Perfusion ohne vorherige Unterbrechung des renalen Blutflusses ermöglicht. Dabei wird die A. renalis über einen Zugang zur Aorta durch die A. mesenterica superior retrograde kanüliert. Dieser Eingriff ist vom geübten Operateur innerhalb von weniger als 10 Minuten durchführbar, beschränkt sich allerdings den anatomischen Gegebenheiten gemäß in seiner Anwendung auf die rechte Niere und unterbindet somit die Möglichkeit der Verwendung der kontralateralen Niere als Kontrollorgan. (63)(72)

Das Organ wird im Anschluss mit synthetischem Plasma oder Blutersatzmedium perfundiert und Urin über den kanülierten Ureter abgeführt. Aufgrund unphysiologisch hoher Flussraten der isoliert perfundierten Niere kann ein Perfusataufkommen von bis zu  $10 \frac{mg/min}{g}$  Gewebe notwendig werden, was eine Perfusion im Single-Pass Modus in vielen Fällen unwirtschaftlich gestaltet. (63) Die meisten Versuche werden daher entweder mit zellfreiem Perfusat ohne kostspielige Kolloide, oder bei Verwendung von BSA und Erythrozyten im **Rezirkulationsverfahren** durchgeführt. (71) Darüberhinaus limitiert die hohe Flussrate unabhängig vom Perfusionsmodus den Untersucher in seiner Methode der Oxygenierung. Nur durch Parallelschaltung mehrerer Membranoxygenatoren etwa kann eine ausreichende Oxygenierung ohne Entstehung eines signifikanten Druckgradienten erreicht werden. (73)

Gewissermaßen stellt die isoliert perfundierte Rattenniere insofern einen **Mittelweg** aus technischer Umsetzbarkeit und breitem Anwendungsgebiet dar, der aber je nach Fragestellung mehr und mehr von spezifischeren Modellen, wie etwa der isoliert perfundierten Mäuse- oder Schweineniere abgelöst werden kann.

#### 3.4.2. isoliert perfundierte Mäuseniere

Mit dem rapiden Fortschritt der Gentechnik und damit einhergehenden genmodulierten Modellorganismen, wie etwa der Knockout-Maus, wurden zusehends Bemühungen angestellt die bisher verwendeten Techniken auf ein Mausmodell zu übertragen. (5) Im Sinne einer funktionsfähigen **isoliert perfundierten Mäuseniere** (isolated perfused mouse kidney, IPMK) gelang dies erstmals 2003 einer Arbeitsgruppe um Schweda. (7) Die Technik konnte nach einigen Verbesserungen so weit etabliert werden, dass mittlerweile neben grundlagenwissenschaftlichen Fragestellungen, komplexe multimodale Sachzusammenhänge,

wie etwa der Einfluss des Alters auf die Nierenfunktion modellarisch erfasst werden können. (74)(75)

Neben dem **breiten Spektrum genetisch veränderter Versuchstiere** bietet die isoliert perfundierte Mäuseniere aufgrund der eingeschränkten morphologischen Dimensionen und damit einhergehendem geringen renalen Blutfluss, die Möglichkeit der Perfusion im **Single-Pass-Modus** mit vollwertiger Perfusatzkomposition. Einerseits ermöglicht dies einen unkomplizierten, wie auch variablen Aufbau des Perfusionsapparats, der somit perfekt auf spezifische Fragestellungen adaptiert werden kann. Andererseits ergibt sich aus der Durchführbarkeit von Perfusionen im Single-Pass-Modus mit komplexer Perfusatzusammensetzung und zusätzlicher Oxygenierung durch Dialyse in Form einer Kidney-Lung (s.o.) eine bisher **ungekannte Replizierbarkeit**, die besonders metabolischen und endokrinologischen Studien, welche bislang zumeist in Form einer zellfreien Perfusion zur Vermeidung der Akkumulation von Metaboliten im Perfusat durchgeführt wurden, zugutekommt.

Beim hierzu notwendigen Eingriff wird die Aorta abdominalis auf Höhe der rechten A. renalis des Tiers kanüliert und sowohl proximal als auch distal des Abgangs des ebengenannten Gefäßes ligiert. Im Anschluss wird die Vena Cava superior kanüliert, um eine Bestimmung des Perfusatflusses unter Ausschluss von Leakage zu bestimmen. (5)

Um die ungestörte Funktion des Organs zu gewährleisten sollte die Operation, welche die Applikation von 6 Ligaturen um benachbarte Gefäße erfordert, innerhalb von weniger als 30 Minuten durchgeführt werden und ein mittlerer Arterieller Druck von weniger als 60 mmHg zu keinem Zeitpunkt unterschritten werden. (7) Unschwer erkennbar stellt ein derartiger Eingriff auch aufgrund der schieren Größenverhältnisse also einen nicht unerheblichen Anspruch selbst an erfahrene Untersucher dar.

Die Inklusion allogener Blutbestandteile im Perfusionsmedium ist, sowohl ethisch, als auch wirtschaftlich nicht umsetzbar, weswegen auf **xenogene Quellen**, etwa menschlicher Erythrozyten, ausgewichen werden muss. Zwar konnte bislang kein Einfluss der Erythrozytengröße (Maus: 5,6 µm; Mensch: 7,5 µM) auf die endotheliale Integrität, wie auch den vaskulären Widerstand festgestellt werden, dennoch sollten xenogene Perfusatbestandteile immer als mögliche nicht kontrollierbare Fehlerquelle betrachtet werden. (76) Darüber hinaus ergeben sich auch für den Untersucher durch die Verwendung menschlicher Blutprodukte

Risiken, wie etwa Infektionen, die bei anderen Perfusionsmodellen nicht zwangsläufig gegeben sind. (7)

Insgesamt handelt es sich bei der isoliert perfundierte Mäuseniere also um eine **technisch hoch anspruchsvolle, aber vielseitige Methodik**, die sowohl genetische Modifikationen zulässt, als auch im Single-Pass und Rezirkulationsmodus möglich ist.

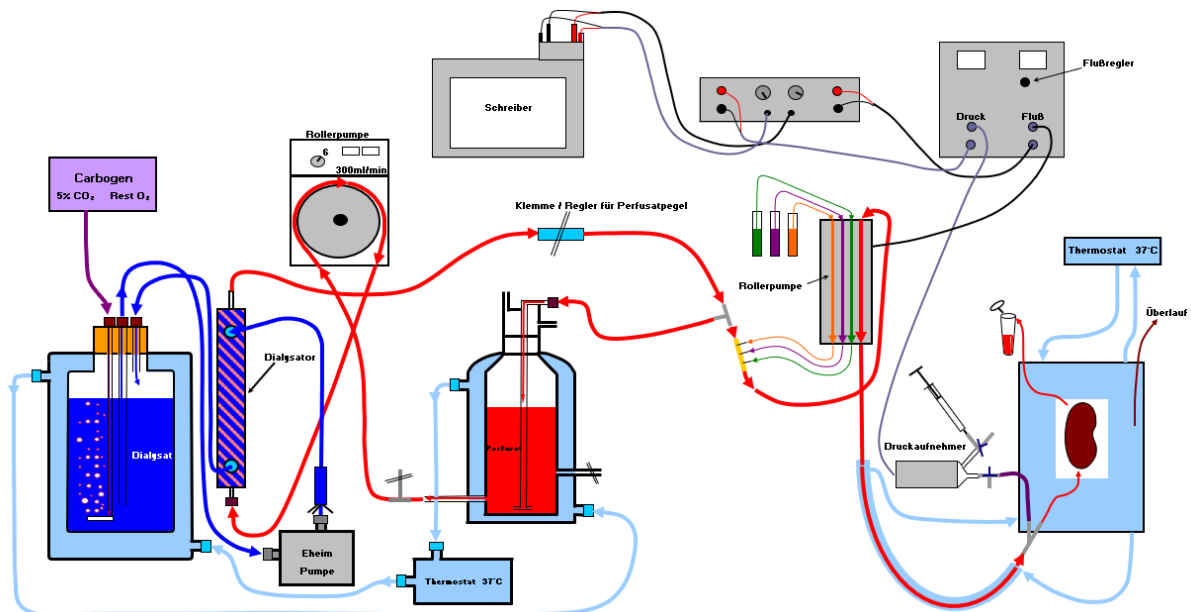


Abbildung 7 Aufbau eines Apparats zur isolierten Perfusion von Mäusenieren der AG Schweda [Bild: Robert Götz]

### 3.4.3. isoliert perfundierte Schweineniere

Wie vorig bereits extensiv ausgearbeitet stellt die isoliert perfundierte Schweineniere das Modell der Wahl für **translationale Fragestellungen** dar und nimmt eine Schlüsselrolle in urologischen, wie auch nephrologischen Studien ein. (77–79)

Neben den offensichtlichen Vorteilen, die sich für derartige Fragestellungen aufgrund der approximativ menschlichen Größe, wie auch Morphologie und Physiologie ergeben, zeichnen sich weitere Vorzüge in der einfachen Handhabung der Organe ab, die die Verwendung humanmedizinischer Medizinprodukte und -Gerätschaften ohne damit einhergehendem Verlust diagnostischer Sensitivität oder therapeutischen Outcomes erlaubt. (80)

Es besteht keine Notwendigkeit eines komplexen Eingriffs, was die Technik auch **unerfahrenen Operateuren** zugänglich macht. Der Verzicht auf eine spezifische Operationstechnik ermöglicht zudem bei gegebenen apparativen Voraussetzungen eine Simultanperfusion der kontralateralen Niere, als Kontrollgruppe. Somit sind histopathologische

Analysen, wie auch Identifikation und Exklusion perfusionsbedingter Artefakte und unvorhergesehener Effekte möglich. (81)

Weiterhin ermöglicht die direkte Kanülierung der Leitungsbahnen des Organs die **Verwendung von Schlachtorganen**, die mittlerweile aufgrund einer suffizienten Datenlage eine valide Alternative zu den klassischen Tierversuchen der isoliert perfundierten Niere darstellen. (82) Da die Nieren zumeist Nebenprodukte des Schlachtprozesses darstellen, stehen sie hierfür in nahezu unbegrenzter Menge kostengünstig zur Verfügung, wodurch - in Kombination mit der geringen Präparationsdauer der Perfusion - ein hoher Durchsatz an Versuchen, wie auch ethische und wirtschaftliche Vorteile ableitbar sind. So ist etwa kein Unterhalt der Tiere in laboreigenen Stallungen notwendig. Zudem sind die Zucht- und Haltungsbedingungen von Schlachttieren mittlerweile derart standardisiert, dass die Tiere nicht unähnlich Labortieren eine vergleichbare Grundgesamtheit bilden. (80) Im Gegensatz zu Nagetieren ist die Verwendung **autologer Blutbestandteile**, wie sie für einige pharmakologische und toxikologische Studien, sowie immunologische Aspekte sinnvoll erscheint, ethisch vertretbar und wirtschaftlich umsetzbar. (82)

Freilich ergeben sich aus der vorliegenden Größenmorphologie auch Nachteile, wie etwa der **hohe Perfusatfluss** von etwa  $50-100 \frac{ml}{min}$ , der quasi zur Durchführung der Perfusion im Rezirkulationsmodus obligiert. Selbst im Rezirkulationsmodus muss mit einer Menge von über 10 Liter Dialysat zur kontinuierlichen Dialyse von 600 ml Perfusat gerechnet werden, was einerseits in einer hohen Pumpleistung mit gesteigerter Hämolyse und andererseits in einer rapiden Abnutzung des Perfusions- und Dialysesystems resultieren kann. (82) Weiterhin sind Schweine deutlich teurer und aufwändiger im Unterhalt, falls die Verwendung von Labortieren unumgänglich ist, was die Menge der durchgeführten Experimente massiv limitiert. Die Verwendung von Schlachtorganen hingegen kann je nach Schlachtvorgang mit unbestimmter Warmischämiezeit einhergehen, sowie keine sterilen Bedingungen gewährleisten.

Abschließend muss also geurteilt werden, dass es sich bei der isoliert perfundierten Schweineniere bisher in weiten Teilen um ein Modell spezifischer Forschungsfragen handelt, das besonders durch die einfache Präparation, sowie die Möglichkeit der Verwendung von Schlachtorganen sich in Zukunft einer breiteren Etablierung zugänglich machen kann.

## II. Material und Methoden

### 1. kontrollierte Perfusion von Nierensegmenten

#### 1.1. Perfusionsapparat

Der Aufbau des Apparates entspricht in seinen Grundzügen einem Single-Pass-Perfusionssystem. Dies begründet sich darin, dass der Single-Pass-Modus für endokrinologische Fragestellungen, wie die von uns untersuchte Reninsekretion, die überlegenen Variante darstellt.

##### 1.1.1. Grundlegender Aufbau

Der Perfusionsapparat setzt sich zusammen aus einer elektrisch ansteuerbaren Peristaltikpumpe, sowie dem zugehörigen Steuersystem und Druckaufnehmer, doppelwandigen Behältnissen für die Temperierung, sowie Oxygenierung des Perfusionsmediums, wie auch die temperierte Perfusion des eigentlichen Organsegments. Weiterhin notwendig sind ein Sammelreservoir für das Perfusat nach Organpassage mit der Möglichkeit der Entnahme von Proben über zwischengeschaltete Dreiwegehähne, sowie ein in den Perfusatkreislauf geschalteter Port zur direkten Injektion von Reagenzien und Windkessel, die darüber hinaus als Blasenfallen dienen.

Das Perfusionsmedium wird kontinuierlich im **Perfusatgefäß** (Abb. 8, (2)) mit **Carbogen** (Abb. 8, (1)) begast und durch die **Rollerpumpe** (Abb. 8, (3)) gefördert. Nach Passage eines ersten **Windkessels** (Abb. 8, (11)), der vornehmlich dem Zweck des Blasenfangs dient, sowie der Pumpe durchläuft das Perfusat eine **beheizte Wendel** (Abb. 8, (4)), um Temperaturverlust während der Passage auszugleichen. Im Anschluss durchfließt das Medium einen direkt ineinander übergelenden Komplex aus Windkessel (Abb. 8, (11)), **Druckaufnehmer** (Abb. 8, (8)) und **Injection-Port** (Abb. 8, (12)) zur Applikation von Reagenzien ((Abb. 8, (13)) auf Höhe des nachgeschalteten Organs, um einer Verfälschung der intravasalen Druckmessung durch hydrostatische Druckdifferenzen vorzubeugen. Im **Perfusionsbehältnis** (Abb. 8, (5)) gelangt das Perfusat schließlich über eine intraarteriell gelegene Polyethylen-Kanüle in das perfundierte Gewebestück. Von dort wird sowohl das venöse Effluat, wie auch jeglicher Leckfluss aus angeschnittenen Gefäßverzweigungen über einen Trichter aufgefangen und durch dieselbe Pumpe in den **Perfusatauffang** (Abb. 8, (7)) zurückgefördert. Die Entnahme von Proben wird durch vor der Pumpe platzierte Dreiwegehähne (Abb. 8, (6)) ermöglicht. Die **Steuereinheit** der Pumpe (Abb. 8, (9)) kommuniziert direkt mit dem **digitalen Interface** (Abb.

8, (10)) um eine Auswertung der Fluss/Druck-Raten, sowie Berechnungen zum systemischen und Gefäßwiderstand zu ermöglichen.

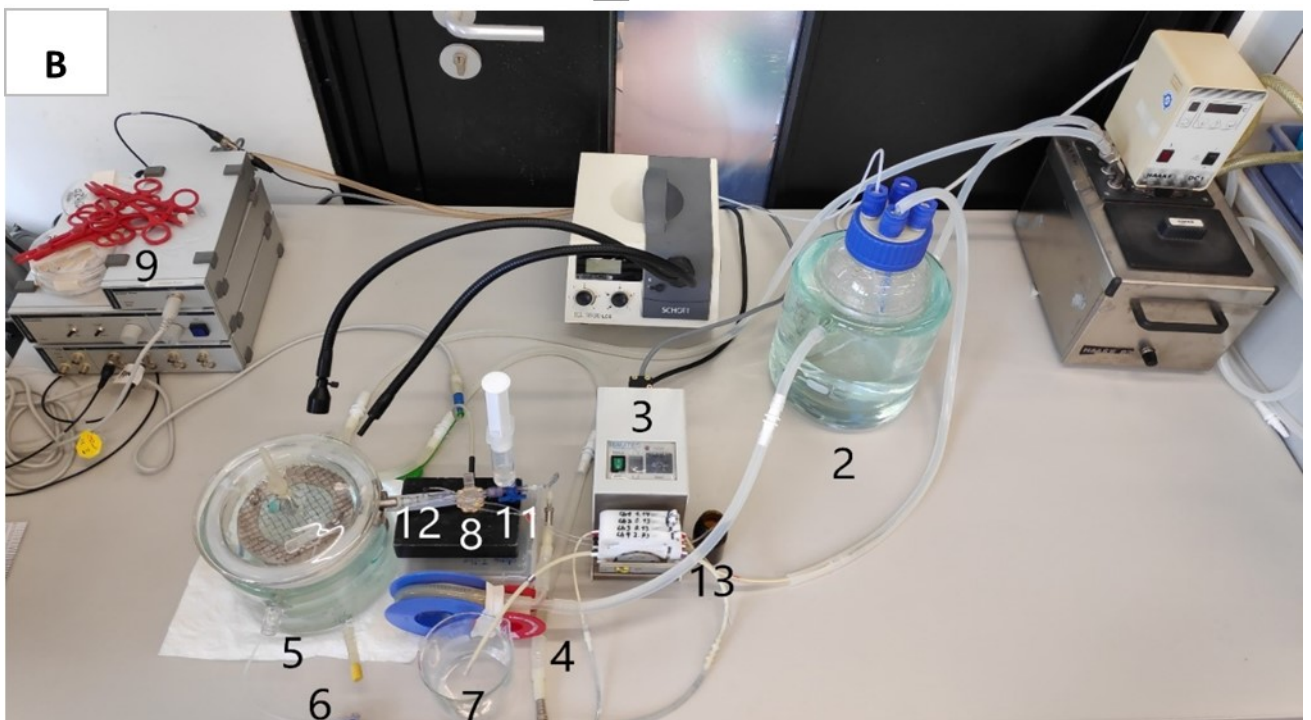
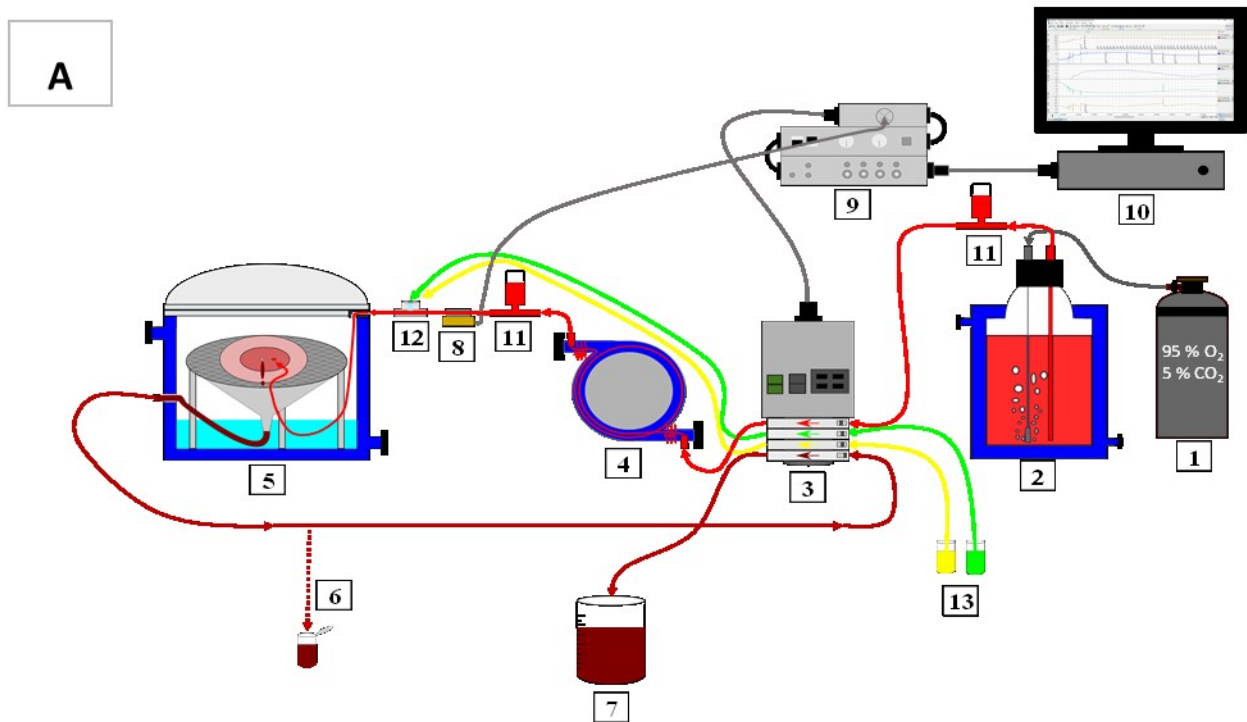


Abbildung 8 A: Schematische Übersicht des Apparats zur Perfusion von Nierensegmenten. Hellrot: oxygeniertes Perfusat; Dunkelrot: Venöses Effluat, sowie Primärharn; Dunkelblau: Temperiertes Wasser; Gelb und Grün: Verabreichte Substanzen. B: Apparat zur Perfusion von Schweinenierensegmenten, AG Schweda.

## 1.1.2. Perfusionsbehältnis

Das Behältnis, in dem die Perfusion des Nierenstücks (Abb. 9, (6)) stattfindet, besteht aus einem doppelwandigen, 20 cm durchmessenden, 15 cm hohen **Glasgefäß**, in das ein runder, dreifüßiger Metalltisch mit eingefasstem Borosilikatrichter (Abb. 9, (5)) zentral fixiert wird. Das Gewebe liegt dabei direkt auf einem **Metallgitter**, sodass das venöse Effluat (Abb. 9, (2)) über den darunter liegenden **Trichter**, der in einen Silikonschlauch übergeht, das Behältnis durch eine Aussparung in der Doppelwand verlassen kann. Während der gesamten Perfusion befindet sich das Organ zur bestmöglichen Annäherung an physiologische Bedingungen bei **38°C** in einer vollständig mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre. Um dies zu gewährleisten ist der Boden des Behältnisses mit Wasser angefüllt (Abb. 9, (4)) und die Wandung des Behältnisses wird mit temperiertem Wasser durchspült (Abb. 9, (3)). Zur bestmöglichen Aufrechterhaltung dieser Bedingungen ist ein isolierender Deckel mit Dichtung (Abb. 9, (7)) unabdinglich. Eine Aussparung in der Dichtung erlaubt den Durchtritt des Perfusionschlauches (Abb. 9, (1)). Zur Reinigung und sterilen Aufbereitung im Autoklav ist das Behältnis vollständig in seine Einzelteile separierbar.

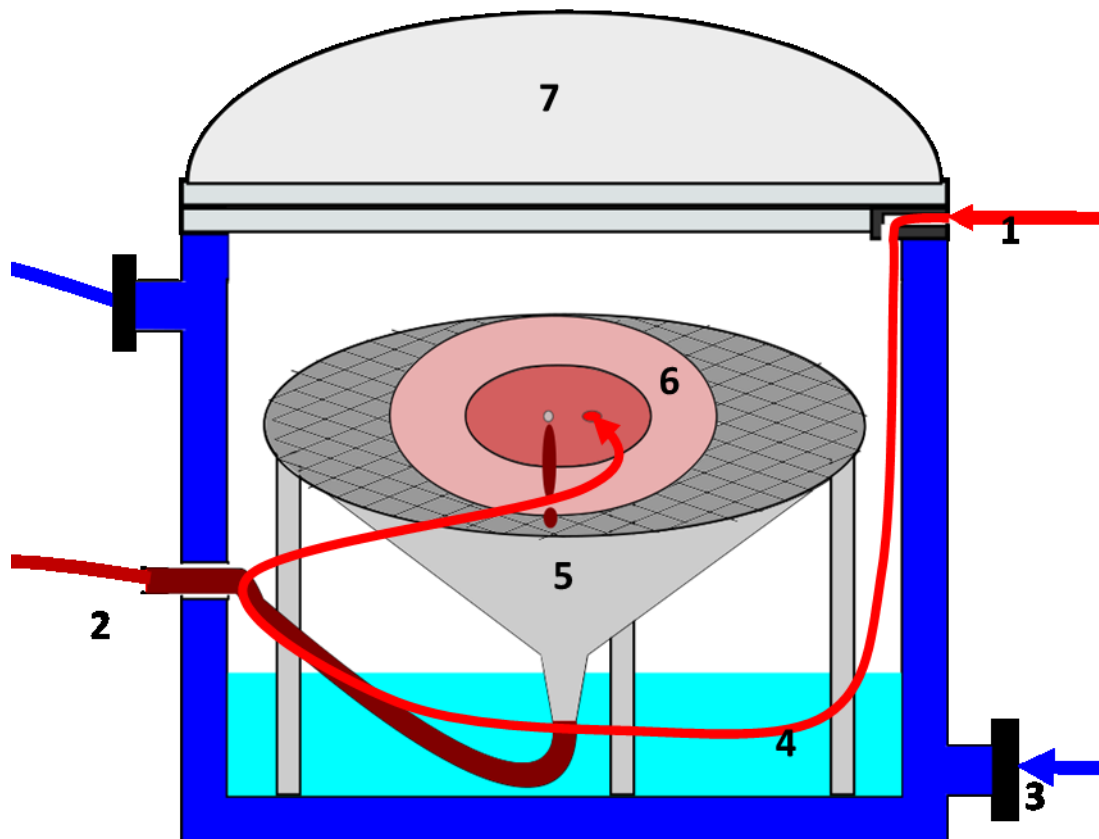


Abbildung 9 Schematischer Aufbau Perfusionsbehältnis

### 1.1.3 Oxygenierung

Um den Aufbau des Perfusionsapparates während seiner Entwicklung möglichst einfach zu halten haben wir uns gegen die Verwendung von Erythrozyten oder künstlichen Sauerstoffträgermedien entschieden. Die Oxygenierung des Perfusats erfolgt in Form **direkter Begasung mit Carbogen** (95% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub>) im temperierten 2-Liter-Perfusatbottich. Die Verwendung eines Sauerstoff-Kohlendioxid-Gemischs ermöglicht neben einer möglichst suffizienten Oxygenierung die Verwendung eines **Bicarbonat-Puffers**, der tubuläre Resorptionsvorgänge und mit diesen die physiologische Nierenfunktion begünstigt. Die kontinuierliche Begasung des gesamten Perfusatbestands ermöglicht selbst bei massiven Flussraten einen ausreichenden Vorrat sauerstoffgesättigten Perfusionsmediums. Aufgrund der hohen Maximalflussraten von über  $15 \frac{\text{ml}}{\text{min}}$  ist zudem eine Passage des gesamten gasimpermeablen Schlauchsystems innerhalb von weniger als zwei Minuten möglich.

### 1.1.4 Peristaltikpumpe und zugehörige Steuereinheit

Bei einer Peristaltik- oder auch Rollerpumpe handelt es sich um eine **Verdrängerpumpe**, bei der das Fördermedium durch Kompression eines Schlauchs - vermittelt über Rollen eines rotierenden Pumpenkopfs - durch diesen hindurchgepresst wird. Diese Art von Pumpe hat sich aus verschiedenen Gründen als technischer Standard für biomedizinische Zwecke, wie isolierte Organperfusionen etabliert. Am nennenswertesten scheint das **vollständig geschlossene Schlauchsystems**, das nicht zur Zwischenschaltung einer Strömungspumpe unterbrochen werden muss. Aus diesem Aufbau ergeben sich Vorteile für Wartung und Reinigung, sowie unkomplizierte Handhabung und Möglichkeit der Installation verschiedener Schlaucharten nach erforderlichem Verwendungszweck und Fördervolumen.

Da die Förderleistung derartiger Pumpen direkt vom Innendurchmesser der verwendeten Schläuche abhängt, erlaubt der simultane Einsatz verschiedener Schlauchgrößen in einer Mehrkanalpumpe unabhängig von der aktuellen Förderleistung der Pumpe die **konstante Zugabe fester Fraktionen an Reagenzien** zum Perfusat.

Bei der von uns verwendeten Pumpe handelt es sich um eine 8-rollige 4-Kanal Pumpe (Ismatec Reglo Analog MS-4/8) je nach verwendetem Schlauchtyp kann diese Pumpe ein Fördervolumen von bis zu  $35 \frac{\text{ml}}{\text{min}}$  im flusskonstanten Betrieb erreichen. Die vier Schlauchkanäle dienen in unserem Apparat dabei neben dem Betrieb des Perfusatschlauchs, der Ableitung des venösen Effluats in den Perfusatauffang, sowie der Zugabe verschiedener Substanzen über zwei kleinlumige Schläuche.

Die Verwendung eines Pumpkopfs mit mehreren Rollen ermöglicht in Kombination mit dem nachgeschalteten Windkessel eine deutliche Suppression peristaltischer Druckoszillationen, die zur verbesserten Druckkontinuität im Sinne einer möglichst schonenden Perfusion beiträgt.

Die Laufrate der Pumpe ist im Bereich von 1-100 Umdrehungen pro Minute in Stufen regulierbar. Um Perfusionen unter konstanten Druckbedingungen durchzuführen, wird jedoch eine **Steuereinheit**, die in direktem Kontakt zu einem Druckaufnehmer steht, benötigt. Wir verwenden für diesen Zweck einen Druckaufnehmer der Firma Memscap (SP844), sowie eine Kontrolleinheit bestehend aus STH Pump Controller, PowerLab 4/35 und BridgeAmp FE221 der Firma ADInstruments. Die Peristaltikpumpe in diesem Setup wird durch den STH Pump Controller angesteuert, der einen Wechsel zwischen Betrieb im flusskonstanten, wie aber auch druckkonstanten Modus ermöglicht. Der BridgeAmp fungiert als Schnittstelle zwischen Druckaufnehmer und der Steuereinheit und vermittelt die Übertragung des gemessenen Drucksignals an den Pump Controller, wie aber auch den PowerLab, der als Schnittstelle zwischen der Steuereinheit und dem PC mit LabChart dient und dadurch erst die Visualisierung, sowie Verrechnung der erfassten Daten ermöglicht.

Im **druckkonstanten Perfusionsmodus** fungiert dieses Signal als elektrisches Feedback, nach dem der Pump Controller kontinuierlich seinen analogen Output im Sinne einer Modifikation der Förderleistung der Pumpe zur Aufrechterhaltung des gewünschten Drucks anpasst. Während der Perfusion muss nun am Pump Controller zunächst die Geschwindigkeit der Pumpe im flusskonstanten Modus eingestellt werden. Bei Erreichen des vorgesehenen Drucks kann durch Knopfdruck in den druckkonstanten Modus umgeschaltet werden, woraufhin der aktuell gemessene Druck durch kontinuierliche Anpassung der Flussrate aufrechterhalten wird.

#### 1.1.5 Schläuche und Kanülen

Grundsätzlich muss festgestellt werden, dass **eine einzige Schlauchart nicht allen Anforderungen suffizient gerecht** werden kann. Bei Verzicht auf Sauerstoffträger sollte der Schlauchabschnitt zwischen der Sauerstoffquelle und dem Organ etwa eine möglichst geringe O<sub>2</sub>-Permeabilität aufweisen. Dies gilt auch für jenen Teil, der sich im Perfusatbottich befindet, da zwar bei ausreichender Perfusatsmenge in diesem Abschnitt zusätzliche Oxygenierung möglich wäre, bei abnehmendem Füllstand aber mit Sauerstoffverlust zu rechnen ist. Jener Teil der innerhalb des temperierten Perfusionsbehältnisses liegt, sollte möglichst flexibel sein, um unnötige Spannung auf der Kanüle im Gefäß zu vermeiden. In der temperierten Wendel, die in spätem Abschnitt detailliert betrachtet werden soll, darf es auf keinen Fall zu Knicken im

Schlauch kommen, da dieser Teil nicht für externe Manipulationen zugänglich ist. Hier muss also ein rigider, aber elastischer Schlauch verwendet werden. Dasjenige Schlauchstück hinter dem Perfusionsbehältnis hingegen sollte den Durchtritt durch die doppelte Gefäßwand möglichst gut isolieren, Gaspermeabilität aber ist nach Passage des Organs unbedeutend, sodass hier ein Silikonschlauch Material der Wahl ist.

Unter Berücksichtigung dieser Aspekte fiel die Wahl des verwendeten Schlauchs zwischen Perfusatbottich und Pumpe, sowie ab der temperierten Wendel bis zum Organ auf das Modell **S50 HL der Marke Tygon** mit einem Innendurchmesser von 1,6 mm. Bei einem Permeabilitätskoeffizienten von circa 6 Barrer weist er eine sehr geringe O<sub>2</sub>-Permeabilität (O<sub>2</sub>-Permeabilitätskoeffizient einfacher Silikonschläuche: ~ 600 Barrer (83)) bei ausreichender Elastizität, um Knicke zu vermeiden, auf.

Um einen reibungslosen Betrieb der Pumpe zu gewährleisten, wurde im Pumpenkanal der zugehörige **3-Stop PharMed® Ismaprene** Schlauch mit Innendurchmesser von 1,52 mm installiert. Dieses Schlauchmodell wurde ebenso für biomedizinische Zwecke entwickelt, ist aber deutlich starrer als das eben beschriebene Tygon Modell. Es weist neben chemischer Inertie, sowie langer Lebensdauer und einfacher Aufbereitung im Autoklav durch antihämolytische Beschaffenheit, einen geringem O<sub>2</sub>-Permeabilitätskoeffizient von 20 Barrer auf. Mit diesem Schlauch sind maximale Flussraten von bis  $13,6 \frac{ml}{min}$  im flusskonstanten Regelbetrieb und  $15,9 \frac{ml}{min}$  im druckkonstanten Perfusionsmodus möglich.

Neben dem Perfusatschlauch wurden zwei weitere Schläuche für **Interventionszwecke** in die Pumpenkanäle installiert. Hierbei handelt es sich ebenfalls um von Ismatec vertriebene 3-Stop Schläuche vom Modell ST R-3607 der Marke Tygon. Mit jeweils 0,13 mm weisen diese Exemplare den kleinsten vom Hersteller verfügbaren Innendurchmesser auf und werden einem Fördervolumen von etwa 1,63 % des Perfusatschlauchs gerecht. Bei gleichzeitiger Gabe von 2 Interventionen über die 0,13 mm Schläuche (entspricht 3,26%) ist damit ein kumulativer Maximalperfusatfluss von  $16,4 \frac{ml}{min}$  möglich.

Der Silikonschlauch über den das Perfusats nach Organpassage aus dem Behältnis geführt wird, geht in den 3-Stop Schlauch des vierten und letzten Pumpkanals über. Hierbei handelt es sich, wie auch beim Perfusatschlauch, um einen PharMed® Ismaprene Schlauch. Mit einem Innendurchmesser von 2,79 mm weist er etwa das zweieinhalbfache Fördervolumen des

Perfusatschlauchs auf, um einem Rückstau des Effluats gegenzusteuern und so möglichst exakte Probenentnahmen zu gewährleisten.

Deutlich komplexer als die Wahl des passenden Schlauchs gestaltet sich allerdings die Selektion einer **adäquaten Kanüle**. Wie bei der obig angeführten isoliert perfundierten Mäuseniere nämlich stellt auch bei unserem Apparat der Eigenwiderstand des Systems einen nicht vernachlässigbaren Störfaktor dar. Während bei beiden Methoden mit vergleichbaren Gefäßkalibern gearbeitet wird, ergibt sich für unser Modell der entscheidende Nachteil, dass sich die intrarenalen **Gefäßanschnitte** der Schweinenierensegmente nicht im Längs-, sondern im **Querschnitt** präsentieren. Der weitere Gefäßverlauf der kanülierten Arterie ist also für den Untersucher nicht nachvollziehbar. Da die intrarenalen Gefäße keinem geradelinigen Verlauf folgen, sondern sich in eine komplexe Gefäßkaskade verzweigen, birgt die Verwendung von rigiden Metallkanülen die Gefahr der Blockade des Kanülenlumens durch das anliegenden Gefäßendothel. Dies macht also die Verwendung von flexiblen Kunststoff-Kanülen mit suboptimalem Verhältnis von Außen zu Innendurchmesser oder von kleineren Metallkanülen notwendig, die in einem signifikanten Eigenwiderstand des Systems resultieren.

Die besten Ergebnisse konnten mit **selbst gefertigten Polyethylenkanülen** erzielt werden. Hierzu wurden Low-Density Polyethylen (LDPE) Smith Medical Portex Schlauchstücke mit einem Außendurchmesser von 1,98 mm und einem Innendurchmesser von 1,02 mm über der Flamme eines Bunsenbrenners erhitzt, bis das Material flexibel genug war, um es auf einen Außendurchmesser von etwa 0,5 mm auszuziehen. Die so gefertigten Kanülen verfügen am engsten Punkt über einen Außendurchmesser von 0,5 mm und einen Innendurchmesser von 0,26 mm und entsprechen damit etwa den Maßen einer 25 Gauge Kanüle. Vergleiche des Widerstands dieser Kanülen mit speziell angefertigten dünnwandigen Metallkanülen, sowie handelsüblichen Kanülen vergleichbaren Durchmessers werden im Hauptteil angeführt.

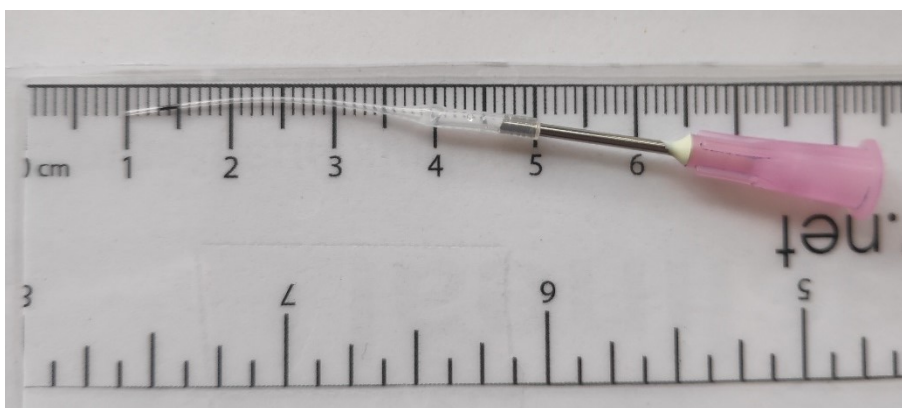


Abbildung 10 PE-Kanüle mit Außendurchmesser von 0,5mm

Aufgrund des limitierten Gefäßkalibers ist eine direkte Messung des Drucks vor der Kanüle nicht möglich. Wir können daher durch Messungen im Perfusatkreislauf nach der Kanüle nur den Gesamtdruck, der sich aus System- und Gefäßdruck zusammensetzt, bestimmen. Auch bei der druckkonstanten Perfusion kann dementsprechend also nur ein konstanter Gesamtdruck konserviert werden. Der Gefäßdruck lässt sich nur über den vorbekannten Eigenwiderstand des Systems, sowie die Flussrate bestimmen und durch regelmäßige Anpassungen des Gesamtdrucks, bei Veränderungen des Gefäßwiderstands, konstant halten.

#### 1.1.6 in-Line Modifikationen / zwischengeschaltete Gerätschaften

Um einen **kontinuierlichen und geschlossenen Perfusatkreislauf** zu gewährleisten ist die direkte Implementierung einiger Instrumente in den Perfusatfluss („**In-Line**“) notwendig. Hierunter fallen Windkessel zum Ausgleich der Druckschwankungen durch die Pumpperistaltik, aber auch Filter. Darüber hinaus muss der direkte Zugang zum Perfusatzzyklus ermöglicht werden ohne den Fluss zu alterieren oder gar unterbrechen. Dies kann durch Ports zur Gabe von Interventionen, sowie einen gesonderten Zugang zur Probenentnahme gewährleistet werden.

Ein Verzicht auf **Windkessel** resultiert in Spontanoszillationen und ungenauen Druckmessungen. Darüber hinaus dienen die beiden Windkessel als Blasenfänger, die ein Verschleppen von sich im Schlauchsystem lösenden Luftansammlungen ins Organ verhindern sollen. Bereits primitive Designs werden diesen Anforderungen suffizient gerecht. Für die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche wurden also zwei 20 ml Spritzen, die zur Hälfte mit Perfusat und zur anderen Hälfte mit Luft angefüllt wurden verwendet. Die Kompression der Luft in der Spritze dient dabei dem Druckausgleich.

Während inline-Filtration bei geschlossener Perfusatzirkulation unverzichtbar ist, läuft ein Single-Pass System keine Gefahr der Verschleppung von Gewebe oder anderen Verunreinigungen des Perfusats nach Organpassage. Die Implementation eines **Filters** hätte also keine unmittelbaren Vorteile, resultiert aber in einem signifikanten Anstieg des Systemwiderstands, sodass darauf verzichtet wurde.

Um das Risiko von Lufteinschlüssen oder Alterationen der Flussgeschwindigkeit bei der Applikation von Reagenzien über einen permanenten Zugang zum Perfusatfluss zu verhindern, stellt die Schaffung eines temporären Zugangs durch Perforation des Schlauchsystems den Zugangsweg der Wahl in klassischen Perfusionsapparaten dar. Aufgrund der zwischengeschalteten temperierten Wendel ist in unserem Fall eine Applikation im

Hochdruckbereich unmittelbar vorm Perfusionsbehältnis bevorzugt, um unnötig lange Transitzeiten zu vermeiden und somit den möglichst genauen Interventionsbeginn bestimmbar zu machen. Bei Systemdruck von über 200 mmHg ist aber bei direkter Perforation des Schlauchsystems mit Leakage zu rechnen, so dass ein **in-Line injection Port** (Ibdi), der für Drücke bis 375 mmHg, sowie wiederholte Perforationen konzipiert ist, installiert wurde. Um Residuen der Reagenzien im Windkessel zu verhindern, wurde dieser Port nach Passage von Windkessel und Druckabnehmer installiert.

### 1.1.7 Temperierung

Die Temperierung des Perfusionsapparats erfolgt über kontinuierliche Zirkulation von warmem Wasser zwischen Perfusatbottich, Wendel und Perfusionsbehältnis. Das Wasser wird dabei in einem Wasserbad auf 45,5 °C erwärmt und über eine Umwälzpumpe in Zirkulation gebracht. Nach dem Perfusatbottich wird die Wendel zum Vorwärmen des Perfusats vor Organpassage und schließlich das Perfusionsbehältnis durchströmt.

Da das Perfusat selbst keine hitzeempfindlichen Bestandteile enthält, kann durch diese Reihenschaltung eine möglichst effiziente Vorwärmung des Perfusats zum Ausgleich von transferbedingten Temperaturverlusten, gewährleistet werden, während das Organ in physiologischem Temperaturmilieu bei etwa 38°C aufbewahrt wird. Um eine vollständig mit Wasserdampf gesättigte Atmosphäre zu schaffen, wurde zusätzlich etwa 100ml Wasser in das Perfusionsbehältnis gefüllt.

Experimentelle Messungen der Perfusatemperatur zeigten bei einer Flussrate von  $5 \frac{ml}{min}$ , wie sie in der Anfangsphase einer Perfusion aufgrund der **kälteinduzierten Vasokonstriktion** durchaus realistisch ist, trotz Wasserbadtemperatur von 42°C eine flussabhängige Maximaltemperatur unmittelbar vor Organpassage von 34°C. Weiterhin ist anzumerken, dass die letztendliche Temperierung einer starken Abhängigkeit von der Flussgeschwindigkeit unterlag. Sehr geringe Flussgeschwindigkeiten resultieren unmittelbar in einer längeren Verweildauer im temperierten Behältnis vor Organpassage und dadurch einer höheren Perfusatemperatur. Ebenso kann für sehr hohe Flussraten aufgrund der schnellen Passage des Schlauchsystems eine gute Temperaturkonservierung beobachtet werden.

Zum Ausgleich des Temperaturverlusts wurde eine **temperierte Wendel** zum Vorwärmen des Perfusats vor Eintritt in den Perfusatbottich implementiert. Diese besteht aus einem etwa 30 cm langem Silikonschlauch an dessen Enden jeweils Y-Gabelungen angebracht sind, über die der Perfusatschlauch in das Schlauchstück eintritt. Innerhalb des Schlauchs verläuft der

Perfusatschlauch in eng gewundenen Schrauben, umströmt von Wasser mit einer Temperatur von etwa 40°C. So kann eine weitgehend flussunabhängige Temperatur des Perfusats von etwa 38°C vor Eintritt in das Organ erreicht werden.

### 1.1.8 digitale Auswertung und Dokumentation via LabChart

Die Visualisierung und Auswertung der gemessenen Perfusionsdaten erfolgt durch die Schnittstelle von PowerLab und PC via LabChart V8.1.19. Das Programm ermöglicht neben der **kontinuierlichen Aufzeichnung von Perfusatfluss und Druck** die gleichzeitige Berechnung von Gefäßdruck oder -widerstand, sowie die Erhebung von Durchschnittswerten.

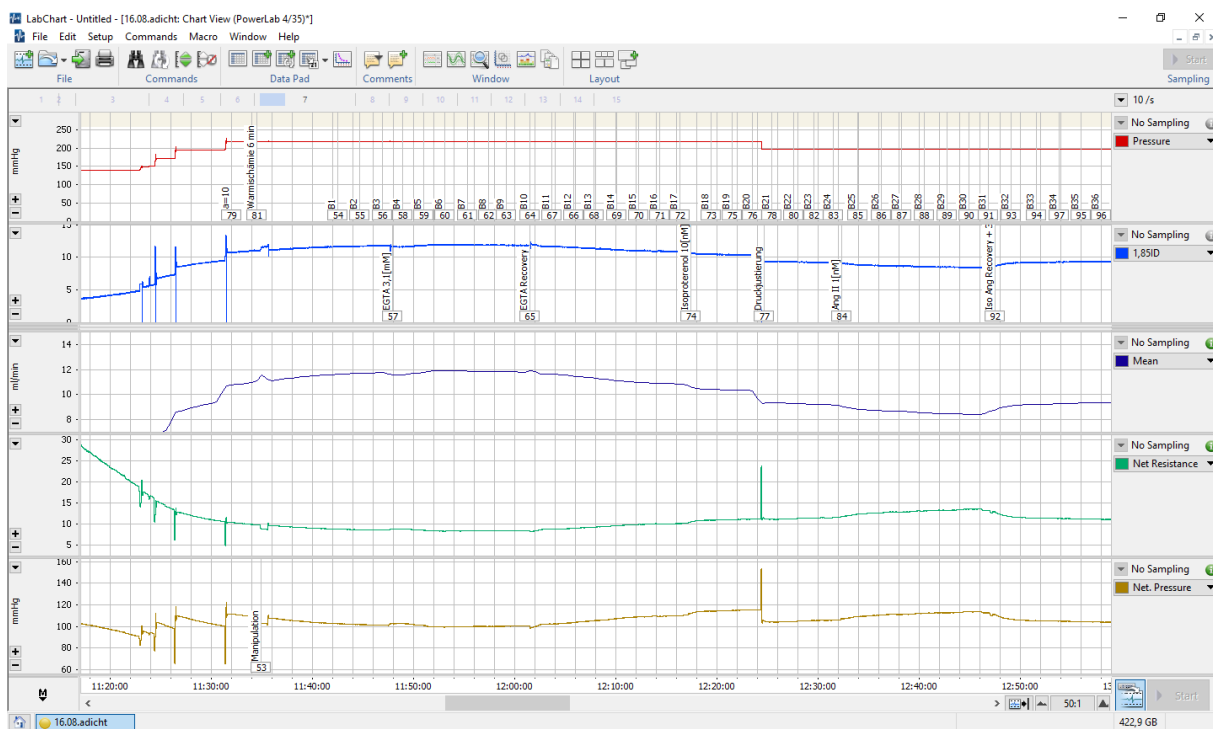


Abbildung 11 LabChart Interface; Kanal 1: Systemdruck (gemessen); Kanal 2: Perfusatfluss (gemessen); Kanal 3: Durchschnittliche Flussrate (errechnet); Kanal 4: Gefäßwiderstand (errechnet); Kanal 5: Gefäßdruck (errechnet). (Von oben nach unten nummeriert)

Es können weitere Kanäle hinzugefügt werden, die der **Verarbeitung und Aufbereitung der erhobenen Daten** dienen. Hier gezeigt ist das für unsere Experimente verwendete Layout, das neben Fluss und Gesamtdruck, den Durchschnittsfluss der letzten 30 Sekunden, sowie den errechneten Gefäßwiderstand und den Gefäßdruck darstellt. Die kontinuierliche Berechnung dieser Werte ist nur bei vorbekanntem Systemwiderstand  $R_S$  möglich. Dem Ohmschen Gesetz folgend lässt sich dieser nach der Formel  $R_S = U_S / I$  aus dem Systemdruck  $U_S$  und der Flussrate  $I$  berechnen. Grundsätzlich stellt der Systemwiderstand eine relativ konstante Variabel da, je nach verwendeter Kanüle besteht jedoch eine gewisse Abhängigkeit von der Perfusatflussrate.

Für den Gefäßdruck  $U_{Ge}$  gilt:  $U_{Ge} = U - R_S \cdot I$ . (Hierbei ist  $U$  der Gesamtdruck:  $U_{Ge} + U_S$ )

Folglich gilt für Gefäßwiderstand ( $R_{Ge}$ ):  $R_{Ge} = U_{Ge}/I = \frac{U - R_S \cdot I}{I} = U/I - R_S$

Da es sich bei  $R_S$  weitestgehend um einen relativ konstanten Parameter handelt, hängt der Gefäßdruck also vom Gesamtdruck und der Flussrate ab. Um einen konstanten Gefäßdruck trotz Änderungen in der Flussrate zu gewährleisten, ist also eine **kontinuierliche manuelle Anpassung** des durch die Steuereinheit angezielten **Gesamtdrucks** notwendig.

Nach abgeschlossener Datenerhebung können die Werte aller Graphen, sowie Kommentare inklusive Zeitstempel direkt in ein Excel-kompatibles Format exportiert werden. Zu Auswertungszwecken erfolgt zunächst eine **Flusskorrektur** um das Volumen der applizierten Interventionen. Da die Interventionen im Hochdruckgebiet nach Passage der Pumpe appliziert werden, führt dieses zusätzliche Volumen nämlich zu einem Druckanstieg, der durch einen Rückgang der Flussrate kompensiert wird. Der aufgezeichnete Fluss entspricht daher nicht dem tatsächlich applizierten Volumen, was eine Kompensation um den Faktor 1,0163 (das zusätzliche Volumen der jeweils applizierten Reagenzien entspricht 1,63% des Perfusatvolumens) pro Intervention notwendig macht.

## 1.2. Perfusionsmedium

### 1.2.1. Grundkomposition

Es handelt sich beim verwendeten Perfusionsmedium um einen **modifizierten Krebs-Henseleit Bicarbonat-Puffer** (siehe Tabelle 1). Der Bicarbonat-Puffer muss mit einem Gemisch aus Sauerstoff und Kohlendioxid (95%  $O_2$ ; 5%  $CO_2$ ) begast werden, um einen physiologischen pH-Wert von 7,4 zu gewährleisten. Die Pufferkapazität des verwendeten Perfusats setzt sich im Wesentlichen aus  $HCO_3^-$  und  $H_2PO_4^-$ , sowie  $HPO_4^{2-}$  zusammen.

<u>Chemikalien</u>	<u>Endkonzentration</u>	<u>Einwaage</u>
<b>H<sub>2</sub>O Millipore</b>		3,7 l (Am Schluss Auf 5 l auffüllen)
<b>NaCl</b> (MG: 58,443)	107,80 mM	31,5g
<b>KCl</b> (MG: 74,55)	4,43 mM	1,65g
<b>MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O</b> (MG: 203,30)	2,10 mM	2,135g

<b>CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O</b> (MG: 147,02)	1,24 mM	0,91g
<b>NaHCO<sub>3</sub></b> (MG: 84,007)	27,50 mM	11,55g
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O</b> (MG: 137,99)	0,29mM	0,198 g
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O</b> (MG: 178,00)	0,66mM	0,589 g
<b>Aminoplasmal</b> 10 % Infusionslösung		40ml
<b>Harnstoff / CH<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O</b> (MG: 60,06 )	6,00 mM	1,802 g
<b>ADH / [deamino-Cys<sup>1</sup>,D-Arg<sup>8</sup>]-Vasopressin</b> <b>Acetatsalz-Hydrat</b> (MG: 1069,22)	0,094nM	0,5µg
<b>Na-Glutamat x H<sub>2</sub>O / NaC<sub>5</sub>NO<sub>4</sub>H<sub>8</sub> x H<sub>2</sub>O</b> (MG: 187,13)	0,31 mM	292,3 mg
<b>Na-Pyruvat / C<sub>3</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>3</sub></b> (MG: 110,04)	0,30 mM	165 mg
<b>Na-L-Laktat / C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>NaO<sub>3</sub></b> (MG: 112,06)	2,10 mM	1175 mg
<b>α-Ketoglutar säure Dinatriumsalz-Hydrat /</b> <b>C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>O<sub>5</sub>Na<sub>2</sub>· xH<sub>2</sub>O</b> (MG: 190,06)	1,19 mM	1,1305 g
<b>L-(-)Äpfelsäure / C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O<sub>5</sub></b> (MG: 134,09)	1,16 mM	780,5 mg
<b>Kreatinin / C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>N<sub>3</sub>O</b> (MG: 113,12)	0,13 mM	75 mg
<b>Glucose-Monohydrat / C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> x H<sub>2</sub>O</b> (MG: 198,17)	7,57 mM	7,50 g
<b>Ampicillin</b>		150 mg
<b>Flucloxacillin / Staphylex</b>		150 mg

Tabelle 1: Perfusatkomposition (Grundlegende Elektrolyte; Puffer; Additiva)

### 1.2.2. Additiva

Das Perfusat enthält neben Elektrolyten, verschiedene Substanzen, bei denen wir uns am von Schweda und Czogalla verwendeten Perfusionsmedium orientiert haben und deren physiologische Bedeutung im jeweiligen Abschnitt bereits in der Einleitung erläutert wurde. (7)

### 1.2.3. Kolloid

Ohne ausreichenden onkotischen Druck des Perfusats kommt es zu Flüssigkeitsaustritt aus den Gefäßen, mit interstitiellem Ödem und einhergehendem Anstieg des Gewebedrucks, der dann letztlich in einer progredienten Abnahme des Perfustafusses mündet. Die Nutzung von Albumin, das in vivo den größten Teil zum onkotischen Druck im Blut beiträgt, wird dadurch erschwert, dass direkte Begasung eines albuminhaltigen Perfusionsmediums zur Schaumbildung und damit Luftembolien im Organ führen kann. Da wir zur Etablierung einer neuen Methodik einen möglichst einfachen Experimentenaufbau mit direkter Begasung angestrebt haben, wurde auf Albumin als onkotische Substanz bewusst verzichtet. Stattdessen wurde **Dextran mit einem Durchschnittsmolekulargewicht von 150 kDa** verwendet. Im Gegensatz zu Gelatineverbindungen, aber auch zu Dextranen von niedrigerer Größe, besteht bei diesem Zuckerpolymer eine geringere Gefahr der glomerulären Filtration und einer daraus resultierenden tubulären Schädigung. (5) Eine direkte Begasung des Perfusats bei Zugabe von 3% Dextran 150 kDa mit Carbogen ist ohne Schaumbildung möglich.

### 1.2.4. Sauerstoffträger

Wie eigene frühe Versuche zeigten stellt die Zugabe von Erythrozyten zum Perfusionsmedium ein ähnliches Problem wie die Addition von Albumin dar. Trotz multipler Waschvorgänge war es nicht möglich Schaumbildung bei direkter kontinuierlicher Begasung des Perfusats zu verhindern. Synthetische Sauerstoffträger, wie etwa emulgierte Perfluorcarbone, stellen nach wie vor Nischenprodukte dar und kommen so nicht als geeignete Alternative in Frage. Aus diesen Gründen wurde für unsere Experimente auf die Zugabe eines Sauerstoffträgers gänzlich verzichtet und das Perfusat stattdessen im Sinne des einfachst möglichen Aufbaus **direkt, kontinuierlich** mit Carbogen (95% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub>) begast.

## 1.3. Operationstechnik

Die relativ einfache Methodik stellt einen Vorteil gegenüber der deutlichen komplexeren Präparation anderer isolierter Organperfusionsen, wie besonders der isoliert perfundierten Mäuseniere, dar. So ist sie auch durch ungeübte Untersucher schnell erlernbar und benötigt keine speziellen Instrumente, um gute Ergebnisse zu gewährleisten.

## 1.3.1. verwendete Materialien

Zur Vermeidung eines übermäßigen Leckflusses muss der Abschnitt eines zu perfundierenden Nierensegments so gewählt werden, dass die Gefäßanschnitte als **Querschnitt** vorliegen. Das zu präparierende Gefäß, liegt also zum Großteil für den Untersucher vorgebogen im Nierengewebe. Um das Gefäß bei der Präparation zu schonen sollte die Präparation daher stumpf mit Präparierpinzette oder durch Spreizbewegungen mit einer Präparierschere erfolgen. Die Kanüle während der Ligatur mit Gefäßklemmen im Gefäß fixiert werden.

## 1.3.2. OP-Protokoll

Der (präferiert kaudale) Nierenpol wird 3 bis 4 cm hiluswärts durch einen geraden Schnitt in der Transversalebene abgesetzt und so auf dem Gittertisch des Perfusionsbehältnisses gelagert, dass die Schnittfläche im Sichtfenster des OP-Mikroskops liegt. Nun wird eine **intrarenale Arterie mit geeignetem Kaliber** identifiziert (erfahrungsgemäß eignet sich hierfür am besten eine A. interlobaris) und stumpf aus dem umgebenden Bindegewebe freipräpariert, bis etwa 3 - 5 mm des Gefäßes frei zugänglich sind. Im Anschluss wird die entlüftete Kanüle eingeführt und mit einer Gefäßklemme gesichert, bis diese durch eine Ligatur befestigt wird. Im Anschluss wird die Perfusion gestartet, was bei gelungener Präparation zum Ausspülen von etwas Blut und dem Ablassen des Gewebes führt.

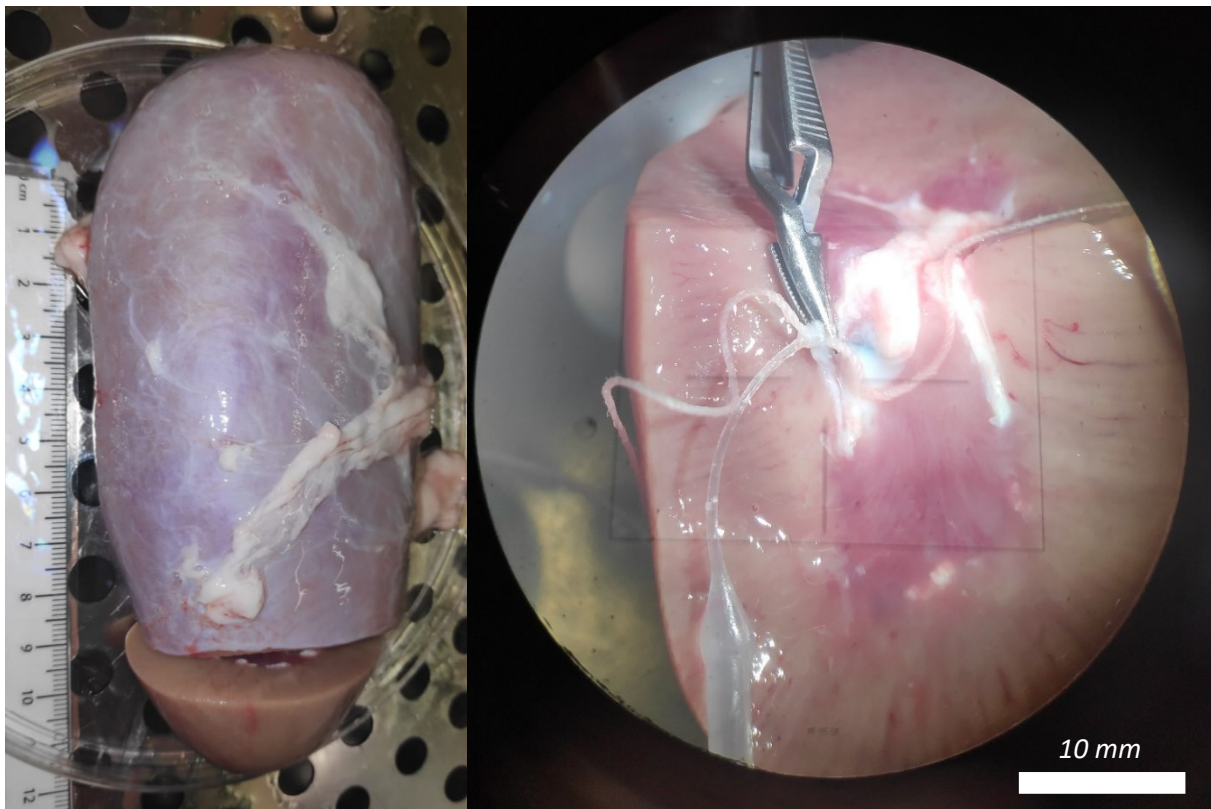


Abbildung 12 Links: Abtrennen des kaudalen Nierensegments vor Perfusion. Rechts: PE-Kanüle in A. interlobaris. Fixiert mit Gefäßklemme und Ligatur.

## 1.4. Verwendetes Gewebe

### 1.4.1. Schweinenieren

Die **verwendeten Organe** stammen von Tieren einer Kreuzung aus Deutscher Landrasse und Piétrain, im Alter von etwa vier Monaten und mit einem Gewicht von 110-130 kg. Die Männchen wurden nach der Geburt kastriert. Das gesamte Prozedere von elektrischer Betäubung, anschließendem Kehlschnitt bis zur Entnahme der Niere und Lagerung in einer 0,9 % Kochsalzlösung auf Eis dauerte etwa 20-30 Minuten. Die Organe wurden vor Perfusion zwischen einer und zehn Stunden in 0,9 % Kochsalzlösung auf Eis gelagert.

Alle 98 Organe wurden im Zeitraum vom 06.04.2021 bis zum 06.10.2021 von der Metzgerei Meindl in Burglengenfeld als Spende an die Wissenschaft bezogen. Neben Perfusionsversuchen wurden diese auch zur Anfertigung von Korrosionspräparaten und Versuchen zu Lagerung und Transport der Organe verwendet.

### 1.4.2. Transport und Konservierung

Die ersten bezogenen Organe wurden noch vor Ort mit eisgekühlter kolloidhaltiger Ringerlösung gespült. Es ergab sich aber im direkten Vergleich weder funktionell noch histologisch ein Vorteil gegenüber Organen, die nicht gespült wurden, weswegen schließlich auf den Spülvorgang verzichtet wurde und die Organe direkt nach Entnahme in **eisgekühlter Kochsalzlösung** gelagert wurden.

## 1.5. verwendete Reagenzien

Alle verwendeten Reagenzien wurden in einem Anteil von 1,63 % (bzw. 3,26 %, bei niedrigerer Löslichkeit mit Notwendigkeit zur Verwendung von simultaner Gabe über 2 Schläuche) zum Perfusionsmedium gegeben und soweit möglich mit Puffer (ohne Dextran) verdünnt. Alle vorbereiteten Stammlösungen wurden bei -20 °C gelagert.

### 1.5.1. Isoproterenol

**Isoproterenol** ist ein nicht selektives Beta-Sympathomimetikum und potentes Stimulans der Reninsekretion. Die verabreichte Zielkonzentration im Organ beträgt 10 nM.

### 1.5.2. Angiotensin II

**Angiotensin (Ang II)** ist ein potenter Vasokonstriktor und Inhibitor der Reninsekretion. Die verabreichte Zielkonzentration im Organ beträgt 1 nM.

### 1.5.3. EGTA

Bei **Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure** (EGTA) handelt es sich um eine Polyamino-Carbonsäure, die ähnlich dem verwandten EDTA Einsatz als Chelator findet, dabei aber eine deutlich höhere Spezifität für Calcium aufweist. Die verabreichte Zieldosis im Organ beträgt hier 3 mM.

### 1.5.4. SNAP

**S-Nitroso-N-acetylpenicillamin** ist ein direkter, also NO-Synthetase unabhängiger, Stickstoffmonoxid-Donor. Die verabreichte Zieldosis im Organ beträgt 10  $\mu$ M.

### 1.5.5. Acetylcholin

Der Neurotransmitter **Acetylcholin** ist ein Stimulans der NO-Synthetase und dadurch indirekter NO-Donor. Die verabreichte Zieldosis im Organ beträgt 30  $\mu$ M.

### 1.5.6. Bumetanid

Bei **Bumetanid** handelt es sich um ein Schleifendiuretikum, das unter anderem über den Macula Densa Mechanismus als Stimulans auf die Reninsekretion wirkt. Die verabreichte Zieldosis im Organ beträgt 100  $\mu$ M.

### 1.5.7. Kaliumchlorid

In der Frühphase unsere Experimente wurde eine hochosmolare **KCl** Lösung zum Perfusat gegeben, um die Vitalität des Organs zu prüfen. Die Zieldosis im Organ betrug hierbei 50 mM.

## 1.6 Perfusionsprotokoll

### 1.6.1. Ablauf der Perfusion

Während der Präparation kann bereits die Oxygenierung des Perfusionsmediums mit Carbogen gestartet und die Pumpe bei niedrigem Perfusatfluss in Betrieb genommen werden. Dies gewährleistet die Entlüftung der Kanüle mit temperiertem und oxygeniertem Perfusat. Erst zur Fixierung der Kanüle im Gefäß sollte der Betrieb der Pumpe gestoppt werden. Während der Erwärmung des Organsegments sollte die Pumpe bereits im druckkonstanten Perfusionsmodus betrieben werden und der Gesamtdruck stets so angepasst werden, dass der ermittelte Gefäßdruck etwa 100 mmHg beträgt.

Nach Erreichen eines Plateaus werden **kontinuierlich alle 2 Minuten Proben** des renalen Effluats entnommen. Nach 15 Minuten stabilen Flussplateaus kann die erste Reagenzie appliziert werden. Nach weiteren 15 Minuten und entsprechend 7 Probenentnahmen, kann in die nächste Intervention übergegangen werden.

### 1.6.2. Nachbereitung der Organe

Im Anschluss an das Experiment kann über die Perfusionskanüle ein **Aussusspräparat** des perfundierten Gefäßbaumes angefertigt werden, oder das Organ mit Evans Blue-Lösung gespült werden, bis eine kräftige Verfärbung des perfundierten Areals eintritt. Hierdurch wird die spätere **Bestimmung des perfundierten Gewebevolument** möglich.

Der Eigenwiderstand der Kanüle sollte zwischen jeder weiteren Perfusion aufs Neue bestimmt werden. Kanülen und Schläuche sollten nach der Perfusion entweder direkt mit Wasser ausgespült werden, oder weiterhin bei niedriger Flussrate betrieben werden, um einem Ausfall des Dextrans im Schlauchsystem vorzubeugen.

### 1.7. Gütekriterien vitaler Perfusionen

Um eine möglichst große Zahl funktionsfähiger Perfusionen zu gewährleisten war es notwendig vitale Perfusionen bereits während der Perfusion zu identifizieren.

Nach Analyse der durchgeführten Perfusionen wurden daher einige Regeln etabliert. Zunächst sollte nach abgeschlossener Präparation die **richtige Lage der Kanüle** durch Ausspülen von Blut einhergehend mit blasser Verfärbung des perfundierten Gewebes verifiziert werden. Ein **Druckplateau** sollte innerhalb von 15-45 min nach Start der Perfusion erreicht werden. Hierbei spricht ein sich vorzeitig einstellendes Plateau für signifikanten Leckfluss, während längere Perfusionszeit bis zum Plateau als Zeichen für artifiziell erhöhten Gefäßwiderstand, im Sinne einer ungünstigen Lage der Katheterspitze, oder aber auch Embolie/Thromben, interpretiert werden muss. Die **Flussrate** sollte sich bis das Flussplateau erreicht ist in etwa parallel zur Gewebetemperatur entwickeln. Die letztlich erreichte Flussrate sollte beim von uns gewählten Setup etwa  $0,5-2 \frac{ml/min}{g}$  betragen. Da zu diesem Zeitpunkt das Gewicht des perfundierten Areals aber noch nicht bekannt ist, dient der angegebene Bereich lediglich als grobe Orientierung. Höhere Flussraten können wiederum als Zeichen für Leckfluss verstanden werden, während niedrigere Flussraten bei artifiziell erhöhtem Gefäßwiderstand auftreten. Schließlich lässt sich auch auf einen negativen Einfluss einer **Lagerungsdauer** von über 10 Stunden, sowie einer **Warmischämiezeit** von mehr als einer Stunde auf die Vitalität des Gewebes schließen. Ein Ausschluss bei Erfüllen all dieser Bedingungen ist nur bei Perfusionen mit unerklärbar niedriger Reninsekretion ( $< 10 \frac{ng/h}{g}$ ), oder kontinuierlich steigender Reninsekretion als Zeichen von Zelltod, erfolgt.

## 2. Analyse

### 2.1. Reninimmunoassay

Die Reninaktivität im venösen Effluat wurde mittels Angiotensin I-ELISA (IBL) nach Herstellerprotokoll bestimmt.

#### 2.1.1. Probenakquise

Sobald ein stabiles Flussplateau erreicht wurde, aber nicht früher als 15 Minuten nach Perfusionsbeginn, wurden alle 2 Minuten Proben des venösen Effluats gesammelt. Die Proben wurden direkt nach Entnahme auf Eis zwischengelagert. Nach Perfusionsende wurden die jeweiligen Proben bis zur Durchführung des Reninimmunoassays bei  $-20\text{ °C}$  gelagert. Die letzten 3 entnommenen Proben jeder Intervention, sowie der anfänglichen Plateauphase als Kontrollwerte und je ein Leerwert pro Perfusatansatz flossen schlussendlich in den Immunoassay ein.

#### 2.1.2. RIA Protokoll

Zur Durchführung des **Sandwichassays** wurden die Proben vorab 1:5 mit Maleatpuffer auf ein Gesamtvolumen von  $25\mu\text{l}$  verdünnt. Die so verdünnten Proben wurde zur Inkubation mit  $25\mu\text{l}$  1:2 mit Maleat verdünntem Reninsubstrat (Angiotensinogen), sowie  $5\mu\text{l}$  Generation Buffer und  $1\mu\text{l}$  PMSF zur Stabilisierung des entstandenen Angiotensin I (Ang I) vermischt. Als Quelle für das benötigte Reninsubstrat diente das Plasma bilateral nephrektomierter Ratten. Dieser Ansatz wurde für 90 Minuten im Wasserbad bei  $37\text{ °C}$  inkubiert, um die **Umsetzung des Angiotensinogens durch** das in den Proben enthaltene **Renin** in Angiotensin I zu ermöglichen.

Nach der Inkubation wurden die Proben bei 12000 Umdrehungen pro Minute und  $4\text{ °C}$  für 5 Minuten zentrifugiert und im Anschluss  $45\mu\text{l}$  der Probe entnommen und zusammen mit der gleichen Menge an Standards definierter Ang I-Konzentrationen in die Wells der ELISA-Platten pipettiert. Das Prinzip des kompetitiven Immunoassays beruht darauf, dass das in den Proben gebildete Angiotensin I mit zugegebenem biotinyliertem Angiotensin I, um Bindungsstellen der Ang I-Antikörper an der Festphase konkurrieren. Eine im nächsten Schritt zugegebene Streptavidin-Horseraddish-Protease bildet Konjugate mit dem biotinylierten Ang I, nicht aber mit dem Ang I der Proben. Die Zugabe von Tetramethylbenzidin als Substrat der Protease, sowie des Katalysators Wasserstoffperoxid ermöglicht schließlich das Ablaufen einer Farbreaktion. Durch die Zugabe von Schwefelsäure kann diese Reaktion fixiert werden und die Extinktion der Proben als inverses Maß der Reninkonzentration **photometrisch** bestimmt werden. Die Auswertung der eigentlichen Angiotensin I Konzentration bzw. des Reningehaltes

der Proben erfolgt mit Hilfe einer aus Kalibratoren bekannter Konzentrationen generierten **Standardkurve**. Ein Nullwert wurde aus Proben des Perfusats der jeweiligen Perfusionsreihe bestimmt und von den gemessenen Werten abgezogen. Die so ermittelte Angiotensinkonzentration  $\frac{ng\ Ang}{h*ml}$  wurde mit dem Perfusatfluss  $\frac{ml}{min*g}$  multipliziert um die Reninsekretion  $\frac{ng\ Ang}{h*min*g}$  zu berechnen.

## 2.2. Histologie

### 2.2.1. Diffusionsfixierung mittels Paraformaldehyd

Zur histologischen Untersuchung wurden die Gewebestücke am Ende der Perfusion mit einer Evansblau-Lösung durchspült zur Differenzierung des perfundierten vom nicht perfundierten Gewebe. Aus dem so markierten Gewebe wurden etwa 1,5 cm x 1,5 cm x 1 cm messende Stanzen entnommen und zunächst 24 Stunden in einer 4 prozentigen **Paraformaldehyd- (PFA) Lösung** diffusionsfixiert.

### 2.2.2. Einbettung, sowie Anfertigung von Paraffinschnitten

Zur Anfertigung der histologischen Schnitte ist zunächst eine weitere Stabilisierung des Gewebes im Sinne einer **Einbettung in Paraffinwachs** notwendig. Hierzu wurden die Gewebestücke zunächst für mindestens 12 Stunden in 70 % Methanol gelagert, um im Anschluss eine aufsteigende Alkoholreihe zur Dehydratation zu durchlaufen. Daraufhin wurde das Gewebe für 30 Minute in einer 1:2 Mischung aus Isopropanol und Paraffin bei 55°C und abschließend zweimal für 24 Stunden in reinem Paraffin bei 60°C gebettet. Am Rotationsmikrotom wurden Schnitte in 5 µm, sowie 10 µm Dicke angefertigt und auf Objektträger gezogen.

### 2.2.3. Hämatoxylin-Eosin Färbung

**Hämatoxylin-Eosin (HE)** stellt wohl die gängigste histologische Färbungsmethode dar. Die Färbung setzt sich dabei aus den beiden Komponenten Hämatoxylin und Eosin zusammen, wobei Hämatoxylin basisch ist, also basophile Strukturen (DNA im Zellkern) blau färbt, während Eosin sauer ist und entsprechend acidophile Strukturen (Kollagen, Zytoplasma, Elastin) rot färbt. Die getrockneten Schnitte müssen vor der Färbung zunächst mit zwei zehnmütigen Xylol Bädern entparaffiniert werden und anschließend in einer absteigenden

Alkoholreihe rehydratisiert werden. Nun können die Schnitte für 2 ½ Minuten mit „Mayer’s Hämalaun“- Lösung gefärbt und für 30 Sekunden in 0,1 % Salzsäure gewaschen werden, sowie anschließend unter fließendem Wasser für 5 Minuten differenzieren. Im nächsten Schritt werden die Schnitte für 5 Minuten in den Eosin-Anteil der Färbung gegeben und für 30 Sekunden unter fließendem Wasser gespült. Dem folgt eine Dehydratisierung in einer aufsteigenden Ethanolreihe. Die Eindecklung der Schnitte erfolgte mit DePeX-Mounting-Medium. Die Untersuchung der Nierenschnitte erfolgte mit Hilfe eines Zeiss Axiovert 200M-Mikroskops mit motorisierter Objektauflage und der Software ZEN lite (2012), sowie eines PrimoStar Zeiss Lichtmikroskops.

### 2.3. Ermittlung Gewebsgewicht

Die Ermittlung des perfundierten Gewebegewichts ist aufgrund der teils erheblich schwankenden Größendifferenz einzelner Gewebekeile unabdingbar zur Vereinheitlichung gewonnener Daten. Zur expliziten Ermittlung der Masse des perfundierten Gewebes wurde eben genanntes am Ende der Perfusion mit einer **Evansblau-Lösung** durchspült. Dies erfolgte über direkte Zugabe des Färbemediums bei noch laufender Perfusion. Das Gewebe wurde im Anschluss bei -20°C eingefroren, um sämtliches nicht markiertes Gewebe im gefrorenen Zustand abzutragen. Im Anschluss wurde das Gewebegewicht auf einer Feinwaage bestimmt und das Gewebevolumen als Kontrolle in einem 50 ml Messkolben durch Wasserverdrängung ermittelt.

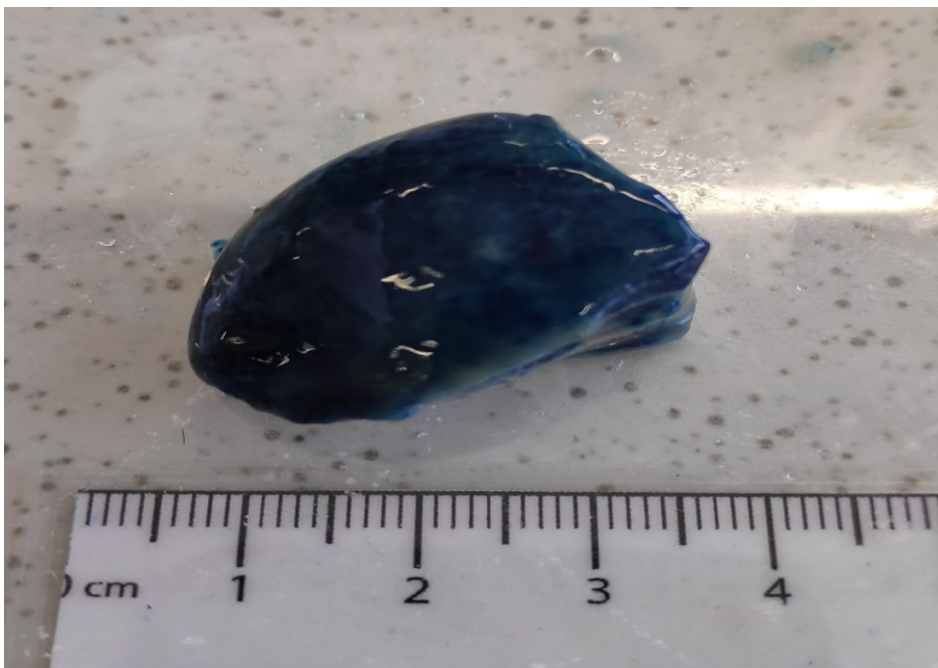


Abbildung 13 Mit Evans Blue markiertes Nierensegment. Das umliegende Gewebe wurde bereits abgetragen.

### 2.4. statistische Auswertung

Alle erhobenen Daten wurden als Mittelwert (MW) der Einzelmessungen  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt. Hierbei wurden die letzten 3 entnommenen Proben betrachtet und ein Durchschnittswert zur statistischen Auswertung gebildet. Die Auswertung, sowie Erstellung der Graphen erfolgte mit Microsoft Excel 2016, sowie GraphPad Prism V 5 und LabChart V 8.1.19. Die statistische Signifikanz wurde über einen **gepaarten Students t-Test**, sowie beim Vergleich mehrerer Interventionen untereinander über einen einfaktoriellem **ANOVA-Test** ermittelt. Für Mehrfachvergleiche kam zudem ein **Dunnett-Test** zum Einsatz. Falls nicht weiter spezifiziert wurde ein Signifikanzniveau  $p = 0,05$  festgelegt.

## 3. Korrosionspräparation

Zur Planung der Präparation und Auswahl eines geeigneten Gefäßabschnitts zur Kanülierung wurden Nierenkorrosionspräparate angefertigt. Die **dreidimensionalen Gefäßmodelle** wurden durch die Perfusion der Gewebestücke mit kapillargängigem **Harz-Härter-Gemisch** (E20 Plus Harz und E20 Plus Härter, Biodur Deutschland) erstellt. Für Korrosionspräparate ganzer Nieren wurde nach Spülung der Nieren mit 100 ml NaCl etwa 10ml des Gemisches (100 Teile Harz zu 55 Teile Härter) 20 Minuten nach Mischen beider Komponenten über die A. renalis appliziert. Nach 24-stündigem Aushärten des duroplastischen kunststoffs erfolgte ein **Zersetzen** des organischen Gewebes **durch 25% Kaliumhydroxid-Lösung** für etwa 24 h. Nach Ausspülen mit Aqua dest. und erneuter Zugabe von 25% KOH wurde das Organ für weitere 24 Stunden auf einem Orbital Shaker bei 60 RPM zur Verdauung des restlichen renalen Stütz- und Bindegewebes gelagert. Die Präparation der Korrosionspräparate erfolgte nach Entnahme aus dem KOH Bad und Spülung mit Aqua Dest. stumpf mit 2 Pinzetten unter einem OP-Mikroskop. Hierbei wurden Gefäßverästelungen bis zu Aa. interlobulares geschont, aber auch eine Präparation mit Schonung der Glomeruli, sowie Kapillaren angefertigt. Weiterhin wurden zur Validierung der korrekten Präparation Korrosionspräparate von perfundierten Schweinenierensegmenten angefertigt. Hierzu wurde das Organ am Ende der Perfusion nicht mit Evansblau zur Ermittlung des perfundierten Gewebes durchspült, sondern die Perfusion gestoppt und über die noch liegende Kanüle, je nach Größe des Gewebekeils 0,5 bis 2 ml des Harzgemisches appliziert. Die Bilder der Korrosionspräparate wurden entweder direkt am OP-Mikroskop oder einem Discovery V8 Stereomikroskop der Firma Zeiss aufgenommen. Die Messungen der Gefäßdurchmesser wurden mit einer elektronischen Schieblehre (Parkside, Deutschland) vorgenommen.

## III. Ergebnisse

### 1. Korrosionspräparation

#### 1.1. Komplette Schweinenierenpräparate

Zur Ermittlung eines geeigneten Gefäßes für die Perfusionen wurden zunächst Korrosionspräparate von ganzen Schweinenieren angefertigt. Die für die Auswahl relevanten Kriterien umfassten eine ausreichende Größe zur sicheren Präparation, bei gleichzeitig sicherem Antreffen im Keilpräparat einer Nephrektomie, sowie Ausreichend Absetzungsrand um unnötigen Leckfluss zu vermeiden. In Rücksprache mit den Kollegen der Urologie wurde eine Resektionslinie bei 3 cm vom Pol aus als realistisch umsetzbar für Nephrektomiegewebe betrachtet und konnte die genannten Kriterien erfüllen.

Nach Anfertigung des Korrosionspräparats zeigt sich zunächst die beeindruckende **Dichte des glomerulären Gefäßbettes** (Abb 14). Erst nach Entfernen der feinsten Kapillaren, sowie Glomeruli ist jedoch eine Betrachtung der intrarenalen Gefäßsituation (Abb 15) möglich.

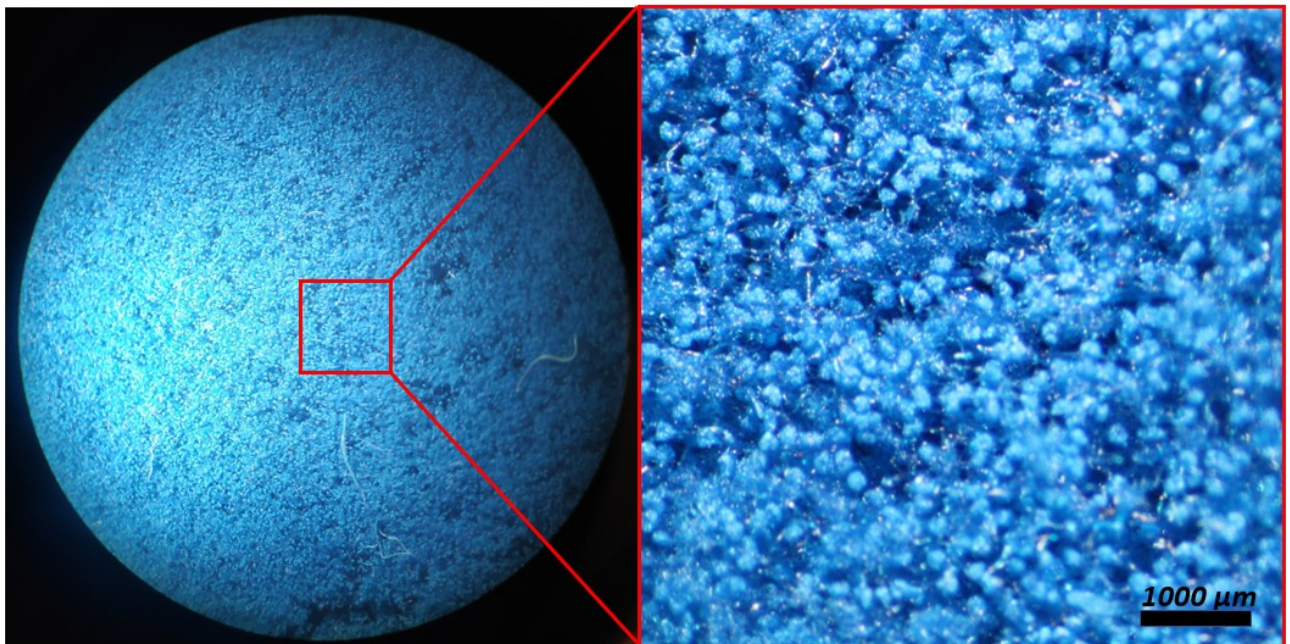


Abbildung 14 Blick auf dichtes glomeruläres Bett des Korrosionspräparates einer Schweineniere



Abbildung 15 Korrosionspräparat einer Schweineiere nach Abtragung der Kapillaren und feinen Gefäße.

Die Bilder einer weitgehend kapillarerhaltenden Präparation des kaudalen Nierensegments (Abb 16, links), sowie der nebenstehende Ausschnitt einer **A. arcuata** (Abb 16, rechts) zeigen eindrücklich die Eignung des verwendeten Biodur Harzes zur Abbildung potentiellen kapillären Leckflusses.



Abbildung 16 Links: Kapillarerhaltende Präparation Kaudales Nierensegment; Rechts Aufstellung einer *A. Arcuata* im OP Mikroskop

Aufgrund der in der Literatur oft uneinheitlichen Bezeichnung der **intrarenalen Gefäßabgänge** der A. renalis, soll das beigefügte Schaubild (Abbildung 17) die Nomenklatur dieser Arbeit abbilden.

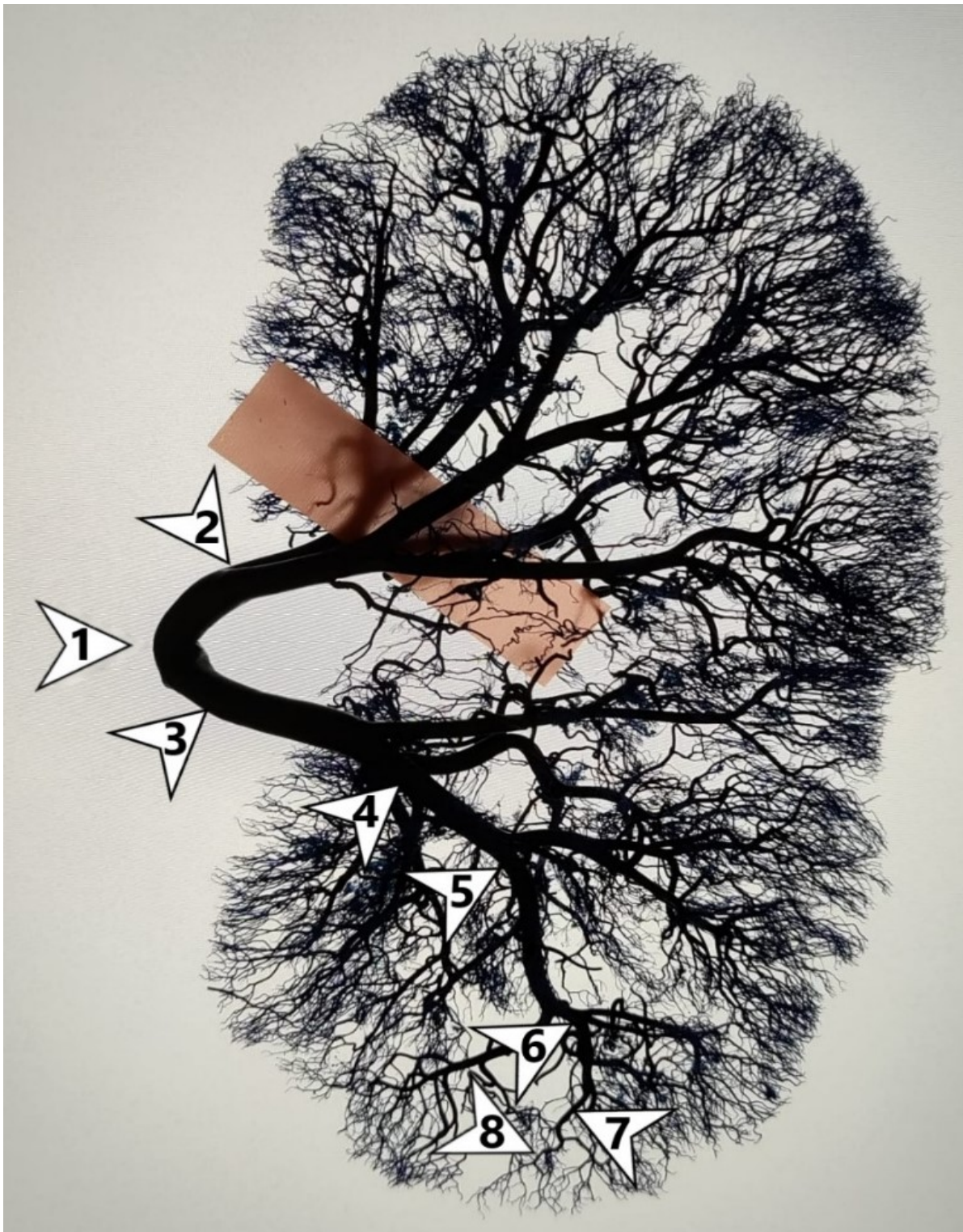


Abbildung 17 Korrosionspräparat Schaubild Intrarenale Gefäße 1. A. renalis; 2. Aufzweigung craniales Segment der A. renalis in ventralen und dorsalen Ast; 3. caudales Segment der A. renalis; 4. A. segmentalis; 5. A. lobaris; 6. A. interlobularis; 7. A. arcuata; 8. A. interlobularis

Die direkte Messung des **Gefäßkalibers** mittels elektrischer Schiebelehre ergab folgende Durchmesser der Präparate: A. renalis: 5,35 - 6,25 mm; Craniales Segment A. renalis: 4,24 - 5,07 mm; Caudales Segment A. renalis: 3,7 - 4,48 mm; A. segmentalis: 2,33 - 2,83 mm; A. lobaris 1,76 - 2,21 mm; A. interlobaris: 0,78 - 1,42 mm A. arcuata: 0,51 - 0,81 mm.

Eine genaue Zuordnung des ventralen und dorsalen Anteils der Aufzweigung des cranialen Segments der A. renalis war nicht möglich, da bei Entnahme nicht zwischen linker und rechter Niere unterschieden werden konnte. Die Durchmesser der Äste lagen aber zwischen 3,30 - 3,45 mm und 3,63 - 3,82 mm.

Die A. interlobaris kristallisierte sich mit ihrem Durchmesser zwischen 0,78 und 1,42 mm als suffizient kanülierbar heraus und stellt damit die feinste intrarenale Arterie dar, die bei radiärem Verlauf grundsätzlich auch in kleinen Gewebekeilen sicher anzutreffen ist. Auch in größeren Gewebesegmenten aber ist eine Perfusion über die A. interlobaris zur Minimierung von Leckfluss durch den umliegenden Gewebesaum, sowie zur Reduktion des Perfusatverbrauchs sinnvoll.

## 1.2. Perfundiertes Gewebe



Abbildung 18 Korrosionspräparate der Gewebekeilperfusionsen neben Korrosionspräparat einer vollständigen Schweineniere

Als **Perfusionskontrolle** wurden Korrosionspräparate der perfundierten Gewebskeile als makroskopisches Korrelat der stattgehabten Perfusion angefertigt. Diese Präparate ermöglichen Rückschlüsse auf das Ausmaß des Leckflusses der jeweiligen Perfusionen, sowie die Güte der Präparation. Weiterhin ist vor Verdauung in Kalilauge eine Berechnung des perfundierten Gewebegewichts analog zur Ermittlung mit Evans Blue möglich. Am wichtigsten aber ist der morphologische Nachweis der suffizienten Perfusion des perfundierten Areal. So kann sich Thrombosierung oder insuffizienter Perfusionsdruck durch Leakage in einer mangelnden oder ungleichmäßigen Darstellung des Gefäßsystems auf kapillärer Ebene abbilden. Die Gefäßverästelung zeigt sich dann blass und lediglich rudimentär ausgebildet (Abb. 19 (2)). Bei Größerem Leck ist auch eine Tropfenbildung beim Austritt des Harzes möglich. (Abb. 19. (1)).

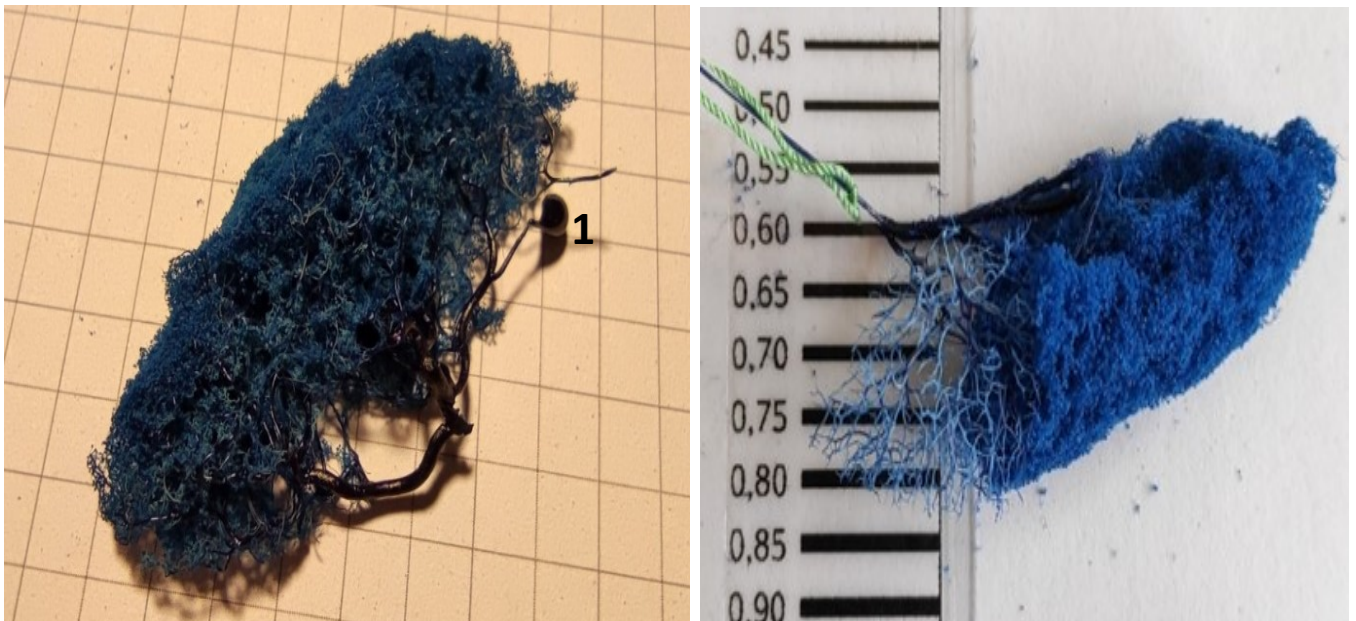


Abbildung 19 Links: Erkennbare Leakage mit Tropfenbildung (1) im Korrosionspräparat einer Nierenkeilperfusion, Rechts: Minderperfundierte blass Gefäße im Randbereich des Gewebesegments (2)

Konträr dazu stellen sich bei einer vitalen Perfusion selbst feinste Kapillaren, das glomeruläre Gefäßbett mit Vasa afferentes und efferentes, sowie die gefäßversorgenden vasa vasorum dar.

Das Dichte Bett der Glomeruli zeigt sich gut erhalten und ohne Hinweise auf Druckschädigung oder Embolie. Im Bereich der kanülierten A. interlobaris präsentiert sich das feine Kapillarnetz der gefäßversorgenden Vasa vasorum (Abb. 20. (1)).



Abbildung 20 Korrosionspräparat Nierenkeilperfusion mit erkennbaren Vasa vasorum (1). Die minderperfundierten Randareale mit deutlich blasserem Gefäßnetzwerk zeugen von Leckfluss (2)

**Minderperfundierte, blasse Areale** sind exemplarisch im Randbereich des perfundierten Areals erkennbar (Abb 20, 2). Hier ist es durch präparationsbedingte Eröffnung der Gefäße zu signifikantem Leckfluss gekommen, so dass der notwendige Perfusionsdruck zur adäquaten Darstellung des kapillaren Netzwerks nicht erreicht wurde.

Weitere Bilder angefertigter Korrosionspräparate, sowie Messungen des Kalibers der kanülierten Gefäße sind im Anhang im Detail aufgeführt. Die Maße der präparierten Gefäße befanden sich im Bereich von 0,58 bis 1,28 mm mit Durchschnittswerten von  $0,97 \pm 0,08$  mm. Die zum Teil niedrigen Kaliber zeigen, dass die flexibel Polyethylen-Kanüle nach Insertation bis in eine A. arcuata vorgeschoben werden kann.

## 2. Komplikationen früher Perfusionen und Optimierung des Systems

### 2.1. Auswahl Kanülen / Eigenwiderstand des Systems

Bereits in der Anfangsphase der Perfusionen wurden über einem Bunsenbrenner ausgezogene **Low-Density Polyethylen (LDPE) Kanülen** aufgrund der einfachen Anwendung und spannungsfreien Lage innerhalb der intrarenalen Gefäße verwendet. Im Vergleich zu Metallkanülen passen sich **flexible** Kunststoffkanülen dabei dem unvorhersehbaren Verlauf des Gefäßes im Gewebe an und können dadurch weiter und sicherer eingeführt werden. Weiterhin übertragen die elastischen Kunststoffkanülen weniger Spannung auf das kanülierte Gefäß als rigide Metallkanülen und minimieren daher das Risiko einer Okklusion des Kanülenlumens durch die anliegende Gefäßwand.

Nachteil dieser selbst hergestellter Kanülen ist eine Variabilität des Durchmessers durch den nicht standardisierten Herstellungsprozess, was zum einen die Kalibrierung des intrinsischen Widerstands des Perfusionsapparats vor jeder Perfusion erfordert, zum anderen aber auch die Replizierbarkeit erschwert. Darüber hinaus weisen die LDPE-Kanülen ein festes **Verhältnis von Innen- zu Außendurchmesser** (unbearbeitet 1,98 mm x 1,02 mm) auf, das im Vergleich zu Stahlkanülen **unvorteilhaft** erscheinen kann. Aus diesen Gründen haben wir die Verwendung verschiedener Kanülentypen erwogen und diese in einem direkten Vergleich einander gegenübergestellt. Hierbei erschien ein Außendurchmesser von 0,5 mm unabhängig des Kanülentyps als geeignete Größe, um eine A. interlobaris sicher zu kanülieren.

Hierzu wurden drei Polyethylen-Kanüle über einem Bunsenbrenner auf einen Außendurchmesser der Kanülenspitze von etwa 0,5 mm (und entsprechend einem Innendurchmesser von 0,258 mm) ausgezogen und die Spitze abgeschrägt. Diese Plastikkanülen wurden anschließend je 3 handelsüblichen Sterican-Kanülen des Hersteller Brauns eines Kalibers von 22 Gauge (Außendurchmesser 0,7 mm; Innendurchmesser 0,47 mm), bzw. 25 Gauge (AD 0,5 mm; ID 0,32 mm) gegenübergestellt. Weiterhin wurden SUS304 Kanülen (Teshima, Japan) mit extrem günstigem Verhältnis von Innen- zu Außendurchmesser (AD 0,508 mm; ID 0,4445 mm) bestellt, um die Bedeutung eines idealen Innendurchmessers zu beleuchten. Der untenstehenden Grafik kann die Abhängigkeit des Systemdrucks, sowie Widerstands der verschiedenen Kanülentypen von der Perfusatflussrate entnommen werden. Hierbei wurden die Messwerte der 3 Kanülen jeden Typs bei Perfusion mit isotonischer Kochsalzlösung unter Zugabe von 3 % Dextran 150 kDa gemittelt.

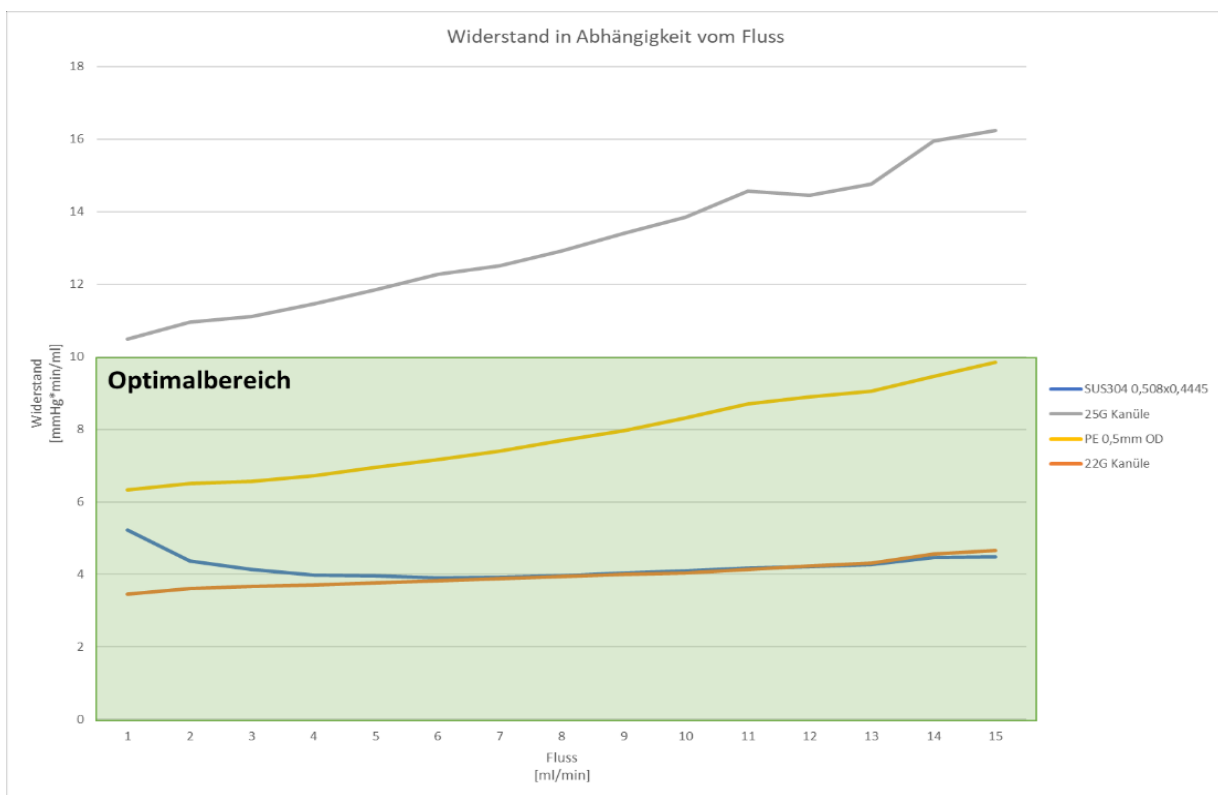
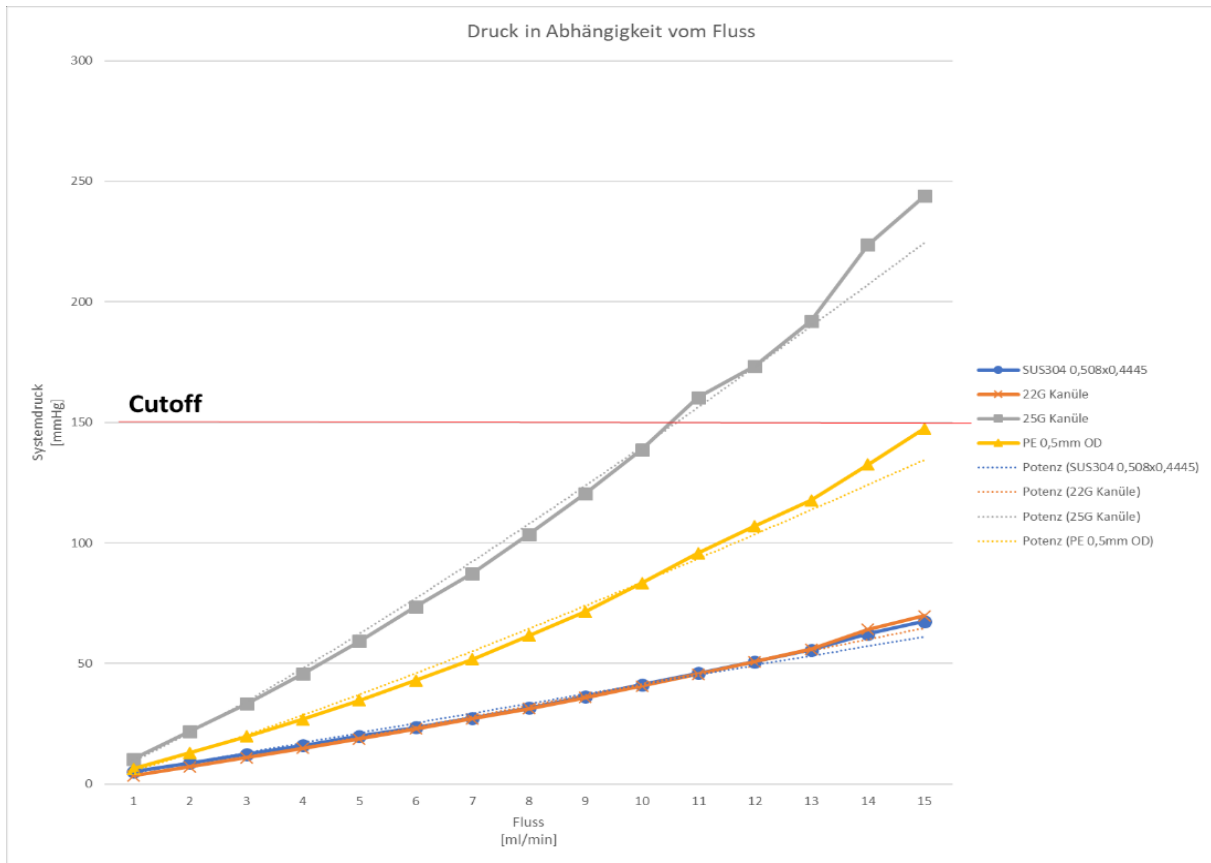


Abbildung 21 Eigenwiderstand verschiedener Kanülen im Vergleich

Grundsätzlich kann ein annähernd linearer Anstieg des Widerstands bei steigenden Flussraten festgestellt werden. Der Grafik kann weiterhin entnommen werden, dass die Sterican 22 G und SUS304 Kanüle bei vergleichbarem Innendurchmesser einen annähernd gleichen **Eigenwiderstand** aufweisen. Die 22 Gauge Kanüle schneidet dabei mit Widerstandswerten im Bereich von  $3,5 - 4,7 \frac{\text{mmHg} \cdot \text{min}}{\text{ml}}$  (im Durchschnitt  $3,98 \frac{\text{mmHg} \cdot \text{min}}{\text{ml}}$ ) je nach Flussrate etwas besser als die Spezialanfertigung mit Werten zwischen  $3,9 - 5,2 \frac{\text{mmHg} \cdot \text{min}}{\text{ml}}$  (Durchschnitt:  $4,21 \frac{\text{mmHg} \cdot \text{min}}{\text{ml}}$ ) ab. Dass die 22 Gauge Kanüle einen deutlich höheren Außendurchmesser aufweist und sich daher nur bedingt zur Kanülierung von kleinkalibrigen Gefäßen eignet, limitiert jedoch ihre Anwendung massiv.

Die 25 Gauge Kanüle hingegen charakterisiert sich zwar durch einen der SUS304 Kanüle ähnlichen Außendurchmesser, weist aber mit Abstand den höchsten Eigenwiderstand der getesteten Kanüle mit Werten im Bereich von  $10,5 - 16,2 \frac{\text{mmHg} \cdot \text{min}}{\text{ml}}$  (Mittelwert:  $13,12 \frac{\text{mmHg} \cdot \text{min}}{\text{ml}}$ ) auf. Auch die LDPE Kanülen verfügen über einen ähnlichen Außendurchmesser wie die SUS304 Kanülen, schneiden aber im Bezug auf den Eigenwiderstand besser als die 25 G Kanülen ab. Die Widerstandswerte belaufen sich bei diesem Kanülentyp im Bereich von  $6,3 - 9,8 \frac{\text{mmHg} \cdot \text{min}}{\text{ml}}$  und im Mittel  $7,83 \frac{\text{mmHg} \cdot \text{min}}{\text{ml}}$ .

Die relevanteste Information, die sich aus dem Schaubild ergibt ist der **Optimalbereich** für Perfusionen bei 100 mmHg Gefäßdruck mit bis zu  $15 \frac{\text{ml}}{\text{min}}$  Perfusatfluss, in dem alle getesteten Kanülentypen bis auf die 25 Gauge Kanüle liegen. Bei dem von uns verwendeten Druckabnehmer mit Maximaldruck von bis zu 250 mmHg ist nämlich ein Druck bis 150 mmHg, der sich alleine durch den Perfusionsapparat ergibt, möglich, um dem Zielgefäßdruck von 100mmHg gerecht zu werden. Dies entspricht einem **Widerstand** von bis zu  $10 \frac{\text{mmHg} \cdot \text{min}}{\text{ml}}$  bei einem maximalen Perfusatfluss von  $15 \frac{\text{ml}}{\text{min}}$ , der in etwa dem Maximalauswurf unserer Peristaltikpumpe entspricht. Erscheint der Widerstand der LDPE Kanüle im Vergleich mit der SUS304 oder 22 Gauge Stahlkanüle zwar unvorteilhaft, so wird doch ganz unabhängig von der Flussrate zu keinem Zeitpunkt dieser kritische Widerstand überschritten. Für unsere Verwendungszwecke ist der **Widerstand der Kunststoffkanülen** also tatsächlich vollkommen **ausreichend**. Nachteile ergeben sich lediglich im Bezug auf die geringfügig erhöhte Fehleranfälligkeit der Auswertung, da die Kanüle dennoch einen relativ größeren Anteil am gemessenen Gesamtdruck verantwortet.

Die bereits genannten Vorteile im **Handling** der Kunststoffkanülen, sowie die sicherere Kanülierung, ohne das Gefäß zu verletzen oder Spannung aufs Gefäß zu bringen überwiegen den Nachteilen aber ohne Zweifel. Aus diesen Gründen wurden für unsere Versuche ausschließlich LDPE-Kanülen mit Außendurchmesser von etwa 0,5 mm verwendet.

## 2.2. Auswahl Kolloid

Wie bereits oben geschildert wurden unsere ersten Perfusionsversuche aus Gründen der Replizierbarkeit ohne Zugabe von Kolloiden durchgeführt. Bereits früh jedoch kristallisierten sich hohe Widerstandswerte, die sich in niedrigem Perfusatfluss widerspiegeln, heraus. Die Flussrate der ersten Perfusionen belief sich dabei im Rahmen von etwa  $0,1-0,3 \frac{\text{ml}}{\text{min}}$ . Weiterhin konnte kein eindeutig reproduzierbarer Effekt der verabreichten Interventionen auf Fluss oder Reninsekretion abgeleitet werden. Diese Erkenntnis kann als Hinweis auf eine **Schädigung der rezeptorvermittelten Prozesse** der Reninsekretion gedeutet werden.

Auch bei Perfusion ohne Gabe jeglicher Interventionen zeigt sich ein ähnliches Bild (s. Abb 22) Nach einem initialen Rückgang der Reninsekretion steigt diese im weiteren Perfusionsverlauf nahezu exponentiell an. Der kontinuierliche Anstieg der Reninsekretion im Verlauf der Perfusion spricht unter Umständen für die ablaufende Gewebeschädigung bei zunehmender **Ödembildung**. Der darauffolgende Abfall kann mit der in der Grafik markierten Luftembolie, oder aber auch dem Verbrauch der Prorenin speichernden sekretorischen Vesikel zusammenhängen.

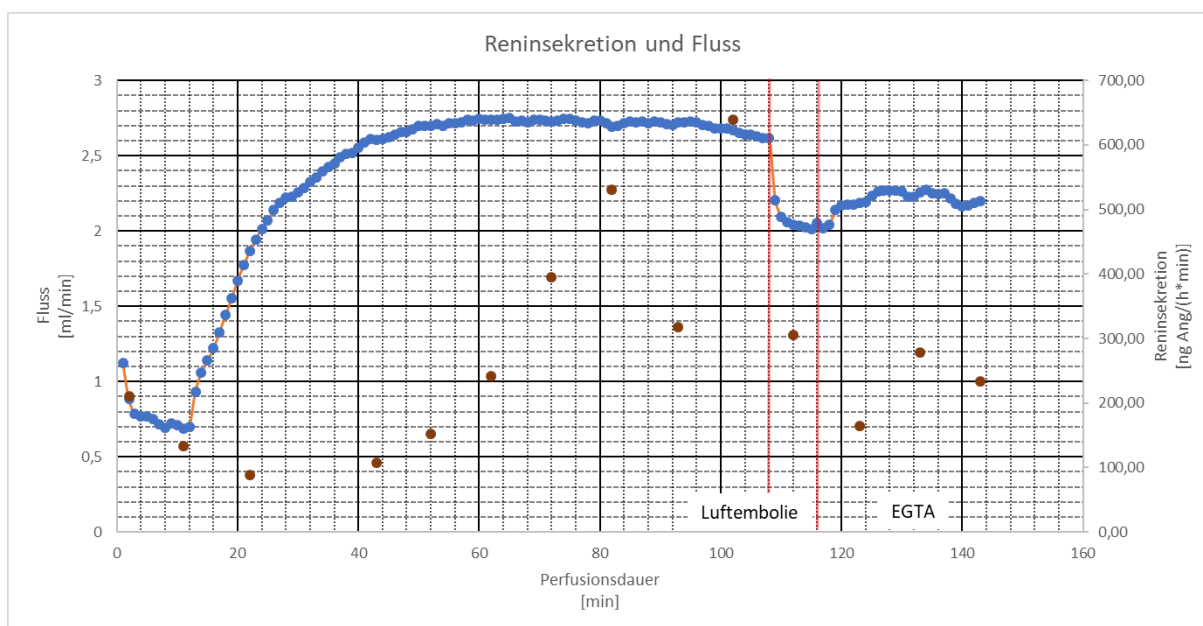


Abbildung 22 Fluss und Reninsekretion Perfusion vom 25.05.2021 16:15

Es ist also apparent, dass die Verwendung eines geeigneten Kolloids für erfolgreiche Perfusionsversuche unabdingbar ist. Da Albumin aus bereits vielfach angesprochenen Gründen für den einfachen Aufbau unseres Setups untauglich ist, wurde Dextran 150 kDa in 3% Anteil zum Perfusat gegeben. Hierunter zeigte sich schließlich eine physiologische Reaktion auf die verabreichten externen Stimuli.

### 2.3 Temperaturabhängigkeit des Perfusatflusses

Aber auch nach Zugabe von Dextran beschäftigten uns weiterhin initial hohe Widerstandswerte der Perfusionen. Neben der Schlachtung der Tiere zeigt sich im gekühlten Transport ein entscheidender Unterschied zu isoliert perfundierten Mäuse- oder Rattennieren, bei denen derartig hohe initiale Widerstände nicht beobachtet werden. Die kälteinduzierte Vasokonstriktion stellt eine hinlänglich bekannte dem Temperaturerhalt dienliche Reaktion dar. Tatsächlich konnten Temperaturmessungen über eine ins Gewebe eingebrachte Sonde eine Korrelation der Gewebetemperatur und des intrarenalen Gefäßwiderstands zeigen, wie der untenstehenden Perfusion (Abb. 23 entnommen werden kann)<sup>3</sup>

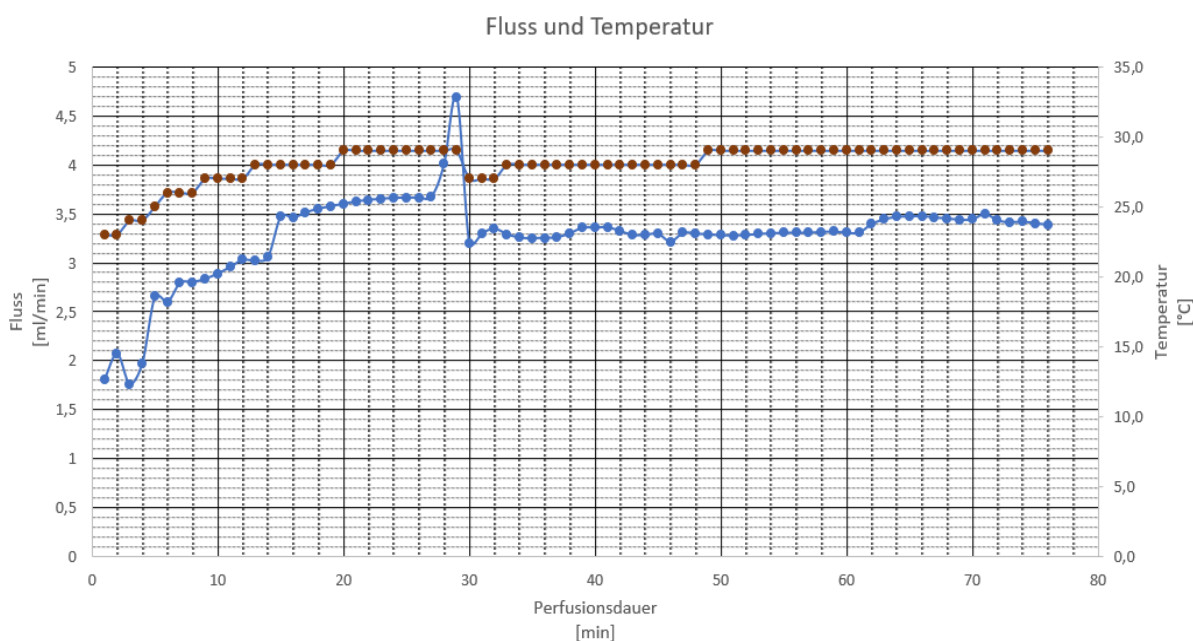


Abbildung 23 Fluss (Blau) und Temperatur (Braun); Perfusion vom 10.05.2021 14:30

Die prolongierte Lagerung des Gewebes in eisgekühlter Kochsalzlösung, viel eher aber noch die Aufwärmphase des Gewebes, in welcher der Sauerstoffverbrauch bei noch niedriger Flussrate bereits drastisch ansteigt, stellt eine potentielle Gefahr für die Vitalität der

<sup>3</sup> Anmerkung: Die Perfusion entstand vor einer Optimierung der Temperierung auf 38-40°C.

Organperfusion dar. Dazu kommen die **Risiken** die mit jeder **Hypothermie** einhergehen und von direktem Zellschaden durch Eisbildung bishin zur Entstehung freier Radikale im Rahmen des Aufwärmvorgangs bei der Reperfusion reichen. (84)

Da isolierte Organperfusionsen normalerweise unter normothermen Bedingungen ausgeführt werden, fehlen uns Daten bezüglich des Einflusses der **hypothermen Reperfusionsphase** auf die Vitalität der Perfusion, welche sowohl bei Organen von Schlachtieren, als auch bei durch Nephrektomien gewonnenen Gewebsegmenten unabdingbar ist. Um oben beschriebene Schäden durch die hypotherme Phase auszuschließen wurde auf **isoliert perfundierte Mäusenieren** zurückgegriffen. Die Organe wurden nach Präparation entsprechend des Protokolls von Schweda et al. mit Perfusat gespült und anschließend für eine Stunde in Perfusat auf Eis gelagert. Dies ermöglichte uns einen direkten Vergleich zu isoliert perfundierten Mäusenieren ohne vorherige Kühlung.

In einer Serie von 8 Perfusionsen (Abb. 24) war ein Anstieg des Perfusatflusses nach 10 nM Isoproterenolgabe, mit drastischem Rückgang des Flusses nach 1 nM Angiotensin II ( $p < 0,01$ ), sowie ein etwa 10-facher Anstieg der Reninsekretion nach Isoproterenol mit vollständigem Rückgang nach Angiotensin II ( $p < 0,05$ ) apparent. (Unveröffentlichte Daten, AG Schweda 2024).

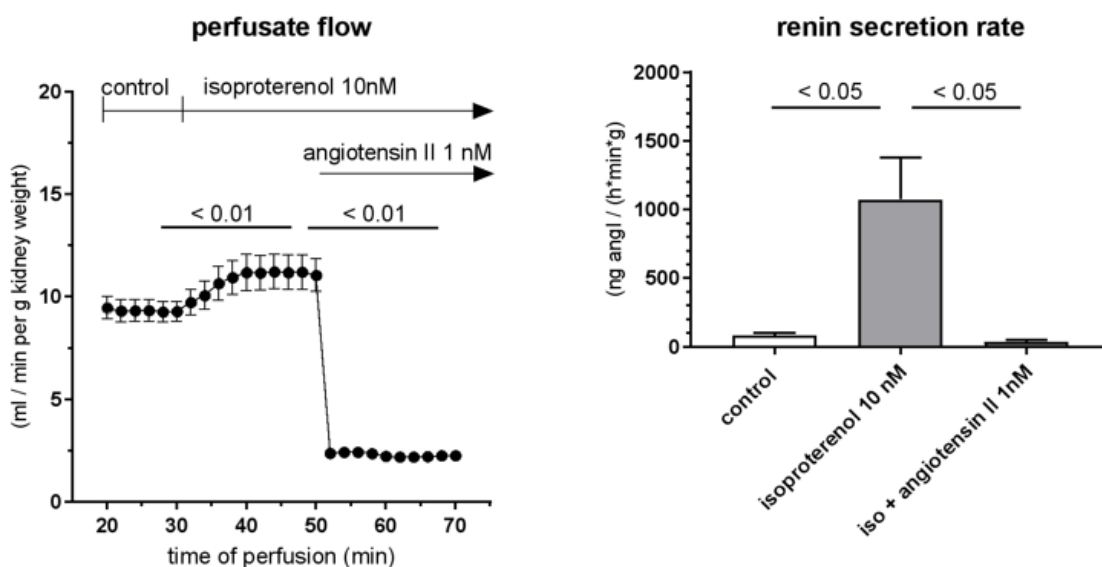


Abbildung 24 MIPK nach statischer ischämie. n=8

Diese Beobachtungen sind mit einer funktionsfähigen und entsprechend **vitalen isolierten Mäusenierenperfusion** vereinbar, was gegen signifikante auftretende Kryoschäden durch Kühlung und anschließende Reperfusion der Organe spricht. (70, 85).

### 3. Histologie

Wie bereits weiter oben angeführt wurde, ist ohne Zugabe von adäquaten Kolloiden keine funktionsfähige, vitale Perfusion aufrecht zu erhalten. Die nachfolgenden Aufnahmen zeigen daher nun den direkten Vergleich von Gewebe, das mit Dextran-haltigem Perfusat durchblutet wurde und Gewebe ohne Zugabe von kolloidosmotisch wirksamen Additiven.

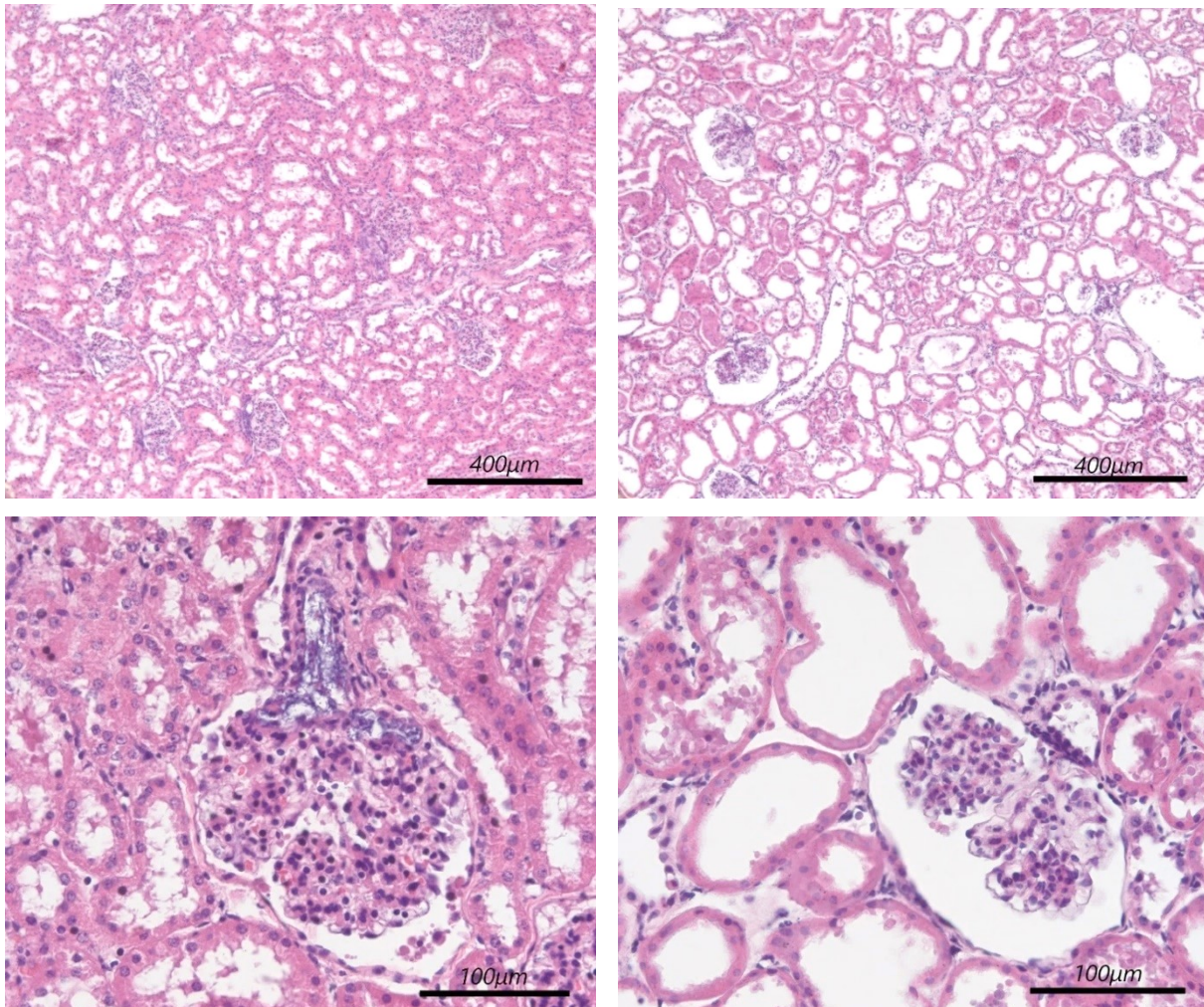


Abbildung 25 HE gefärbte Schnitte nach 115 min Perfusionen mit (rechts) und ohne Dextran (links). 10, bzw. 40 fache Vergrößerung.

Ohne Kolloid durchgeführte Perfusionen zeigten bereits makroskopisch eine Tendenz zur **intrarenalen Ödematisierung**. Entsprechend war bei der histologischen Betrachtung ein ähnliches Bild erwartet worden. Überraschenderweise zeigte sich aber schon in den Übersichtsaufnahmen ein weiterer Interzellularraum der Dextran-Perfusionen. In den Nahaufnahmen präsentierte sich eine bessere Abgrenzbarkeit der Zellgrenzen im Vergleich zu den verschwommenen Zellgrenzen der Perfusionen ohne Kolloid. Auch die Lumen der Tubuli,

sowie der Bowmanraum der kolloidperfundierten Nieren waren weiter als bei den Perfusionen ohne Dextran.

Möglicherweise stellt das weite tubuläre Lumen, sowie der Bowmanraum, ein fixationsbedingtes Artefakt dar. Da die Gewebestücke nicht mit PFA perfundiert wurden, ist eine Stabilisierung der Lumina durch Dextranretention denkbar. Auch der geweitete Interzellularraum ließe sich durch die aufgespannten Lumina, die kein Zusammensacken des Stützgewebes erlauben erklären. Andererseits aber muss bedacht werden, dass der Vorteil von länger-kettigen Dextranen wie etwa Dextran 150 kDa gerade darin besteht nur in sehr geringem Maße glomerulär filtriert zu werden und es bei integrem glomerulärem Filter eben gerade nicht in die Tubuli gelangen sollte.

#### **4. Auswertung der Reninsekretion, sowie des Gefäßwiderstands bei Gabe verschiedener Reagenzien**

Insgesamt wurden 38 Perfusionen nach 4 verschiedenen untenstehend definierten Protokollen durchgeführt. Aus den Protokollen I und II mussten 7 Perfusionen ausgeschlossen werden. Bei den weiteren Protokollen, wurden bereits Regeln zur Identifikation einer funktionsfähigen etabliert und daher keine weiteren Exklusionen vorgenommen. Detaillierte Informationen zu den ausgeschlossenen Perfusionen finden sich im Anhang. Es ergab sich keine Änderung der Kernaussage durch den Ausschluss der genannten Perfusionen.

##### **4.1. Perfusionsprotokolle**

###### **4.1.1. Protokoll I**

Das erste Protokoll bestand aus Erreichen eines Flussplateaus, 15-minütiger Gabe von 10 nM Isoproterenol, 15-minütiger Gabe von 10 nM Isoproterenol zusammen mit 1 nM Angiotensin II, 15-minütiger alleiniger Gabe von Ang II in gleichbleibender Endkonzentration, 10-minütiger Angiotensin II Recovery, sowie 10-minütiger Gabe von 3,1 mM EGTA und erneut 10-minütiger EGTA Recovery. Insgesamt wurden am 14 Perfusionen durchgeführt, von denen 10 in die finale Auswertung eingebracht wurden.

###### **4.1.2. Protokoll II**

Das zweite Protokoll setzte sich zusammen aus Erreichen eines Flussplateaus, 15-minütiger Gabe von 10  $\mu$ M SNAP, 15-minütiger SNAP Recovery, 15-minütiger Gabe von 10 nM Isoproterenol und abschließend 15-minütiger Gabe von 10nM Isoproterenol in Kombination

mit 1nM Angiotensin II. Insgesamt wurden 12 Perfusionen durchgeführt von denen 9 schlussendlich inkludiert wurden.

#### 4.1.3. Protokoll III

Das dritte Protokoll bestand aus Erreichen eines Flussplateaus, 15-minütiger Gabe von 3,1 mM EGTA, 15-minütiger EGTA Recovery, 15-minütiger Gabe von 10 nM Isoproterenol, gefolgt von 15-minütiger Gabe von 10 nM Isoproterenol in Kombination mit 1 nM Angiotensin II und abschließend erneuter Gabe von 3,1 mM EGTA über einen Zeitraum von 15 Minuten. Insgesamt wurden 4 Perfusionen am durchgeführt und in die finale Auswertung inkludiert.

#### 4.1.4. Protokoll IV

Das letzte Protokoll setzte sich zusammen aus Erreichen eines Flussplateaus, gefolgt von 15-minütiger Reduktion des Gefäßdrucks auf 40 mmHg, 15-minütiger Druck Recovery, 15-minütiger Gabe von 100  $\mu$ M Bumetanid, 15-minütiger Bumetanid Recovery und abschließend 15-minütiger Gabe von 30  $\mu$ M Acetylcholin. Insgesamt wurden 8 Perfusionen durchgeführt und in die finale Auswertung inkludiert.

### 4.2. Interventionen

Für die untenstehende Betrachtung des Effekts der verabreichten Interventionen wurde stets ein Mittelwert der letzten 3 ermittelten Fluss-, sowie Reninsekretionswerte gebildet. Sofern kein merklicher Unterschied beim Effekt der Interventionen in unterschiedlichen Perfusionsprotokollen feststellbar war, wurden die Interventionen aus verschiedenen Protokollen zur Betrachtung zusammengefasst. Als Signifikanzniveau wurde falls nicht anders genannt  $p=0,05$  angenommen.

#### 4.2.1. Isoproterenol und Recovery

Die Daten der untenstehenden Diagramme entstammen den 10 inkludierten Perfusionen aus Protokoll I. Als Kontrollwerte wurden die letzten 3 ermittelten Werte bei 15-minütiger Perfusion nach initialem Erreichen eines Flussplateaus betrachtet. Insgesamt wurden so je 10 Werte für Fluss und Reninsekretion bestimmt.

Die Flussrate steigerte sich nach Gabe von 10 nM Isoproterenol unwesentlich von  $1,41 \pm 0,27 \frac{ml/min}{g}$  auf  $1,43 \pm 0,27 \frac{ml/min}{g}$  ( $p=0,396$ ). Auch die Inklusion der Isoproterenol-Interventionen aus Protokoll II und III konnte keinen statistisch signifikanten Effekt vermitteln.

Im Gegensatz dazu bewirkte Isoproterenol eine deutliche Stimulation der Reninsekretion von  $76,27 \pm 24,73 \frac{ng\ Ang}{h*min*g}$  auf  $208,91 \pm 74,70 \frac{ng\ Ang}{h*min*g}$ . Die statistische Signifikanz war mit  $p=0,028$  gegeben. Unter Inklusion der Interventionen aus Protokoll II und III waren die Ergebnisse weiterhin statistisch signifikant.

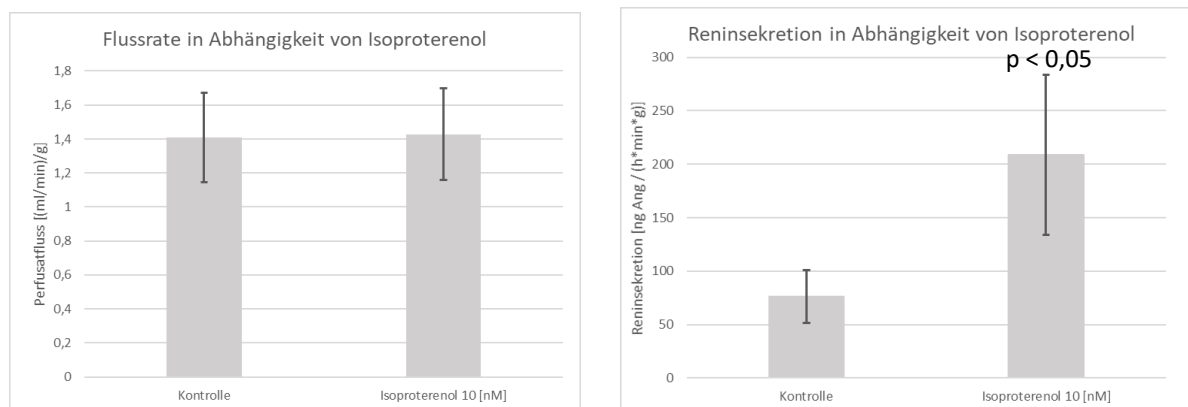


Abbildung 26 Effekt der Isoproterenol-Gabe auf Flussrate und Reninsekretion

Die Daten zur Isoproterenol Recovery wurden vollständig Protokoll I entnommen. Insgesamt konnten dabei 8 Perfusionen berücksichtigt werden. Als Kontrollwerte für die Isoproterenol Recovery wurden die die letzten vor der Intervention bestimmten Werte unter simultaner Gabe von 10 nM Isoproterenol und 1 nM Angiotensin II verwendet. Angiotensin II wurde während der Isoproterenol-Recovery weiterhin verabreicht.

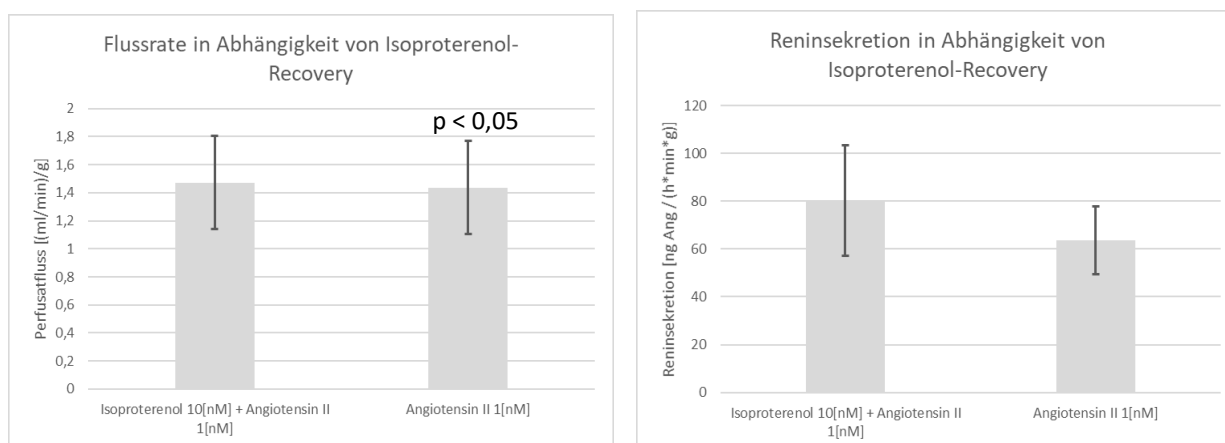


Abbildung 27 Effekt der Isoproterenol-Recovery auf Flussrate und Reninsekretion

Unter **Recovery von Isoproterenol** zeigte sich ein statistisch signifikanter ( $p=0,021$ ) Rückgang des Perfusatflusses von  $1,47 \pm 0,33 \frac{ml}{min}$  auf  $1,43 \pm 0,33 \frac{ml}{min}$ .

Die Recovery von Isoproterenol bewirkte weiterhin einen Rückgang der Reninsekretion von  $80,25 \pm 23,05 \frac{\text{ng Ang}}{\text{h} \cdot \text{min} \cdot \text{g}}$  auf  $63,61 \pm 14,27 \frac{\text{ng Ang}}{\text{h} \cdot \text{min} \cdot \text{g}}$ . Eine statistische Signifikanz war hierbei nicht nachweisbar ( $p=0,273$ ).

#### 4.2.2. Ang II und Recovery

Die Daten der folgenden Diagramme wurden den Protokollen I, II und III entnommen. Um den Effekt von Angiotensin zu zeigen wurden als Kontrollwerte hierbei stets die Flussrate und Reninsekretion nach Gabe von Isoproterenol als Prästimulation betrachtet. Entsprechend erfolgte unter der Angiotensin II Gabe weiterhin die Gabe von 10 nM Isoproterenol. Insgesamt konnten je 22 Werte für Perfusatfluss, sowie Reninsekretion inkludiert werden.

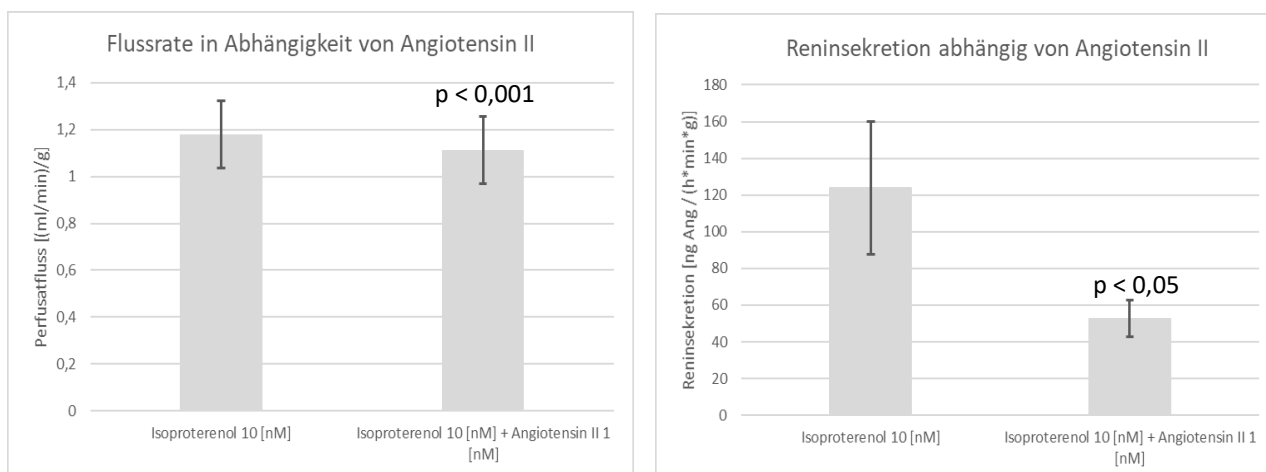


Abbildung 28 Effekt der Angiotensin II-Gabe auf Flussrate und Reninsekretion

Die Gabe von 1 nM **Angiotensin II** bewirkte eine deutliche Vasokonstriktion mit Rückgang des Perfusatflusses von  $1,18 \pm 0,14 \frac{\text{ml/min}}{\text{g}}$  auf  $1,11 \pm 0,14 \frac{\text{ml/min}}{\text{g}}$ . Eine statistische Signifikanz war mit  $p = 2,11 \cdot 10^{-7}$  gegeben.

Auch auf die Reninsekretion konnte ein deutlicher Einfluss durch Angiotensin II nachgewiesen werden. Hier zeigte sich unter der Intervention eine Inhibition der Sekretion von  $123,90 \pm 36,38 \frac{\text{ng Ang}}{\text{h} \cdot \text{min} \cdot \text{g}}$  auf  $52,54 \pm 9,97 \frac{\text{ng Ang}}{\text{h} \cdot \text{min} \cdot \text{g}}$ . Die statistische Signifikanz war mit  $p=0,016$  ebenfalls gegeben.

Eine **Angiotensin II - Recovery** war lediglich in den Perfusionen des ersten Protokolls erfolgt. Als Kontrollwert wurde hierbei die alleinige Gabe von Angiotensin II betrachtet. Insgesamt konnten 8 Perfusionen inkludiert werden.

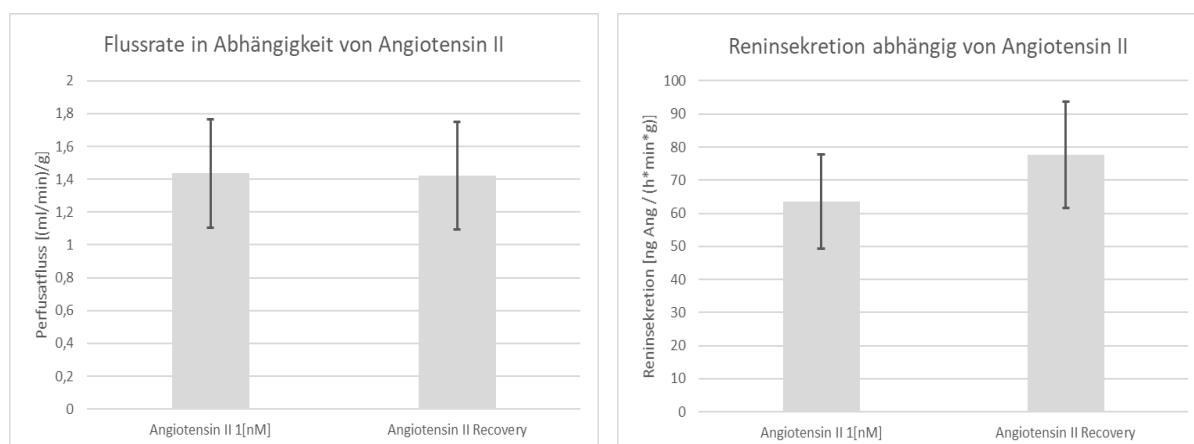


Abbildung 29 Effekt der Angiotensin II - Recovery auf Flussrate und Reninsekretion

Es wurde eine nichtsignifikante ( $p=0,149$ ) Abnahme der Flussrate von  $1,44 \pm 0,33 \frac{\text{ml/min}}{\text{g}}$  auf  $1,42 \pm 0,33 \frac{\text{ml/min}}{\text{g}}$  beobachtet.

Ein ähnlicher Sachverhalt wurde für den Effekt auf die Reninsekretion beobachtet. Hier kam es unter Recovery zur Zunahme der Reninsekretion von  $63,61 \pm 14,27 \frac{\text{ng Ang}}{\text{h*min*g}}$  auf  $77,63 \pm 16,04 \frac{\text{ng Ang}}{\text{h*min*g}}$ . Eine statistische Signifikanz war mit  $p=0,246$  nicht feststellbar.

#### 4.2.3. EGTA und Recovery

Die inkludierten Daten der untenstehenden Graphik rekrutieren sich aus Protokoll III. Als Kontrollwerte wurden die letzten 3 ermittelten Werte bei 15-minütiger Perfusion nach initialem Erreichen eines Flussplateaus betrachtet. Insgesamt konnten so lediglich 3 Perfusionsen für Fluss und Reninsekretion inkludiert werden.

Entsprechend zeigte sich unter Gabe von 3,1 mM EGTA keine statistisch signifikante Reaktion des Perfusatflusses ( $p=0,366$ ). Die Flussrate veränderte sich nur unwesentlich von  $1,25 \pm 0,31 \frac{\text{ml/min}}{\text{g}}$  auf  $1,26 \pm 0,40 \frac{\text{ml/min}}{\text{g}}$ . Dieses Ergebnis ist neben der geringen Perfusionsanzahl ohne Zweifel auch einer ausgeprägten Varianz der Ergebnisse von 0,56 bis  $1,94 \frac{\text{ml/min}}{\text{g}}$  vor, sowie 0,57 bis  $1,94 \frac{\text{ml/min}}{\text{g}}$  nach Intervention geschuldet. Eine Inklusion der EGTA-Interventionen des Protokolls I ( $n=15$ ) führte zu einer statistisch signifikanten ( $p=0,0009$ ) Vasodilatation mit Anstieg des Perfusatflusses von  $1,28 \pm 0,20 \frac{\text{ml/min}}{\text{g}}$  auf  $1,32 \pm 0,20 \frac{\text{ml/min}}{\text{g}}$ .

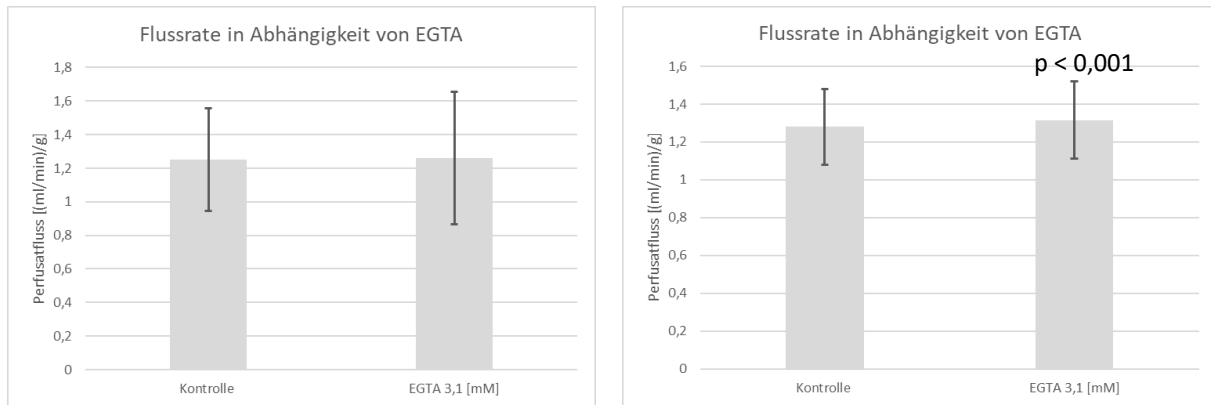


Abbildung 30 Effekt der EGTA-Gabe auf Flussrate. Protokoll III (links) vs Protokoll I + III (rechts)

Ein ähnliches Bild zeichnete sich unter isolierter Betrachtung des Effekts von EGTA auf die Reninsekretion der Perfusionen des Protokolls III. Hier kommt es durch die Intervention zu einem Anstieg der Reninsekretion von  $42,92 \pm 8,46 \frac{\text{ng Ang}}{\text{h} \cdot \text{min} \cdot \text{g}}$  auf  $166,05 \pm 80,61 \frac{\text{ng Ang}}{\text{h} \cdot \text{min} \cdot \text{g}}$ . Trotz klar erkennbarer Tendenz war bei einer Varianz im Bereich von 27,05 bis  $55,88 \frac{\text{ng/h}}{\text{g}}$  vor Gabe von EGTA, sowie 72,16 bis  $326,49 \frac{\text{ng Ang}}{\text{h} \cdot \text{min} \cdot \text{g}}$  nach EGTA-Gabe und lediglich 3 inkludierten Perfusionen, keine statistische Signifikanz gegeben ( $p=0,265$ ). Unter Inklusion der Perfusionen aus Protokoll I wiederum war die statistische Signifikanz mit  $p = 0,009$  gegeben. Hier kam es durch die Intervention zu einem Anstieg der Reninsekretion von  $58,51 \pm 10,10 \frac{\text{ng Ang}}{\text{h} \cdot \text{min} \cdot \text{g}}$  auf  $176,48 \pm 45,33 \frac{\text{ng Ang}}{\text{h} \cdot \text{min} \cdot \text{g}}$ .

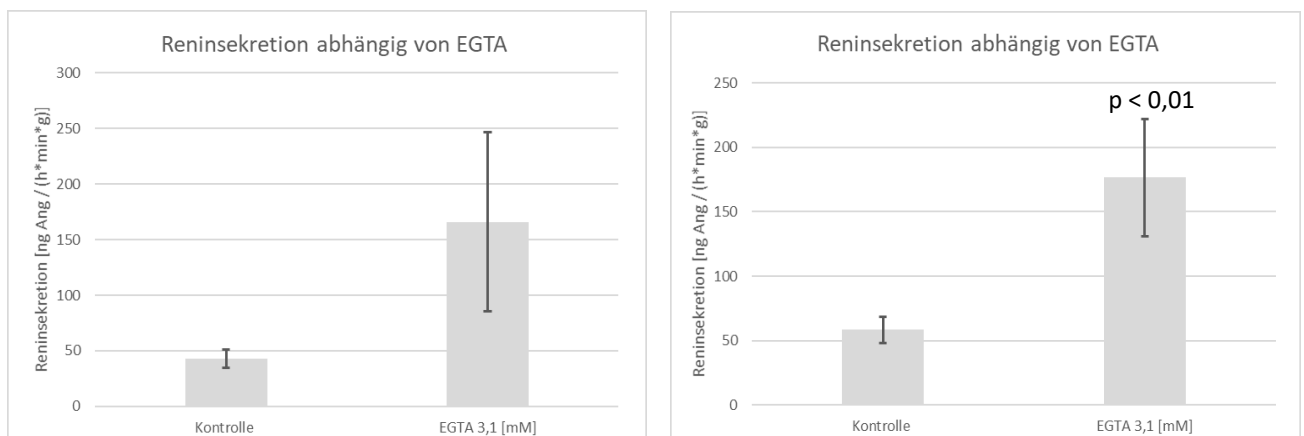


Abbildung 31 Effekt der EGTA-Gabe auf die Reninsekretion. Protokoll III (links) vs Protokoll I + III (rechts)

Als Kontrollwert für die Recovery von EGTA wurden die letzten erhobenen Werte unter Gabe von EGTA angenommen. Insgesamt konnten so je 11 Perfusionen aus Protokoll I und III zur Betrachtung der Reninsekretion und des Perfusatflusses inkludiert werden.

Die **Recovery von EGTA** führt zum Rückgang des Perfusatflusses von  $1,40 \pm 0,26 \frac{\text{ml/min}}{\text{g}}$  auf  $1,36 \pm 0,25 \frac{\text{ml/min}}{\text{g}}$ . Eine statistische Signifikanz war mit  $p=0,043$  feststellbar.

Auch für die Reninsekretion konnte ein statistisch signifikanter ( $p=0,019$ ) Effekt der EGTA-Recovery gezeigt werden. Hier konnte ein Rückgang der Sekretion von  $203,26 \pm 60,06 \frac{\text{ng Ang}}{\text{h*min*g}}$  auf  $65,21 \pm 15,77 \frac{\text{ng Ang}}{\text{h*min*g}}$  beobachtet werden.

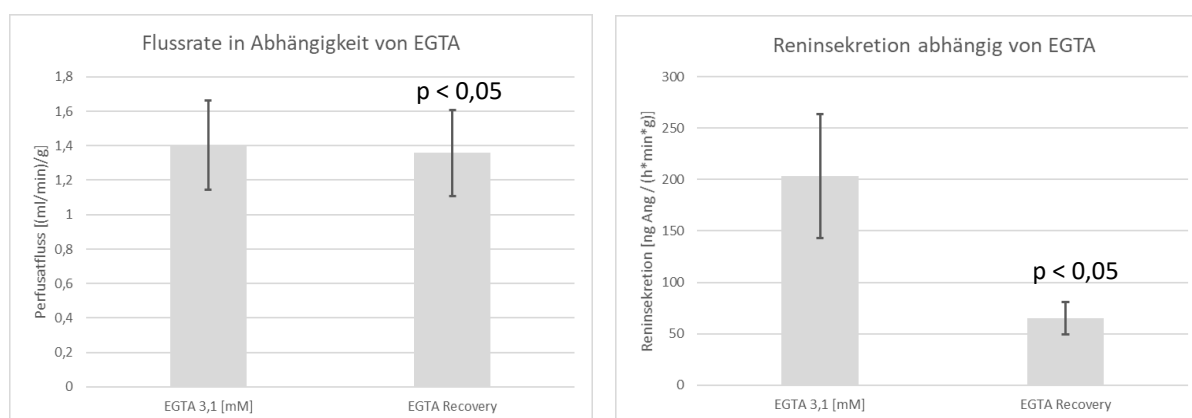


Abbildung 32 Effekt der EGTA-Recovery auf Flussrate und Reninsekretion

Eine gesonderte Betrachtung muss dem Effekt der EGTA-Gabe direkt nach Angiotensin II in 4 Perfusionen des Protokolls III zuteil werden. Diese wurden nicht in die obenstehende Auswertung inkludiert. Als Kontrollwert wurden hierbei die letzten erhobenen Werte unter vorgegangener Angiotensin II – Gabe, sowie entsprechend simultaner Gabe von Isoproterenol betrachtet. Es wurden keine Exklusionen vorgenommen.

Die Gabe von 3,1 mM EGTA unmittelbar nach Gabe von 1 nM Angiotensin II führte zu einem Anstieg des Perfusatflusses von  $1,02 \pm 0,30 \frac{\text{ml/min}}{\text{g}}$  auf  $1,08 \pm 0,29 \frac{\text{ml/min}}{\text{g}}$ . Eine statistische Signifikanz war ob der geringen Anzahl an Perfusionen nicht gegeben ( $p=0,075$ ), die Tendenz jedoch klar erkennbar.

Im Gegensatz dazu konnte ein statistisch signifikanter Effekt auf die Reninsekretion ( $p=0,036$ ) gezeigt werden. Hier führte die Gabe von **EGTA nach Angiotensin II** zu einer Stimulation der Reninsekretion von  $31,96 \pm 3,05 \frac{\text{ng Ang}}{\text{h} \cdot \text{min} \cdot \text{g}}$  auf  $102,84 \pm 20,65 \frac{\text{ng Ang}}{\text{h} \cdot \text{min} \cdot \text{g}}$ .

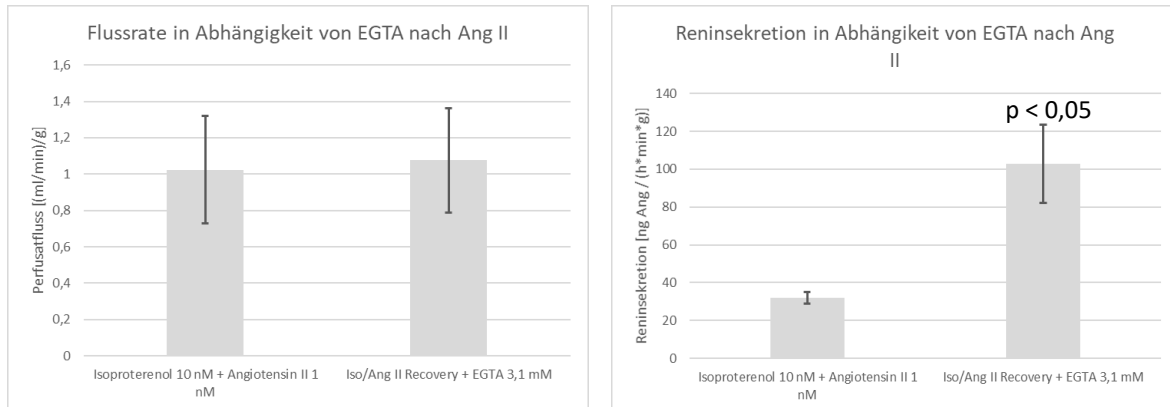


Abbildung 33 Effekt der Gabe von EGTA direkt nach Ang II auf Flussrate und Reninsekretion

#### 4.2.4. SNAP und Recovery

Die inkludierten Daten für die unten beigefügten Diagramme rekrutierten sich komplett aus Protokoll II. Als Kontrollwerte wurden die letzten ermittelten Werte des Flussplateaus vor Gabe von SNAP betrachtet. Insgesamt wurden so 9 Perfusionen zur Betrachtung des Effekts von SNAP auf Perfusatfluss, sowie Reninsekretion inkludiert.

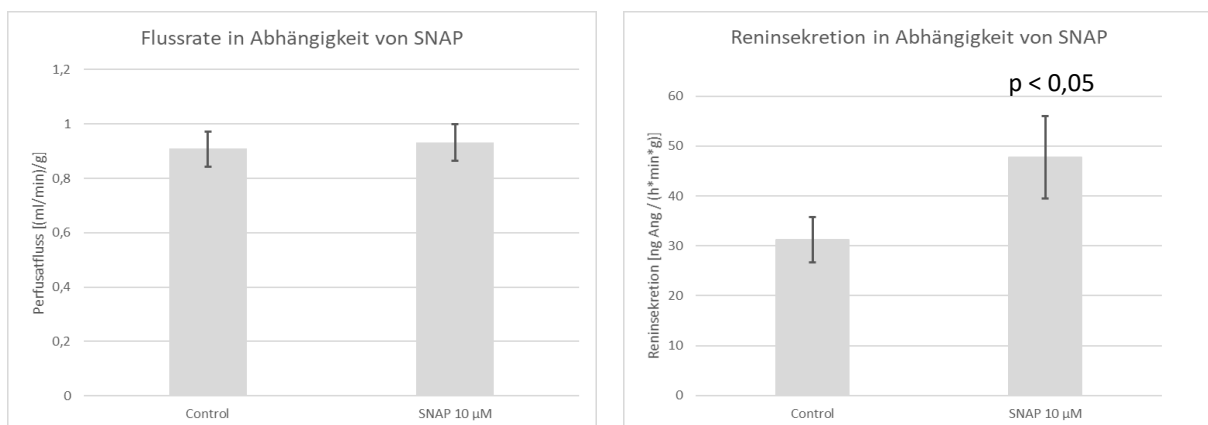


Abbildung 34 Effekt der SNAP-Gabe auf Perfusatfluss und Reninsekretion

Die Gabe von  $10 \mu\text{M}$  des direkten NO-Donors **SNAP** führte zu einem Anstieg des Perfusatflusses von  $0,91 \pm 0,06 \frac{\text{ml/min}}{\text{g}}$  auf  $0,93 \pm 0,07 \frac{\text{ml/min}}{\text{g}}$ . Eine statistische Signifikanz war dabei jedoch nicht feststellbar ( $p=0,207$ ).

Deutlicher fiel der Effekt von SNAP auf die Reninsekretion aus. Hier konnte eine Stimulation der Sekretion von  $31,17 \pm 4,52 \frac{\text{ng Ang}}{\text{h} \cdot \text{min} \cdot \text{g}}$  auf  $47,77 \pm 8,27 \frac{\text{ng Ang}}{\text{h} \cdot \text{min} \cdot \text{g}}$  verzeichnet werden. Die statistische Signifikanz war mit  $p=0,022$  gegeben.

Auch für die **SNAP-Recovery** konnten 9 Perfusionen zur Betrachtung des Effekts auf Perfusatfluss, sowie Reninsekretion inkludiert werden. Wie auch bei SNAP-Gabe rekrutierten sich diese Daten vollständig aus Protokoll II. Als Kontrollwert wurden stets die letzten ermittelten Werte unter SNAP-Gabe betrachtet.

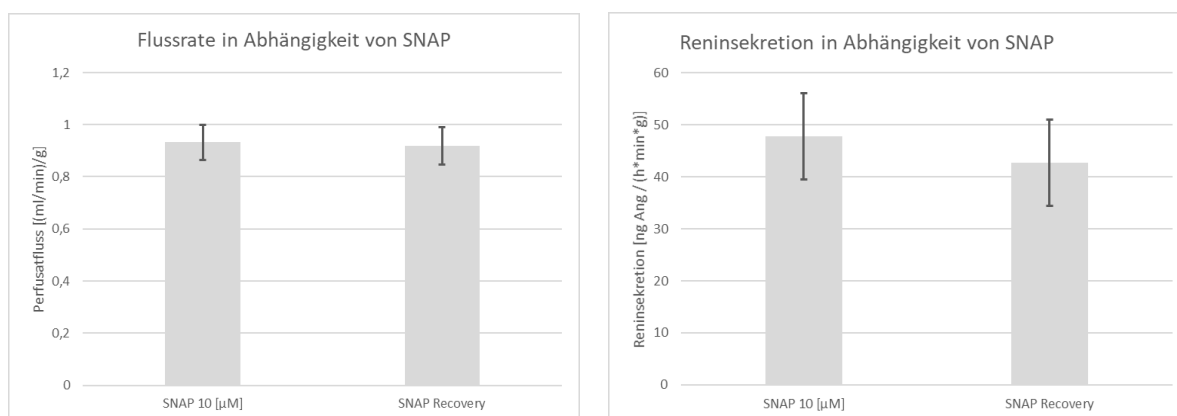


Abbildung 35 Effekt der SNAP-Recovery auf Perfusatfluss und Reninsekretion

SNAP- Recovery führte zu keinem wesentlichen Effekt auf den Perfusatfluss mit Flussrate von  $0,93 \pm 0,07 \frac{\text{ml/min}}{\text{g}}$  vor, sowie  $0,92 \pm 0,07 \frac{\text{ml/min}}{\text{g}}$  nach Gabe der Intervention. Eine statistische Signifikanz war entsprechend nicht feststellbar ( $p=0,217$ ). Auch auf die Reninsekretion ließ sich kein statistisch signifikanter Effekt beobachten ( $p=0,160$ ). Hier führte SNAP-Recovery zu einem Rückgang von  $47,77 \pm 8,27 \frac{\text{ng Ang}}{\text{h} \cdot \text{min} \cdot \text{g}}$  auf  $42,77 \pm 8,31 \frac{\text{ng Ang}}{\text{h} \cdot \text{min} \cdot \text{g}}$ .

#### 4.2.5. Acetylcholin

Die folgenden Daten zum Effekt von  $30 \mu\text{M}$  Acetylcholin wurden vollständig Perfusionen des Protokolls IV entnommen. Es wurden keine Exklusionen vorgenommen, aufgrund von Perfusatmangel musste die letzte Perfusion jedoch vorzeitig abgebrochen werden, so dass insgesamt je 7 Perfusionen eine Betrachtung des Flusses, sowie der Reninsekretion zuteil werden konnte. Als Kontrollwerte wurden die letzten erfassten Werte nach Bumetanid Recovery betrachtet.

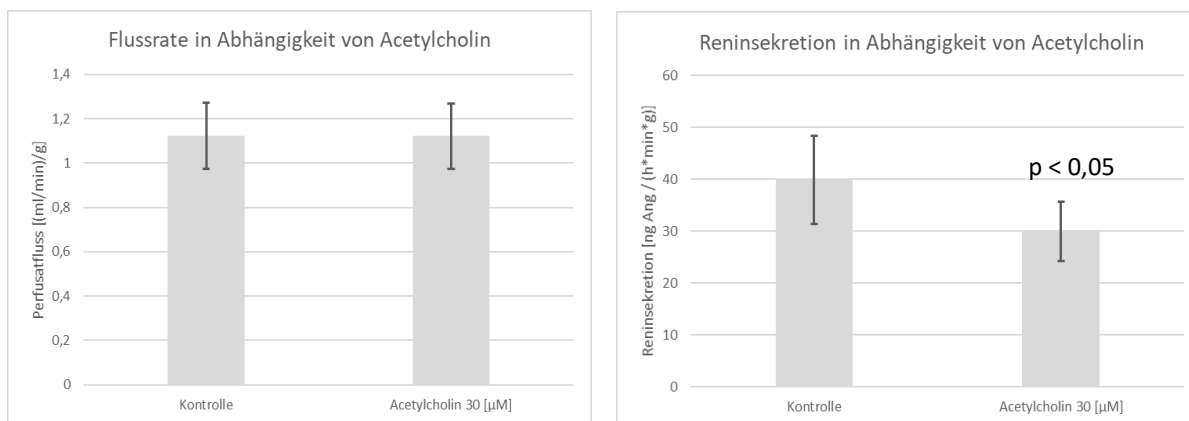


Abbildung 36 Effekt der Acetylcholin-Gabe auf Perfusatfluss und Reninsekretion

Im Gegensatz zum direkten NO-Donor SNAP handelt es sich bei Acetylcholin um einen indirekt vermittelten Mechanismus, der zu einem Anstieg der NO-Konzentration führt. Es war kein Effekt von Acetylcholin auf den Perfusatfluss feststellbar. Die Flussrate blieb unverändert bei  $1,12 \pm 0,15 \frac{\text{ml/min}}{\text{g}}$ . Eine statistische Signifikanz ( $p=0,789$ ) war nicht feststellbar.

Die Gabe von **Acetylcholin** führte zu einem Rückgang der Reninsekretion von  $39,81 \pm 8,49 \frac{\text{ng Ang}}{\text{h*min*g}}$  auf  $29,92 \pm 5,65 \frac{\text{ng Ang}}{\text{h*min*g}}$ . Eine statistische Signifikanz war mit  $p=0,041$  feststellbar.

#### 4.2.6. Bumetanid und Recovery

Die Daten der untenstehenden Diagramme entstammen vollständig Perfusionen des Protokolls IV. Es wurden keine Exklusionen vorgenommen, so dass insgesamt 8 Perfusionen betrachtet werden konnten. Als Kontrollwert wurden die jeweils letzten bestimmten Werte nach Recovery des Perfusionsdrucks auf 100mmHg betrachtet.

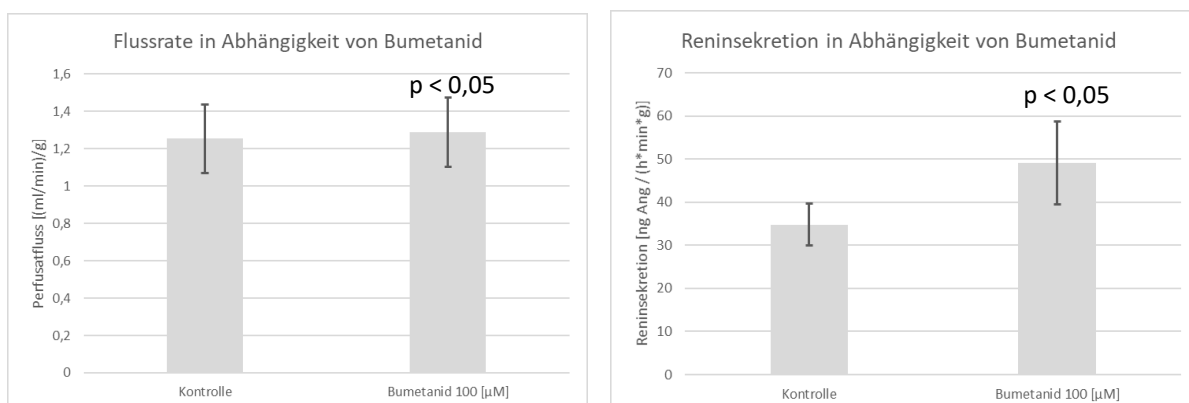


Abbildung 37 Effekt der Gabe von Bumetanid auf Flussrate und Reninsekretion

Die Gabe von 100 µM **Bumetanid** führte zu einer statistisch signifikanten ( $p=0,024$ ) Vasodilatation mit Anstieg des Perfusatflusses von  $1,26 \pm 0,18 \frac{\text{ml/min}}{\text{g}}$  auf  $1,29 \pm 0,19 \frac{\text{ml/min}}{\text{g}}$ .

Ebenso konnte ein statistisch signifikanter Effekt ( $p=0,045$ ) auf die Reninsekretion festgestellt werden. Hier führte die Gabe des Diuretikums zu einem Anstieg von  $34,74 \pm 4,86 \frac{ng\ Ang}{h*min*g}$  auf  $49,05 \pm 9,62 \frac{ng\ Ang}{h*min*g}$ .

Diese Datenlage konnte Vice-Versa auch für die **Recovery von Bumetanid** repliziert werden. Hier flossen jedoch aufgrund eines Mangels an Perfusat nur 7 Perfusionen ein, da die letzte Perfusion am 06.10.2021 vor Bumetanid-Recovery abgebrochen werden musste.

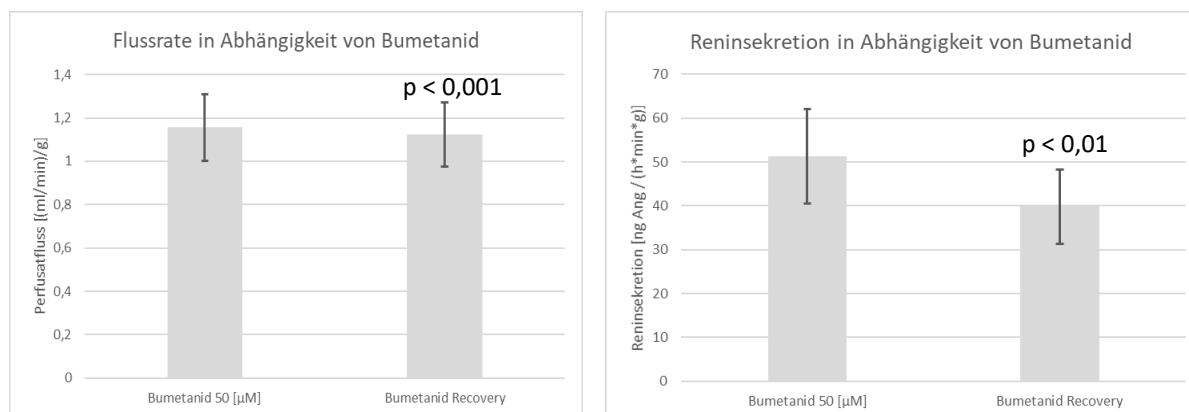


Abbildung 38 Effekt der Bumetanid-Recovery auf Flussrate und Reninsekretion

Unter Recovery von Bumetanid konnte ein statistisch signifikanter ( $p= 0,0009$ ) Rückgang des Perfusatflusses von  $1,16 \pm 0,15 \frac{ml/min}{g}$  auf  $1,12 \pm 0,15 \frac{ml/min}{g}$  verzeichnet werden.

Weiterhin konnte ein ebenso statistisch signifikanter ( $p= 0,007$ ) Rückgang der Reninsekretion von  $51,30 \pm 10,81 \frac{ng\ Ang}{h*min*g}$  auf  $39,81 \pm 8,49 \frac{ng\ Ang}{h*min*g}$  demonstriert werden.

#### 4.2.7. Perfusionsdruck und Recovery

Wie bereits die letztgenannten Interventionen stammen auch die untenstehenden Daten zum Effekt des Perfusionsdrucks auf Fluss und Reninsekretion vollständig Protokoll IV. Es wurden keine Exklusionen vorgenommen, so dass insgesamt 8 Perfusionen einfließen konnten. Als Kontrollwerte wurden die letzten ermittelten Werte vor Anpassung des Perfusionsdruck angenommen. Da der eigentlicher physiologische Effekt des veränderten Perfusionsdrucks auf den Fluss im Sinne einer reflektorischen Vasokonstriktion erst in der Recovery bei normalisierten Flusswerten sichtbar wird, wurde für eine nuanciertere Betrachtung des Effekts auf den Perfusatfluss die Betrachtung des Flusses nicht zum Ende der Intervention vorgenommen - bei der der Fluss durch den reduzierten Perfusionsdruck artifiziell drastisch

reduziert ist -sondern in den ersten 3 Minuten der nachfolgenden Recovery. Eine Betrachtung des Gefäßwiderstands, hätte zwar eine Betrachtung während der Intervention ermöglicht, aber die einheitliche Darstellung der Ergebnisse untergraben, zumal der Systemwiderstand auch einer gewissen Abhängigkeit von der Flussrate unterworfen ist und eine Betrachtung des Widerstands somit eher verfälscht sein kann, als die letztlich untersuchte Flussrate nach Recovery.

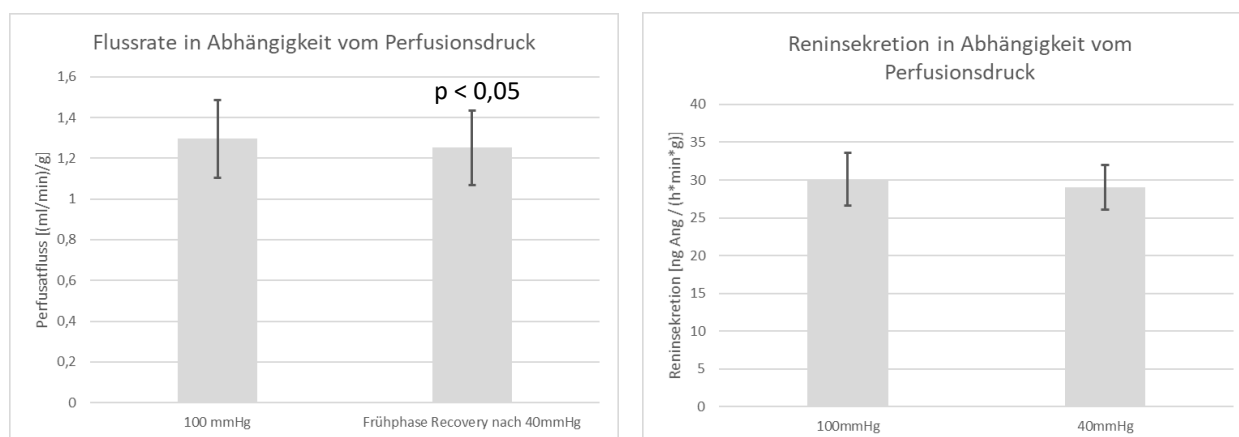


Abbildung 39 Effekt der Reduktion des Perfusionsdrucks auf Flussrate und Reninsekretion

Eine **Reduktion des Perfusionsdrucks** von 100 auf 40 mmHg führte zu einer statistisch signifikanten ( $p=0,048$ ) Vasokonstriktion in der Frühphase der Recovery. Hier war ein Rückgang des Perfusatflusses von  $1,30 \pm 0,19 \frac{\text{ml/min}}{\text{g}}$  auf  $1,25 \pm 0,18 \frac{\text{ml/min}}{\text{g}}$  zu beobachten.

Die Reduktion des Perfusionsdrucks zeigte keinen statistisch signifikanten Effekt auf die Reninsekretion ( $p=0,643$ ). Hier wurde lediglich ein unerheblicher Rückgang der Reninsekretion von  $30,11 \pm 3,53 \frac{\text{ng Ang}}{\text{h*min*g}}$  auf  $29,03 \pm 2,90 \frac{\text{ng Ang}}{\text{h*min*g}}$  beobachtet.

Für die Betrachtung des Effekts der Recovery des Perfusionsdrucks von 40mmHg auf 100mmHg wurde als Kontrollwert für den Fluss die Frühphase der Recovery betrachtet, während für die Reninsekretion die letzten ermittelten Werte unter 40mmHg Druck gewählt wurden.

**Die Recovery des Drucks** zeigte unter so definierten Kriterien keine statistisch signifikante Wirkung auf die Flussrate ( $p=0,657$ ). Es konnte lediglich eine unwesentliche Zunahme des Flusses von  $1,25 \pm 0,18 \frac{\text{ml/min}}{\text{g}}$  auf  $1,26 \pm 0,18 \frac{\text{ml/min}}{\text{g}}$  verzeichnet werden.

Auch für die Reninsekretion war keine statistische Signifikanz nachweisbar ( $p=0,192$ ). Hier

konnte lediglich eine geringe Zunahme der Reninsekretion von  $29,03 \pm 2,90 \frac{\text{ng Ang}}{\text{h} \cdot \text{min} \cdot \text{g}}$  auf  $34,74 \pm 4,86 \frac{\text{ng Ang}}{\text{h} \cdot \text{min} \cdot \text{g}}$  gezeigt werden.

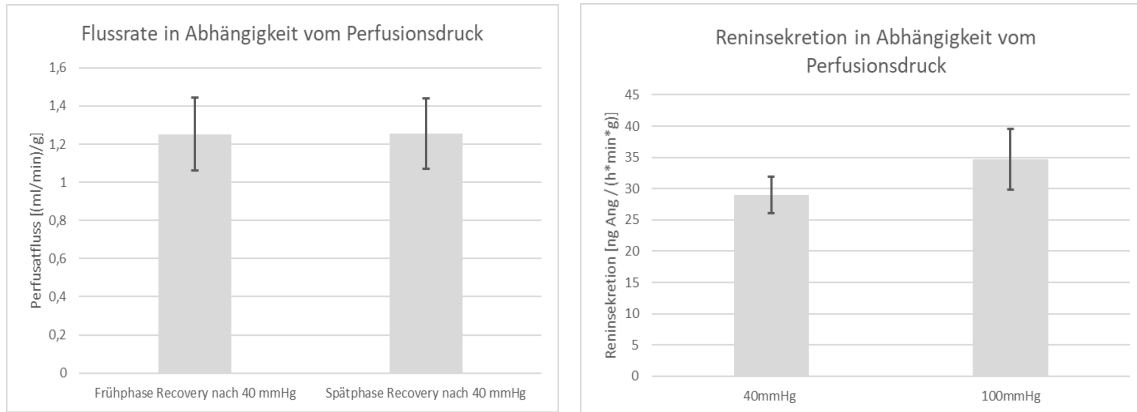


Abbildung 40 Effekt der Perfusionsdruck-Recovery auf Flussrate und Reninsekretion

## IV. Diskussion

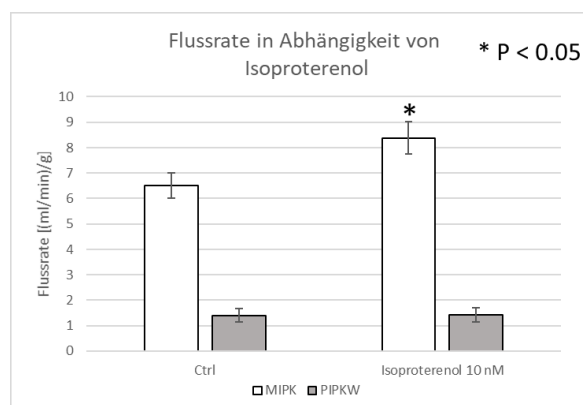
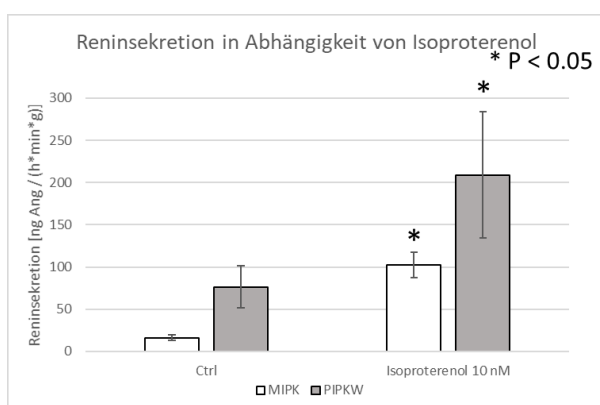
### 1. Interpretation des Effekts einzelner Interventionen auf Fluss und Reninsekretion, sowie Vergleich mit isolated perfused Mouse Kidney

Im folgenden Abschnitt werden die im Hauptteil beschriebenen Effekte der verschiedenen Interventionen vergleichbaren Versuchen an isoliert perfundierten Mäusenieren (IPMK), oder im Fall von Acetylcholin isoliert perfundierten Rattennieren (IPRK) gegenüber gestellt. Im Weiteren werden die isolierten Schweinenierenperfusionen als IPPKS (isolated perfused pig kidney segments) bezeichnet. Um eine bestmögliche Übertragbarkeit der Ergebnisse gewährleisten zu können wurde auf veröffentlichte, sowie teils unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe Schweda zurückgegriffen. Auch bei den IPMK/IPRK Perfusionen wurden die letzten 3 ermittelten Reninwerte jeder Intervention gemittelt und den letzten 3 gemittelten Werten der vorhergegangenen Intervention, bzw. der Kontrolle, gegenübergestellt.

#### 1.1. Isoproterenol

Sowohl bei IPPKS als auch IPMK ist der Gabe von 10 nM Isoproterenol eine 15-minütige Kontrollphase vorangegangen. Insgesamt zeigten sich bei den 10 IPPKS-Perfusionen ein deutlicher Anstieg der Reninsekretion um über 170% ( $76,27 \pm 24,73 \frac{ng\ Ang}{h*min*g}$  auf  $208,91 \pm 74,70 \frac{ng\ Ang}{h*min*g}$ ;  $p=0,028$ ), sowie ein insignifikanter Anstieg des Perfusatflusses von  $1,41 \pm 0,27 \frac{ml/min}{g}$  auf  $1,43 \pm 0,27 \frac{ml/min}{g}$  nach Applikation des direkten Beta-Agonisten.

Im Vergleich dazu ergab sich aus 5 durchgeführten IPMK-Perfusionen ein etwa 3-fach stärkerer Anstieg der Reninsekretion von 530% des Kontrollwerts ( $16,27 \pm 3,23 \frac{ng\ Ang}{h*min*g}$  auf  $102,50 \pm 15,23 \frac{ng\ Ang}{h*min*g}$ ;  $p < 0,05$ ). Weiterhin zeigte die IPMK einen signifikanten Anstieg der Perfusatsflussrate von annähernd 30% ( $6,5 \pm 0,5 \frac{ml/min}{g}$  auf  $8,38 \pm 0,64 \frac{ml/min}{g}$ ;  $p < 0,05$ ).



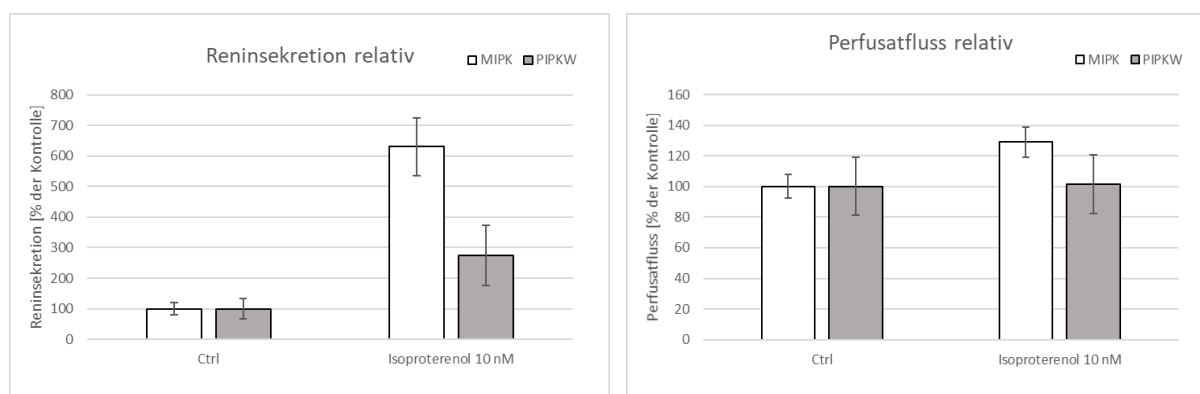


Abbildung 41 Vergleich des Effekts von Isoproterenol auf Flussrate und Reninsekretion bei IPPKS und IPMK

Der unselektive Betaagonist Isoproterenol simuliert den Effekt des Sympatikus *in vivo* und gilt somit als einer der potentesten Stimuli der Reninsekretion in isoliert perfundierten Organversuchen. (86, 87, 88, 89) Nach aktuellem Verständnis spielen hier die Adenylatzyklen AC5 und AC6 eine Schlüsselrolle. (83, 116) Während die Effektstärke von Isoproterenol auf die Reninsekretion in der IPMK stärker ausgeprägt war, vermochte die IPPKS dennoch ein **sinngemäßes Ansprechen** abzubilden. Dies erlaubt weitere Untersuchungen des zugrunde liegenden Mechanismus in Schweinenieren und perspektivisch auch menschlichen Organen.

## 1.2. Ang II

Bei IPMK, wie auch IPPKS ist der Gabe von 1 nM Angiotensin II die 15-minütige Prästimulation mittels 10 nM Isoproterenol vorausgegangen, um den Effekt auf die Reninsekretion suffizient zur Darstellung bringen zu können. Bei 22 durchgeführten IPPKS zeigte sich ein deutlicher Rückgang der Reninsekretion um beinahe 60% ( $123,90 \pm 36,38 \frac{\text{ng Ang}}{\text{h} \cdot \text{min} \cdot \text{g}}$  auf  $52,54 \pm 9,97 \frac{\text{ng Ang}}{\text{h} \cdot \text{min} \cdot \text{g}}$ ;  $p=0,016$ ), sowie ein geringer Rückgang des Perfusatflusses von etwa 6% ( $1,18 \pm 0,14 \frac{\text{ml/min}}{\text{g}}$  auf  $1,11 \pm 0,14 \frac{\text{ml/min}}{\text{g}}$ ;  $p = 2,11 \cdot 10^{-7}$ ). In den 4 zum Vergleich aus unveröffentlichten Daten (Schweda et al. 2012) herangezogenen IPMK zeigte sich ein etwa 1,5-fach stärkeres Ansprechen der Reninsekretion, im Sinne einer Reduktion der Reninsekretion um etwa 90% ( $1444,73 \pm 426,33 \frac{\text{ng Ang}}{\text{h} \cdot \text{min} \cdot \text{g}}$  auf  $144,09 \pm 54,87 \frac{\text{ng Ang}}{\text{h} \cdot \text{min} \cdot \text{g}}$ ;  $p < 0,05$ ). Weiterhin zeigte sich ein Rückgang des Perfusatflusses von über 70% ( $9,84 \pm 0,97 \frac{\text{ml/min}}{\text{g}}$  auf  $2,61 \pm 0,17 \frac{\text{ml/min}}{\text{g}}$ ;  $p < 0,05$ ), entsprechend einem etwa 12-fachem Effekt im Vergleich zu IPPKS.

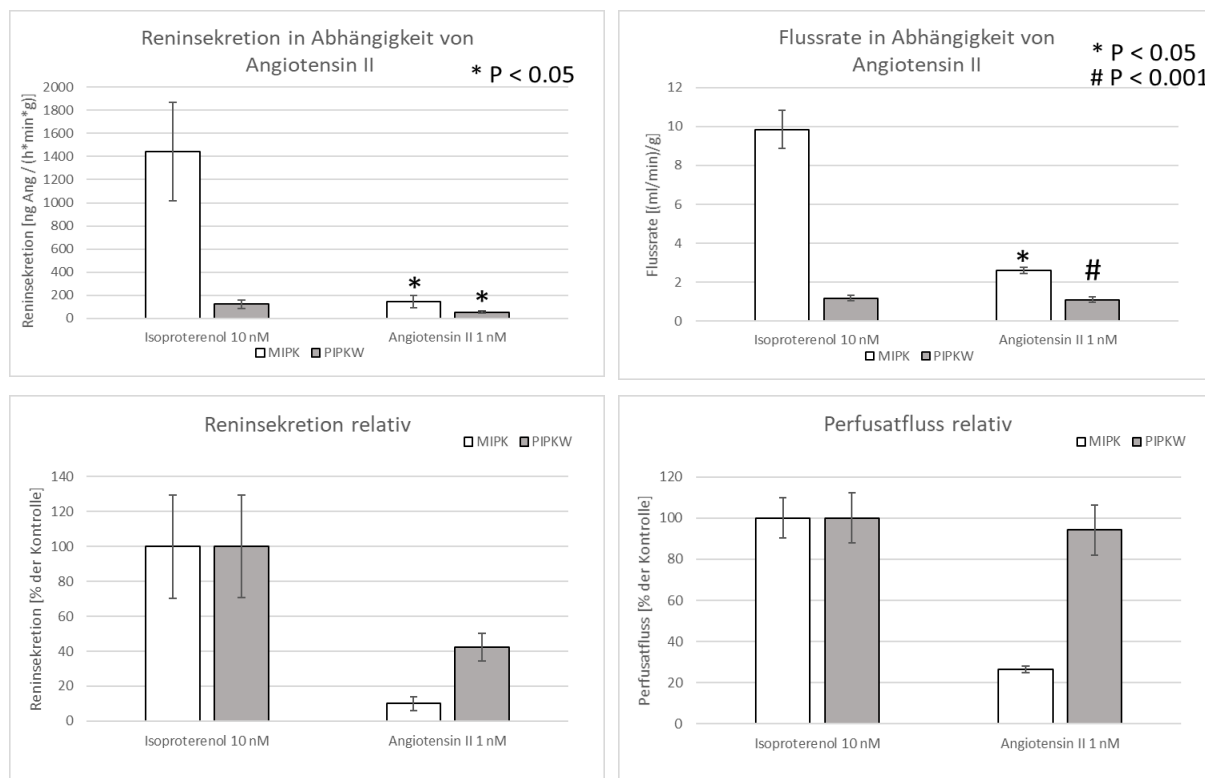


Abbildung 42 Vergleich des Effekts von Angiotensin II auf Flussrate und Reninsekretion bei IPPKS und IPMK

Angiotensin II vermittelt seine Wirkung auf die Reninsekretion einerseits über indirekte Effekte wie Vasokonstriktion, sowie gesteigerte Sekretion von Aldosteron mit entsprechend einhergehender gesteigerter renaler Flüssigkeitsretention und Steigerung des systemischen Blutdrucks, was letztlich zur Hemmung der Reninsekretion führt. Andererseits aber führt die Applikation von Angiotensin II selbst in druckkonstanten Perfusionen, also unabhängig vom renalen Perfusionsdruck zu einer potenten Inhibition der Reninsekretion, was eine direkt vermittelte Komponente impliziert (90). So zeigt sich insbesondere in IPPKS eine deutlich verminderte Reninsekretion trotz geringer detektierbarer Vasoreaktion.

Ogleich die Effektstärke dieser Hemmung im direkten Vergleich zur IPMK vermindert ist, entspricht die beobachtete Inhibition der Reninsekretion der **erwarteten physiologischen negativen Feedbackschleife**. (86)

### 1.3. EGTA

Nach Gabe von 3,1 mM EGTA konnte bei 15 durchgeführten IPPKS-Perfusionen ein Anstieg der Reninsekretion von etwa 200% ( $58,51 \pm 10,10 \frac{\text{ng Ang}}{\text{h*min*g}}$  auf  $176,48 \pm 45,33 \frac{\text{ng Ang}}{\text{h*min*g}}$ ;  $p=0,009$ ), sowie ein geringer Anstieg der Flussrate von 3% ( $1,28 \pm 0,20 \frac{\text{ml/min}}{\text{g}}$  auf  $1,32 \pm 0,20$

$\frac{ml/min}{g}$ ;  $p < 0,001$ ) verzeichnet werden. Im Vergleich hierzu war der Effekt von EGTA auf die Reninsekretion von 5 betrachteten IPMK mit etwa 3100 % ( $5.63 \pm 4.43 \frac{ng\ Ang}{h*min*g}$  auf  $180.30 \pm 28.4 \frac{ng\ Ang}{h*min*g}$ ;  $p < 0.05$ ) mehr als 15-mal ausgeprägter. Weiterhin war ein Anstieg des Perfusatflusses um mehr als 115% ( $6.55 \pm 0,81 \frac{ml/min}{g}$  auf  $14.27 \pm 1.24 \frac{ml/min}{g}$ ;  $p < 0.05$ ) zu beobachten. Dies entspricht beinahe dem 40-fachen bei IPPKS beobachteten Effekt. (85)

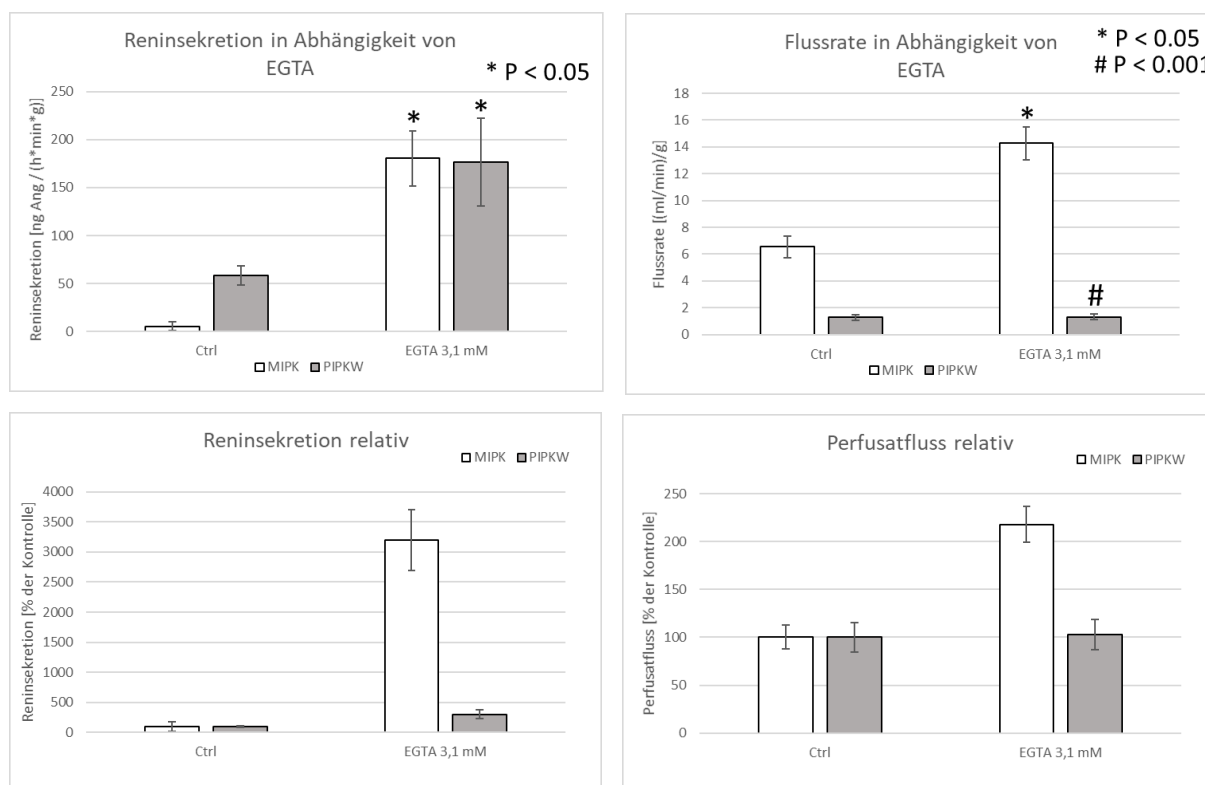


Abbildung 43 Vergleich des Effekts von EGTA auf Flussrate und Reninsekretion bei IPPKS und IPMK

Bei gesonderter Betrachtung des Effekts von EGTA nach Verabreichung von Angiotensin II konnte in 4 IPPKS ein Anstieg der Reninsekretion von ungefähr 220 % ( $31,96 \pm 3,05 \frac{ng\ Ang}{h*min*g}$  auf  $102,84 \pm 20,65 \frac{ng\ Ang}{h*min*g}$ ;  $p = 0,036$ ), sowie eine insignifikante Zunahme des Perfusatflusses von 6 % ( $1,02 \pm 0,30 \frac{ml/min}{g}$  auf  $1,08 \pm 0,29 \frac{ml/min}{g}$ ;  $p=0,075$ ) erhoben werden. Auch hier war der Effekt bei 4 unveröffentlichten IPMK (Schweda et al. 2012) deutlich ausgeprägter mit einem etwa 7-fach stärkerem Anstieg der Reninsekretion von beinahe 1600% ( $144.09 \pm 54.87 \frac{ng\ Ang}{h*min*g}$  auf  $2426.46 \pm 636.27 \frac{ng\ Ang}{h*min*g}$ ;  $p < 0.05$ ). Ebenfalls war ein signifikanter Anstieg des

Perfusatflusses von 370 % ( $2.61 \pm 0.17 \frac{\text{ml/min}}{\text{g}}$  auf  $12.24 \pm 0.53 \frac{\text{ml/min}}{\text{g}}$ ;  $p < 0.001$ ), entsprechend mehr als 60-fach der Ausprägung bei IPPKS, zu beobachten.

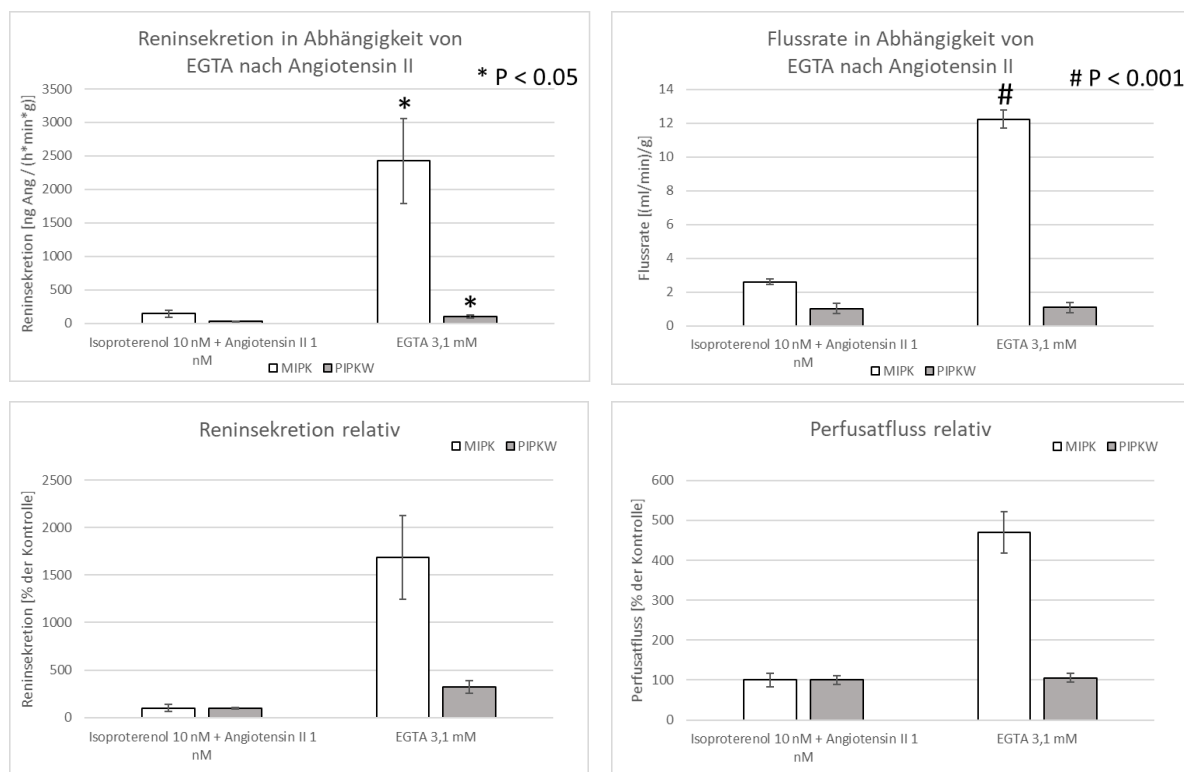


Abbildung 44 Vergleich des Effekts von EGTA nach Ang II auf Flussrate und Reninsekretion bei IPPKS und IPMK

Wie bereits oben ausführlich geschildert stellt die zytosolische Calciumkonzentration den potentesten Inhibitor der Reninexozytose dar, während cAMP als Hauptmediator für die Reninsekretion gilt. Eine Vernetzung dieser beiden Signalwege wird durch AC5 und AC6 vermutet. Eine Steigerung des intrazellulären Calciumspiegels entsprechend führt über die Adenylatzyklen zum Abbau intrazellulären cAMPs. Die Reduktion der Calciumkonzentration, wie etwa im Fall des Chelators EGTA führt im Umkehrschluss also zu einer deutlichen Stimulation der Reninsekretion durch erhöhte cAMP Konzentration (70).

Der Anstieg der Reninsekretion in IPPKS, wie auch IPMK, nach Gabe des Calciumchelators EGTA, spiegelt diese **inverse Beziehung zwischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und sekretorischer Aktivität** der juxtaglomerulären Zellen wider, die als Calcium-Paradoxon der Reninsekretion bekannt ist. (89) (86) (85). Im Fall der vorherigen Applikation von Angiotensin II annulliert EGTA in seiner Funktion als Chelator direkt den zytosolischen Calciumeinstrom, der durch Angiotensin II im Rahmen der negativen Feedbackschleife vermittelt wird. Insofern vermag

die IPPKS, wie auch die IPMK, dieses Gegenspiel zwischen Feedbackhemmung und Inhibition derselben, wenn auch in eingeschränkter Effekstärke, akkurat darzustellen. (91)

#### 1.4. SNAP

Gabe von 10  $\mu\text{M}$  SNAP konnte bei 9 IPPKS einen Anstieg der Reninsekretion von über 50% ( $31,17 \pm 4,52 \frac{\text{ng Ang}}{\text{h} \cdot \text{min} \cdot \text{g}}$  auf  $47,77 \pm 8,27 \frac{\text{ng Ang}}{\text{h} \cdot \text{min} \cdot \text{g}}$ ;  $p = 0,022$ ) im Vergleich zur Kontrolle vermitteln. Es war kein signifikanter Einfluss auf die Flussrate feststellbar. Bei 4 betrachteten IPMK aus unveröffentlichten Orginaldaten (Schweda et al. 2018) zeigte sich ein statistisch nicht signifikanter Anstieg der Reninsekretion von etwa 130% ( $18.60 \pm 3.84 \frac{\text{ng Ang}}{\text{h} \cdot \text{min} \cdot \text{g}}$  auf  $43.00 \pm 14.29 \frac{\text{ng Ang}}{\text{h} \cdot \text{min} \cdot \text{g}}$ ;  $p > 0.05$ ), entsprechend einem 2,6-fach stärkerem Effekt als bei IPPKS. Im Gegensatz zu letzteren war darüber hinaus ein statistisch signifikanter Anstieg der Flussrate von 28% ( $9.12 \pm 1.12 \frac{\text{ml/min}}{\text{g}}$  auf  $11.68 \pm 1.12 \frac{\text{ml/min}}{\text{g}}$ ;  $p < 0.05$ ) zu beobachten.

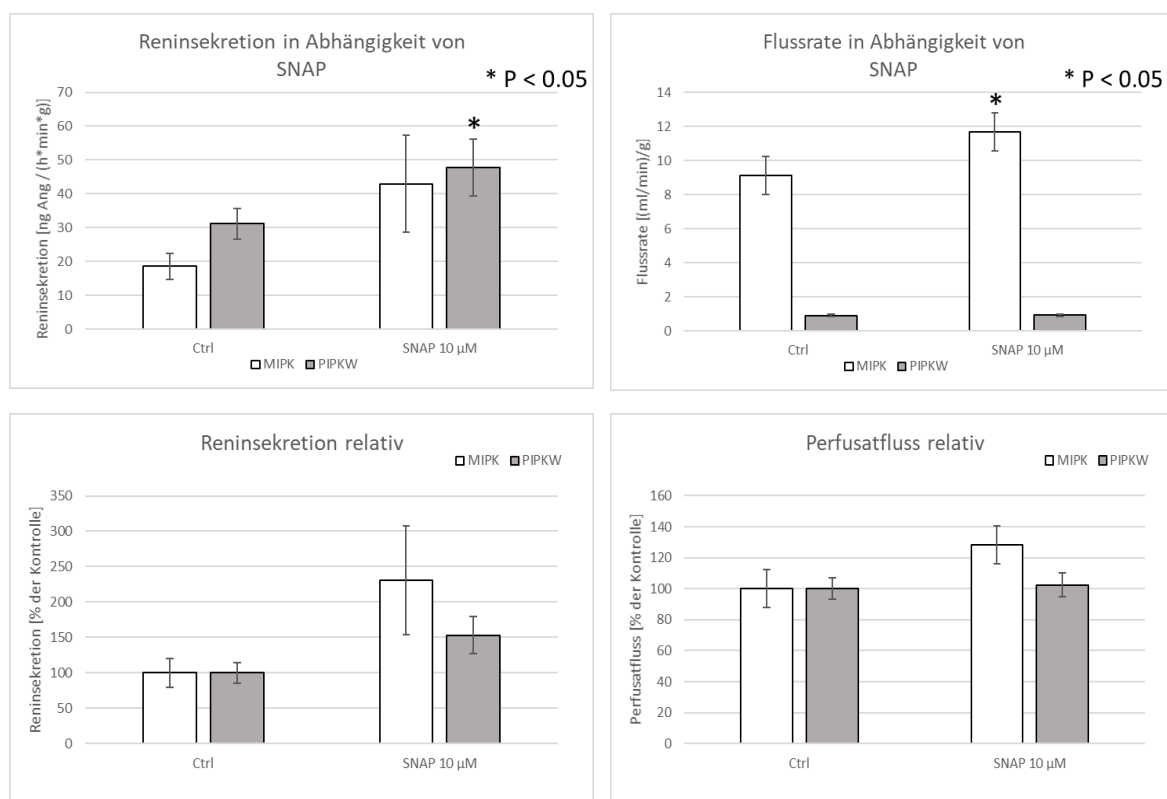


Abbildung 45 Vergleich des Effekts von SNAP auf Flussrate und Reninsekretion bei IPPKS und IPMK

Der Effekt von NO auf die Regulation der Reninsekretion setzt sich vergleichbar mit Angiotensin II aus einer direkten und indirekten Komponente zusammen. Die **indirekte Komponente** basiert hierbei auf eine Reduktion des systemischen Blutdrucks durch Vasodilatation und kann durch druckkonstante Perfusion weitgehend negiert werden, so dass

isolierte Organperfusionen die alleinige Betrachtung der direkten Komponente erlauben. **Der direkt medierte Effekt** wird über Interaktion von cAMP und cGMP vermittelt. Hierbei scheint eine cGMP vermittelte Inhibition der Phosphodiesterase 3 zum Anstieg der zytosolischen cAMP Konzentration zu führen, welche wiederum die Exozytose von Renin vermittelt (92). Dieser bereits aus Experimenten an IPPK und IPRK bekannte Effekt ließ sich auch in den Versuchen an isoliert perfundierten Schweinenierensegmenten replizieren. (93)

### 1.5. Acetylcholin

Gabe von 30  $\mu\text{M}$  Acetylcholin zu 7 IPPKS resultierte in einem statistisch signifikanten Rückgang der Reninsekretion von 25 % ( $39,81 \pm 8,49 \frac{\text{ng Ang}}{\text{h} \cdot \text{min} \cdot \text{g}}$  auf  $29,92 \pm 5,65 \frac{\text{ng Ang}}{\text{h} \cdot \text{min} \cdot \text{g}}$ ;  $p=0,041$ ) im Vergleich zu Kontrollwerten. Es war kein Effekt auf den Perfusatfluss feststellbar. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei 5 herangezogenen IPRK ein Anstieg der Reninsekretion von über 100% ( $8,10 \pm 1,47 \frac{\text{ng Ang}}{\text{h} \cdot \text{min} \cdot \text{g}}$  auf  $16,90 \pm 1,50 \frac{\text{ng Ang}}{\text{h} \cdot \text{min} \cdot \text{g}}$ ;  $p < 0,05$ ) (88) Es lagen keine Vergleichswerte des Perfusatflusses vor.

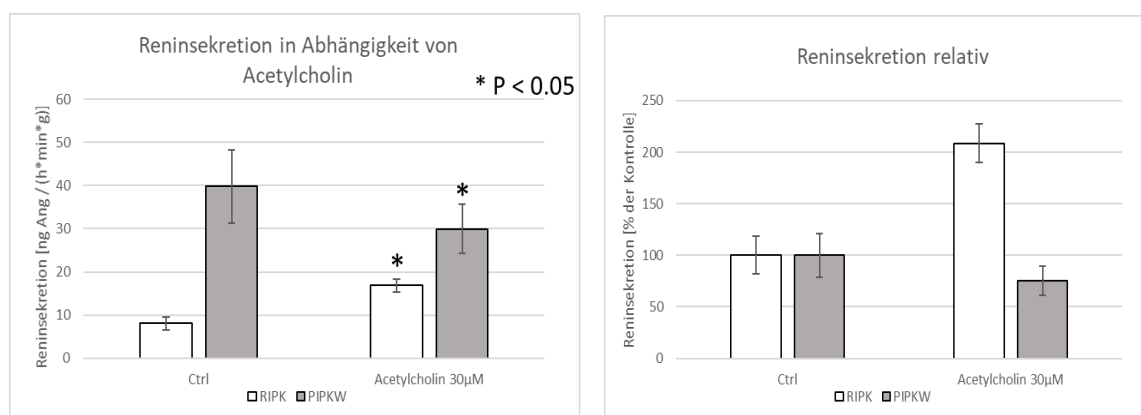


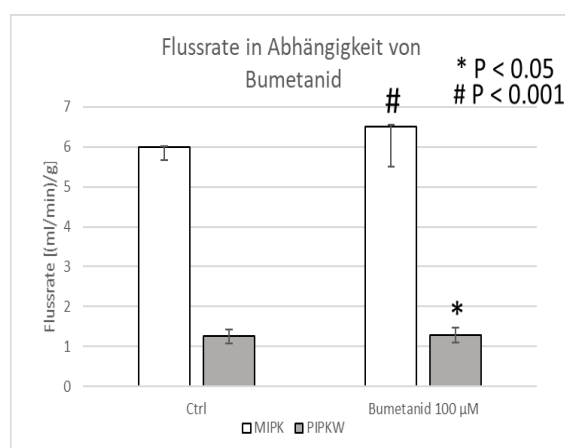
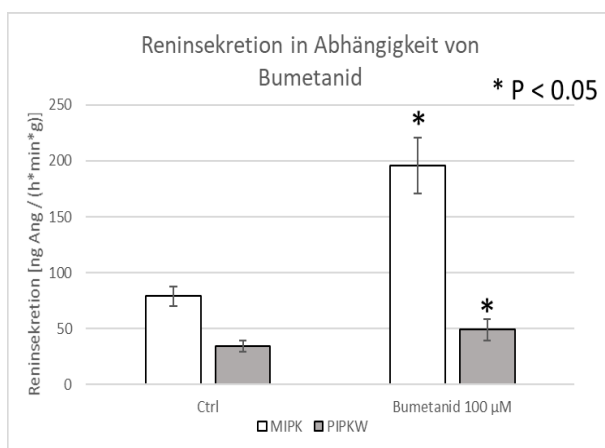
Abbildung 46 Vergleich des Effekts von Acetylcholin auf Reninsekretion bei IPPKS und IPRK

Im Gegensatz zum direkten NO-Donor SNAP vermittelt Acetylcholin die Freisetzung von NO aus dem vaskulären Endothel und dadurch Vasodilatation, sowie Stimulation der Reninsekretion. (94) Es existieren jedoch Berichte einer Inhibition dieser Stimulation der Reninsekretion bei Hunden unter Salzmenge von Tagawa und Vander (1969). In dieser Arbeit diskutieren die Autoren die Möglichkeit einer dialektischen Rolle von Acetylcholin, im Sinne einer sich überlagernden Inhibition und Stimulation der Reninsekretion. So zeigte sich in Experimenten, in denen eine Inhibition der Reninfreisetzung durch ACh beobachtet werden konnte, bei Recovery ein überproportionaler Anstieg der Reninsekretion auf Werte deutlich oberhalb des Ausgangswertes. (95) Untersuchungen an Patienten mit hypercholesterinämischer

endothelialen Dysfunktion zeigten einen Verlust der NO-Sekretion und Vasokonstriktion bei Gabe von Acetylcholin. (96) Es ist also denkbar, dass bei **verlorener endothelialer Integrität** ein ähnlicher Effekt nach ACh-Gabe auftritt und es zur Inhibition der Reninsekretion kommt. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei dem knapp erreichten Signifikanzniveau um einen Zufallsbefund handelt. Unabhängig dessen scheint eine **Schädigung des Endothels** naheliegend. Dies mag zum einen bereits einer möglichen aus der Mast der Tiere resultierenden Hypercholesterinämie geschuldet sein. Es ist aber auch bekannt, dass Erythrozyten eine wichtige Funktion im Erhalt der endothelialen Integrität einnehmen und dabei möglicherweise eine Rolle für den NO-Metabolismus spielen. Das **Insuffiziente Ansprechen auf ACh** im Modell der isoliert perfundierten Schweinenierensegmente mag also unter Umständen auch dem zellfreien Perfusat geschuldet sein. (97) Ein weiterer Punkt, den ich an späterer Stelle noch im Detail ausführen möchte betrifft mögliche endotheliale Schäden durch statische hypotherme Organkonservierung und apulsatile Reperfusion.

### 1.6. Bumetanid

In 8 IPPKS führte die Gabe von 100  $\mu\text{M}$  Bumetanid zu einem Anstieg der Reninsekretion von über 40% ( $34,74 \pm 4,86 \frac{\text{ng Ang}}{\text{h} \cdot \text{min} \cdot \text{g}}$  auf  $49,05 \pm 9,62 \frac{\text{ng Ang}}{\text{h} \cdot \text{min} \cdot \text{g}}$ ;  $p=0,045$ ), sowie einem diskreten Anstieg des Flussrate von etwa 3% ( $1,26 \pm 0,18 \frac{\text{ml/min}}{\text{g}}$  auf  $1,29 \pm 0,19 \frac{\text{ml/min}}{\text{g}}$ ;  $p=0,024$ ) im Vergleich zu Kontrollwerten. Dieser Effekt zeigte sich auch in 4 betrachteten Versuchen an IPMK. Hier lässt sich jedoch ein etwa 3,5-fach so ausgeprägter Anstieg der Reninsekretion, entsprechend einem Anstieg von beinahe 150% ( $79,01 \pm 8,60 \frac{\text{ng Ang}}{\text{h} \cdot \text{min} \cdot \text{g}}$  auf  $195,73 \pm 24,93 \frac{\text{ng Ang}}{\text{h} \cdot \text{min} \cdot \text{g}}$ ;  $p < 0,05$ ), sowie ein etwa 3-mal ausgeprägteres Ansprechen des Perfusatflusses von 8,3% ( $6,00 \pm 0,02 \frac{\text{ml/min}}{\text{g}}$  auf  $6,50 \pm 0,06 \frac{\text{ml/min}}{\text{g}}$ ;  $p < 0,001$ ) beobachten.



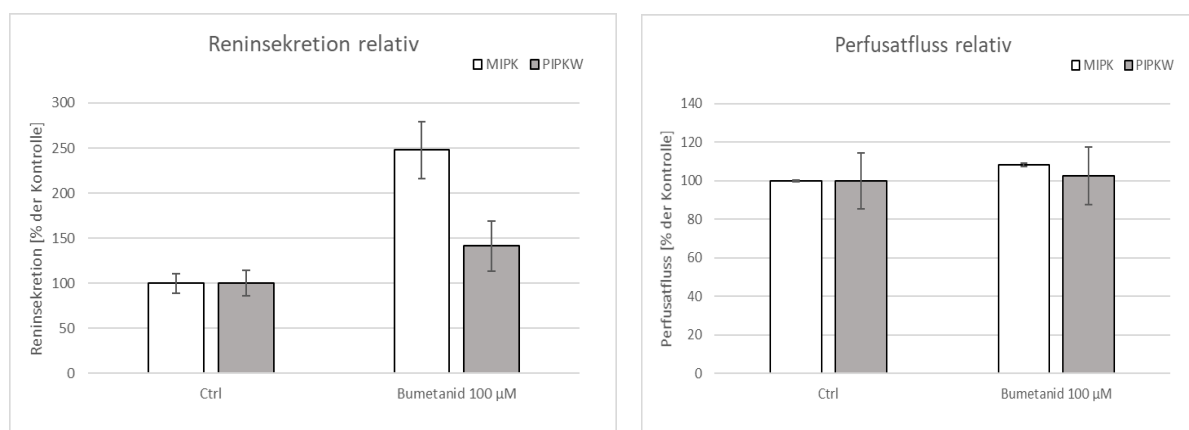


Abbildung 47 Vergleich des Effekts von Bumetanid auf Flussrate und Reninsekretion bei IPPKS und IPMK

Bumetanid vermittelt sowohl *in vivo* als auch in isolierten Organperfusionen eine Stimulation der Reninsekretion (87, 88). Zum einen blockiert Bumetanid seiner Funktion als Schleifendiuretikum entsprechend den  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ -Symporter (NKCC2) in der Henleschleife, wodurch es zu Salz- und konsekutiv Flüssigkeitsverlust kommt und entsprechend die Reninsekretion indirekt gesteigert wird (90). Die Blockade des Symporters erfolgt hierbei jedoch nicht ausschließlich tubulär, sondern auch direkt an den Chemosensoren der Macula Densa. Dieser direkte Effekt ist unabhängig von systemischen Faktoren und kann in isolierten Organperfusionen abgebildet werden. (89, 90, 105, 114, 117) Im Gegensatz zu isolierten Mäuse- und Rattennierenperfusionen muss bei isoliert perfundierten Schweinennierensegmenten aber aufgrund der fragmentären Natur der Präparation von einer **eingeschränkten tubulären Funktion** ausgegangen werden. Durch die schnittbedingte Eröffnung des Nierenmarks sind hierbei insbesondere die juxtaglomerulären Nephronen betroffen, die die Blutversorgung des Nierenmarks gewährleisten und von denen tubuläre Resorptionsprozesse daher maßgeblich abhängig sind. (98) Bei entsprechend eingeschränktem tubuloglomerulären Feedback ist keine Stimulation der Reninsekretion durch Blockade des NKCC2 an der Macula Densa zu erwarten, da ohnehin keine Aktivität vom hier liegenden Chemosensor zu erwarten ist. Dennoch aber konnte das Schleifendiuretikum eine klare Stimulation der Reninsekretion vermitteln, was für ein erhaltenes tubuloglomeruläres Feedback spricht. (92) Der Effekt von Schleifendiuretika auf die Reninsekretion scheint jedoch nicht nur durch NKCC2 zu wirken, sondern auch durch NKCC1, der nicht nur an der Macula Densa, sondern auch den juxtaglomerulären Zellen direkt exprimiert wird. (85, 99) Der Effekt an den juxtaglomerulären Zellen ist hierbei unabhängig von einem erhaltenen tubuloglomerulären Feedback. Die Daten aus den IPPKS scheinen die Hypothese eines zumindest anteilig direkten und **MD unabhängig vermittelten Effekts über NKCC1 Blockade** zu unterstützen. (90).

### 1.7. Perfusionsdruck

Eine Reduktion des Perfusionsdrucks von 100 mmHg auf 40 mmHg konnte in 8 durchgeführten IPPKS keinen signifikanten Effekt auf die Reninsekretion vermitteln. Aufgrund von Unterschieden im Perfusions-Setup wurde bei 5 betrachteten IPMK ein Startdruck von 90 mmHg gewählt, welcher ebenfalls auf 40 mmHg reduziert wurde. Hierbei zeigte sich ein Anstieg der Reninsekretion von beinahe 250% ( $96,00 \pm 13,73 \frac{ng\ Ang}{h*min*g}$  auf  $332,27 \pm 26,53 \frac{ng\ Ang}{h*min*g}$ ;  $p < 0,01$ ) (100) Auch die Druckrecovery von 40 mmHg auf 100 mmHg hatte keinen Einfluss auf die Reninsekretion bei den IPPKS.

Bei den IPMK zeigte sich dagegen ein vollständiger Rückgang der Reninsekretion auf die Ausgangswerte. Dies entspricht einem Rückgang der Reninsekretion um 70% ( $332,27 \pm 26,53 \frac{ng\ Ang}{h*min*g}$  auf  $97,47 \pm 10,80 \frac{ng\ Ang}{h*min*g}$ ;  $p < 0,05$ ).

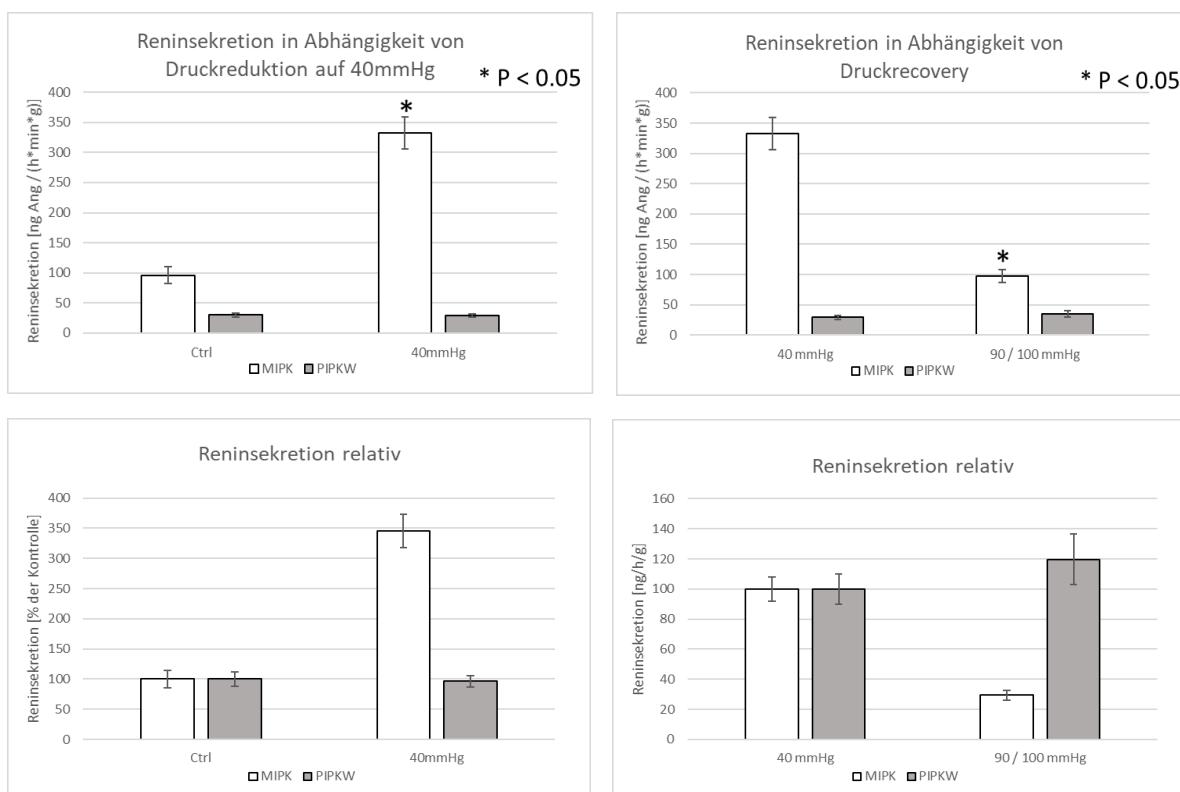


Abbildung 48 Vergleich des Effekts des Perfusionsdrucks auf die Reninsekretion bei IPPKS und IPMK

Bei Betrachtung der insuffizienten Vasoreaktion bislang beschriebener Interventionen, verwundert es kaum, dass eine **Änderung des Perfusionsdruck keinen relevanten Effekt** auf die Reninsekretion zu vermitteln vermag. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtungen stellt eine Negierung der veränderten Perfusionsdruckverhältnisse durch einen signifikanten Anteil an Leckfluss dar. Da das Perfusat stets den geringsten Widerstand wählt resultiert ein

höherer Perfusionsdruck möglicherweise in überproportional gesteigertem Leckfluss. Der so ermittelte Perfusionsdruck wäre damit falsch erhöht. Diese Hypothese stellt aber den tatsächlichen Perfusionsdruck aller durchgeführten Perfusionen in Frage und widerspricht den nachvollziehbaren Effekten der vorherigen Interventionen auf die Reninsekretion, welche nicht auf derart signifikanten Leckfluss rückschließen lassen, wie es ihm bedarf um so ausgeprägte Druckdifferenzen zu annullieren. Sicherlich aber sind, solange relevanter Leckfluss nicht sicher ausgeschlossen werden kann, indirekt **über Druckänderungen vermittelte Interventionen nur schwer interpretierbar**.

### 1.8. Effektstärke in Relation zur isolated perfused mouse Kidney

Zusammengefasst lässt sich also sagen, dass isoliert perfundierte Schweinenierensegmente statistisch signifikante Reaktionen der Reninsekretion nach Gabe von Isoproterenol, Angiotensin II, EGTA, SNAP und Bumetanid replizieren kann. Diese Interventionen umfassen die **rezeptorvermittelte Regulation** der Reninsekretion. Rein fluss- oder druckabhängige Interventionen wie die Veränderung des Perfusionsdrucks scheinen dagegen keinen Effekt zu vermitteln. Ebenso wenig der indirekt endothelial vermittelte Effekt von Acetylcholin. Die Reninsekretion nach Isoproterenol war vollständig reversibel nach Gabe von Ang II, ebenso EGTA nach Recovery und Angiotensin II nach EGTA Gabe. Im direkten Vergleich mit der isoliert perfundierten Mäuseniere waren aber auch die statistisch signifikanten Interventionen **an Effektstärke unterlegen**. (85, 89). Eine mögliche Erklärung hierfür stellen Unterschiede im Bezug auf die Substratspezifität der applizierten Interventionen dar. So existieren etwa 2 Isoformen von Angiotensin II, das in unseren Versuchen appliziert wurde. Sowohl das menschliche, als auch porkines Angiotensin II aber gehören beide zur Isoleucin-Form. Weiterhin sind zum aktuellen Zeitpunkt selbst zwischen den Unterformen keine Unterschiede im Bezug auf die Substratspezifität bekannt. (101). Es ist nicht auszuschließen, dass schlichtweg höhere basale Reninsekretion in IPPKS eine geringere Effektstärke suggerieren. Der Vergleich von Absolutwerten der maximalen Reninsekretion nach den jeweiligen Interventionen aber ist aufgrund des unklaren Anteils an Leckfluss in seiner Aussagekraft eingeschränkt. Diese Beobachtung, sowie die bereits weiter oben beschriebene endotheliale Dysfunktion muss als mögliches Zeichen einer insuffizienten Sauerstoffversorgung aufgrund des vollsynthetischen Perfusats ohne Sauerstoffträger erwogen werden.

Eine Interpretation des vasoreaktiven Effekts der applizierten Interventionen, ist aufgrund der unklaren Höhe des Leckflusses erschwert, die bereits im vorigen Abschnitt angesprochen wurde. Bei einem signifikantem Leckfluss, also wenn ein bedeutender Anteil des

Perfusatvolumens eigentlich nicht das Funktionsgewebe, sondern lediglich präparationsbedingt eröffnete Gefäße durchströmt, ist die Effektstärke maßgeblich eingeschränkt. In Konkordanz hierzu zeigten die meisten untersuchten Interventionen zumindest einen Trend in Richtung der erwarteten Vasoreaktionen, wenn auch ohne statistische Signifikanz bei deutlich eingeschränkter Effektstärke. Eine vollständige Kompensation des veränderten vaskulären Widerstands durch Zu- und Abnahme des Anteils an Leckfluss scheint dennoch unwahrscheinlich, zumal sich nennenswerter Leckfluss bereits in der Frühphase der Perfusion durch ein vorzeitiges Erreichen des Flussplateaus ankündigt und bei ausgeprägtem Leckfluss eine Minderperfusion mit kontinuierlichem Stimulus der Reninsekretion zu erwarten wäre. Solange jedoch keine Methode zur Bestimmung der Leckage implementiert ist, kann **Leckfluss als mögliche Störvariable** nicht endgültig ausgeschlossen werden. Selbst wenn man von vernachlässigbarem Leckfluss ausgeht, zeigen sich die gemessenen **Flussraten** pro Gramm Gewebe als **auffällig niedrig** im Vergleich zu den IPMK. Mit 0,5 bis 3,2  $\frac{ml}{min \cdot g}$  entsprach die gemessene Flussrate in etwa derjenigen von normotherm perfundierten menschlichen Transplantatnieren mit 660  $\frac{ml}{min}$  pro Organ oder 1-3  $\frac{ml}{min \cdot g}$ . (102, 103, 104) Bei Leckfluss wäre eine eher artifiziell erhöhte Flussrate zu erwarten. Während Segmentarterien zwar keine Anastomosen untereinander bilden, ist es durchaus möglich, dass die betrachteten Gewebesegmente in vivo von mehreren Arteriae interlobares versorgt werden. (17) Bei alleiniger Bestimmung der perfundierten Gewebemenge durch Färbung, besteht in solch einem Fall die Möglichkeit, dass durch Diffusion des Färbemediums auch eigentlich über andere Gefäße versorgtes aber im ungefähren Versorgungsareal des perfundierten Gefäßes liegendes Gewebe miteingerechnet wird und es so zu einer Überschätzung des perfundierten Volumens, also vice versa zu einer **Unterschätzung des Flusses pro Gewebegewicht** kommt. Hieraus würden auch **artifiziell niedrige** berechnete Raten der **Reninsekretion**, die sich aus Multiplikation der Reninkonzentration mit der Flussrate ergibt, resultieren. Gegen diese Annahme spricht, dass die Reninsekretion pro Gramm perfundierten Gewebes in IPPKS und IPMK im Gegensatz zur Flussrate in etwa vergleichbare Ergebnisse liefert. Theoretisch wäre natürlich auch denkbar, dass sich aus einer Kombination von Hypoxie bedingtem Stimulus der Reninsekretion und unterschätzter Flussrate der Anschein physiologischer Reninsekretionswerte ergibt. Wahrscheinlicher aber scheint nach wie vor ein hypoxiebedingte **gestörte Endothelfunktion** aufgrund eines Mangels an adäquaten Sauerstoffträgern, oder Reperfusionsschäden, die im nachfolgenden Teil zu den Optimierungsmöglichkeiten des Modells ausführlich thematisiert werden sollen. Für diese These spricht auch ein Ansprechen

der Präparation auf den direkten NO-Donor SNAP, während Acetylcholin, dessen indirekter Wirkmechanismus auf endotheliale Integrität angewiesen ist, keine Wirkung zu vermitteln vermochte. Von inadäquater Sauerstoffsättigung ist natürlich nicht nur das Endothel betroffen. Besonders Schäden im Bereich des ohnehin ischämieanfälligen **Nierenmarks** durch die Auflösung der Gefäßarchitektur im Rahmen der Präparation sind denkbar. Diese Region ist selbst in IPMK und IPRK ohne Zugabe von adäquaten Sauerstoffträgern für hypoxische Schäden anfällig. (105)

Weiterhin denkbar ist eine fortwährende Sekretion vasokonstriktorischer Mediatoren bei insuffizientem Perfusionsdruck (oder aber auch eine Retention von selbigen vor der Organentnahme), aus der sich ein artifiziell erhöhter Gefäßwiderstand mit niedriger Flussrate ergibt. Tatsächlich ist die Flussrate in isoliert perfundierten Mäusenieren bis zu 10mal höher als bei den von uns durchgeführten isoliert perfundierten Schweinenierensegmenten. Der geringe Effekt von EGTA auf den Perfusatfluss, sowie der mit gekühlten IPMK (Unveröffentlichte Daten Schweda et al.) vergleichbare Anstieg der Flussrate während der Reperfusion, aber lassen Zweifel an auch dieser Hypothese aufkommen.

Bei all den angeführten Überlegungen muss natürlich auch bedacht werden, dass es sich schlichtweg um unterschiedliche Spezies handelt und daher natürlich auch die Beteiligung **anatomischer und physiologischer Differenzen** nicht ausgeschlossen werden darf. Im Vergleich zwischen isoliert perfundierten Ratten- und Mäusenieren aber scheinen nur insignifikante Unterschiede im Bezug auf Flussrate und Reninsekretion zu bestehen. So führt die Gabe von Isoproterenol in IPRK zu einem etwa 8-fachen Anstieg der Reninsekretion, während bei IPMK ein etwa 6-facher Anstieg apparent ist. Bei IPRK kam es aber zu keinem signifikanten Anstieg der Flussrate, während bei IPMK ein Anstieg von etwa 30% beobachtet werden konnte (89) (85). Auch bei Bumetanidgabe zeigt sich ein ähnliches Bild mit vergleichbarem Anstieg der Reninsekretion aber lediglich bei IPMK auftretender Vasoreaktion. (85, 89, 106). Zwischen den betrachteten Experimenten der gegenübergestellten Methoden gab es keine Unterschiede der Perfusatzusammensetzung oder des Perfusionsprotokolls. Die jeweiligen Perfusionen wurden vom selben Team mit modifiziertem Krebs-Henseleit-Puffer, BSA als Kolloid und Erythrozyten (mit Hämatokrit von 10%) als Sauerstoffträger durchgeführt. Der offensichtlichste Unterschied zwischen Beiden Methoden ergab sich daraus, dass IPMK Perfusionen im Single-Pass Setting erfolgen, während das Perfusat bei IPRK rezirkuliert. Hierin kann sich die ausbleibende Vasoreaktion aber kaum begründen, da IPRK, wie die IPMK - mit erhaltener Vasoreagibilität - als Single-Pass-Perfusionen durchgeführt wurden.

Es gibt Daten, die eine deutlich verringerte Perfusat-Flussrate nach 24- stündiger Kaltischämie-Phase beschreiben, für maximal 10 h andauerende Kaltischämie aber ist kein derartiger Effekt beschrieben (107). Im Gegenteil die maximale Kaltischämie-Dauer von 10 h wurde in die Kriterien für den Einschluss zur Perfusion übernommen, nachdem sich in ersten Perfusionsversuchen an IPPKS zeigte, dass erst bei längerer Lagerdauer ein negativer Einfluss auf die Vitalität des Gewebes apparent war.

Zusammengefasst lässt sich also sagen, dass isoliert perfundierte Schweinenierensegmente statistisch **signifikante Reaktionen der Reninsekretion nach Gabe von Isoproterenol, Angiotensin II, EGTA, SNAP und Bumetanid** abzubilden vermag. Diese Interventionen umfassen die **rezeptorvermittelte Regulation der Reninsekretion**. Indirekte barorezeptor vermittelte Interventionen wie die Veränderung des Perfusionsdrucks scheinen dagegen keinen adäquaten Effekt zu vermitteln. Ebenso wenig scheint der endothelmedierte Effekt von Acetylcholin einen Einfluss auf die Reninsekretion in fragmentären Organperfusionen zu nehmen.

## 2. Optimierung der Methodik

Es war eine bewusste Entscheidung, den in dieser Arbeit beschriebenen Perfusionsapparat **möglichst simplistisch** zu gestalten, um eine einfache Replikation der Versuche zu gewährleisten und unnötige Störfaktoren für eine Translation auf menschliche Organe zu vermeiden. Dieser Entscheidung ermöglicht nun einige Optimierungsmöglichkeiten des verwendeten Setups.

### 2.1. Rezirkulation eines hochwertigen Perfusats

Wie im vorherigen Abschnitt ausgeführt war neben der insuffizienten Vasoreagibilität eine grundsätzlich deutlich niedrigere Flussrate, als von isoliert perfundierten Ratten- und Mäusenieren zu erwarten gewesen wären, apparent. Unerwartet hohe Gefäßwiderstände ziehen sich wie ein Muster durch die Geschichte der isolierten Organperfusion und es wurden verschiedene Hypothesen für ihre Herkunft angestellt (4)(1). Verwunderlich scheint aber, dass gerade bei (semi-)synthetischen Perfusionsmedien, wie bei dem von uns in dieser Arbeit benutzten, für gewöhnlich ein reduzierter Widerstand beobachtet werden kann (56). Im Gegensatz aber zu isoliert perfundierten Nagetiernieren, auf die sich in der beschriebenen Datenlage zumeist berufen wird, müsste bei isoliert perfundierten Schweinenierensegmenten von eher höheren Flussraten durch möglichen Leckfluss ausgegangen werden. Wie bereits

angesprochen besteht eine Möglichkeit, dass **Hypoxie zu Endothelschäden** führt. In diesem Fall wäre gerade eben der Mangel an Blutbestandteilen im Perfusionsmedium für den hohen Gefäßwiderstand verantwortlich. Durch den Mangel an endothelialer NO-Freisetzung nämlich kann es zur Vasokonstriktion kommen (92). Dass der direkte NO-Donor SNAP eine gesteigerte Reninsekretion zu medieren wusste, das endothelabhängige Acetylcholin aber nicht untermauert diese These. Eine nennenswerte Vasodilatation aber, wie in diesem Fall erwartet, zeigte sich auch nach SNAP Applikation nicht (88).

Die **Zugabe von Blutbestandteilen** scheint für die Integrität des Endothels in isolierten Organperfusionen von maßgeblicher Bedeutung zu sein. Einerseits besteht die Notwendigkeit eines adäquaten Sauerstoffträgers zur Gewährleistung der essentiellen Oxygenierung bei kritischer Ischämieanfälligkeit(108), andererseits aber scheinen verschiedene Blutbestandteile relevant für die Versorgung der endothelialen Glykokalix (109, 110). So konnte gezeigt werden, dass auch die Zugabe von Thrombozyten zum Perfusat der Erhaltung der endothelialen Vitalität zuträglich ist und die Integrität des Endothels dadurch von wenigen Stunden auf bis zu 24 Stunden gesteigert werden kann. (65)

Ein **Semisynthetisches Perfusionsmedium** mit zumeist menschlichen Erythrozyten stellt den Goldstandard unter den Perfusionsmedien für isolierte Organperfusionen dar. Natürlich bringt die Verwendung von organischen Materialien aber auch immer ein Risiko unvorhergesehener Störfaktoren mit sich. Während humane Erythrozyten bei Nagetierperfusionen keine Probleme verursachen, wäre eine Reaktion der Blutzellen mit im Organ verbliebenen Antikörpern bei der Perfusion menschlicher Nierensegmente denkbar. In Experimenten die wir an unserem Perfusionsapparat angestellt haben führte die Verwendung von Erythrozyten darüberhinaus zu Schaumbildung, einem Risikofaktor für fatale Luftembolien. In isolierten Nagetiernierenperfusionen wird dem durch **indirekte Oxygenierung**, mittels Membranoxygenatoren oder kontinuierlicher Dialyse des Perfusionsmediums gegen einen begasten Puffer, vorgebeugt. Diese indirekte Form der Oxygenierung ist zwar aufwändig und zumeist teuer, ermöglicht aber auch die Verwendung von **bovinem Serumalbumin als Kolloid**. Wie Bereits in der Einleitung im Detail ausgeführt zeichnet sich dieses Kolloid durch das bestmögliche Verhältnis an Viskosität des Perfusats zum onkologischen Druck, bei hervorragender Erhaltung der GFR, sowie Resorptionsfunktionen aus. Im Vergleich hierzu ergibt sich bei Verwendung synthetischer Kolloide, wie auch dem von uns verwendeten Dextran, bei ähnlichem osmotischen Druck eine wesentlich höhere Viskosität, die sich negativ auf den Perfusatfluss auswirken kann. Doch wie auch synthetische Sauerstoffträger, ist BSA

kostspielig und der Natur der Organpräparation geschuldet, ist keine Trennung des renalen Ultrafiltrats vom venösen Effluat möglich. Dies schränkt die Verwendbarkeit für Reperfuionsversuche mit kostspieligen Perfusaten ein (111). Geht man von einem mit IPMK vergleichbarem Perfusatfluss aus, wäre je nach Größe des perfundierten Gewebesegments ein Perfusataufkommen von bis zu  $100 \frac{ml}{min}$  zu erwarten. Eine wirtschaftlich besser umsetzbare Kompromisslösung stellt daher die Zugabe eines Gemisches aus BSA und Dextran zum Perfusat dar, wie sie bereits von Wang et al. in Single-Pass Perfusionen an Rattennieren beschrieben wurde. Die Autoren schildern sogar bloßem BSA überlegene Perfusionsparameter (Im Sinne von höherer GFR, niedrigerem Gefäßwiderstand und besser erhaltenen Resorptions und Sekretionsvorgängen) bei Zugabe von 60-90 kDa Dextran und Reduktion des BSA-Gehalts auf ein Zehntel der Vergleichsgruppe. (112)

## 2.2. Präparation, Transport und Lagerung

Es ist schwer abzustreiten, dass auch Lagerung und Transport des Gewebes Einfluss auf die Vitalität der späteren Perfusion nehmen. Nicht ohne Grund schließlich existieren verschiedene Organkonservierungslösungen und technisch komplexe Apparate zum Transport von Spenderorganen. Die Verwendung der **University of Wisconsin Lösung** etwa, eines kolloidhaltigen Phosphatpuffers mit hohem Kaliumanteil, kann sich positiv auf den Organerhalt auswirken. (113) Es konnte gezeigt werden, dass Unterschiede im Konservierungsmedium drastische Auswirkungen sowohl auf das kurz- als auch langzeit Outcome bei Transplantatpatienten vermitteln können. (114) Der bloßen statisch-hypothermen Konservierung überlegen noch, ist die maschinelle Gewebepfusion. Hier wäre sogar die Möglichkeit der normothermen Aufbewahrung gegeben, bei der die für das Organ kritische Phase der Reperfusion und Erwärmung gänzlich umgangen werden kann. (115) Freilich stellt dies eine rein hypothetische Überlegung dar, die beim Transport ganzer Organe zum Einsatz kommen kann, bei Translation auf menschliche Gewebebeile aber vermutlich nur sehr schwer umzusetzen ist. Hier müsste nämlich entweder der Untersucher vor Ort direkt nach Organentnahme die notwendige chirurgische Präparation umsetzen, oder aber die Kanülierung bereits durch das OP-Team vorgenommen werden.

## 2.3. Leckfluss

Ein wiederkehrendes Problem, das uns in dieser Arbeit beschäftigt hat und als Ursache für verschiedene Komplikationen diskutiert wurde, stellt der durch die Schnittflächen des

Gewebekeils entstehende Leckfluss dar. Bislang wurden aus Sorge das angrenzende perfundierte Gewebe zu schädigen und dadurch Ergebnisse zu verfälschen keine Bemühungen unternommen seine Bedeutungsschwere zu bestimmen und potenzielle Leckage zu unterbinden. Es existieren einige Methoden zum Verschluss eröffneter Gefäße. Am vielversprechendsten für unsere Anwendung scheint die **Versiegelung mittels Elektrokauter**, da die Gefäße im Querschnitt eröffnet und einer Ligatur aufgrund des umliegenden Gewebes somit nicht zugänglich sind. Die heute verfügbaren Systeme ermöglichen es Gefäße mit einem Durchmesser von bis zu 5 mm so zu verschließen, dass diese einem Druck von mehr als 360 mmHg standhalten können, was für unsere Zwecke mehr als ausreichend ist. (116) Natürlich muss beachtet werden, dass Unterschiede in der Funktionsart der Geräte verschiedene Resultate hervorbringen. Bipolare Geräte erlauben die Anwendung größerer Energiemengen in Kombination mit mechanischer Kompression des Gefäßes, sind aber aufgrund der oben beschriebenen Einbettung der Gefäße in umliegendes Gewebe für unsere Verwendungszwecke monopolen Geräten unterlegen. (117) Eine weitere Möglichkeit zur Reduktion von Leckfluss ist die Verwendung **möglichst großer Gewebekeile** mit ausreichendem Gewebesaum um das perfundierte Areal. Bei Verwendung von menschlichem Gewebe ist man hinsichtlich dieser Option natürlich durch die pathologischen Gegebenheiten des Organs limitiert. Aber auch wenn kein ausreichender Gewebesaum das perfundierte Areal umgibt, kann eine Kompression der Schnittfläche zur Reduktion der Leakage führen. Alternativ ist natürlich auch die Verwendung von **Gewebekleber** auf Cyanoacrylat- oder Polyurethan-Basis eine weitere Option zum Versiegeln der Wundflächen. Zwar liegen uns hierzu keine genauen Daten zum maximal tolerierten Gefäßdruck vor, Versuche an Anastomosen bei Schweinegefäßen scheinen jedoch vielversprechend. (118)

Von der Methode unabhängig aber muss darauf geachtet werden, den **venösen Abfluss** des Gewebekeils nicht zu unterbinden, da es sonst zum Erliegen der Perfusion käme.

Auch bei Anwendung der aufgeführten Maßnahmen ist eine **Bestimmung und Quantifizierung von Leckfluss** jedoch essentiell, um maximale Genauigkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Es gibt verschiedene Ansätze zur Bestimmung des Leckflusses. Die einfachste Möglichkeit, nämlich der Auffang des venösen Effluats, ist aufgrund der fragmentären Natur der Gewebekeile nicht möglich, da eine Unterscheidung zwischen venösem Effluat und Leckfluss schlichtweg nicht gewährleistet werden kann. Eine naheliegende Alternative scheint die Bestimmung des perfundierten Anteils des Gewebesegments über metabolische Vorgänge. Hierzu müsste der Verbrauch einer gesunden, kompletten

Schweineniere an Metaboliten wie Sauerstoff oder Glukose ermittelt werden und der Verbrauch der IPPKS im Verhältnis zu diesem Kontrollwert gesetzt werden. Aufgrund von inter-, aber auch intraindividuellen Unterschieden je nach Region des perfundierten Areals und dessen Gefäßversorgung, sowie nicht vorhersehbaren Einflussfaktoren der metabolischen Aktivität, bringt diese Methode eine gewisse Fehlerwahrscheinlichkeit mit sich. Ein weiterer Ansatz zur Bestimmung des Leckflusses einer Perfusion ist die Applikation geringer Mengen einer vollständig in der Niere metabolisierten Substanz. Hier entspricht der Anteil an unverstoffwechseltem Metabolit dem Anteil des Leckflusses. Auch die Applikation eines gewebebegängigen Farbstoffs wie Evans Blue in niedriger Dosierung, könnte möglicherweise eine **photometrische Bestimmung** des Leckflusses erlauben. Am genauesten, sicher aber auch aufwendigsten und kostspieligsten, scheint die Verwendung eines Tracers oder Antikörpers.

Je nach Aufwand der gewählten Methode könnte der Leckfluss des untersuchten Gewebesegments bereits vorab bestimmt werden und die Eignung zur Perfusion kritisch hinterfragt werden.

#### 2.4. Pulsatile Perfusion

Aus der Organentnahme mit hypothermer Lagerung vor Perfusion ergibt sich eine für isoliert perfundierte Organe untypische Situation. Im Gegensatz zu IPMK oder IPRK ist nämlich eine Phase der Reperfusion nach hypothermer statischer Konservierung notwendig. Alle bislang durchgeführten Perfusionen wurden druckkonstant mit möglichst kontinuierlichem Fluß durchgeführt. Hierzu wurden Windkessel in den Perfusatkreislauf integriert um die natürlichen Fluktuationen der Rollerpumpe abzdämpfen. Dieses Verfahren ermöglicht eine möglichst schonende Perfusion des Gewebes und erleichtert die genaue Berechnung des Effekts der Interventionen auf Vasoreaktion und Reninsekretion.

Für die **Reperfusion** von statisch hypotherm gelagertem Gewebe aber scheint eine pulsatile Perfusion der statischen überlegen zu sein. So konnten Horn et al. eine deutliche Stimulation der Endothelin 1-Aktivität, sowie einen Rückgang der **NO-Sekretion**, im Sinne einer endothelial vermittelten Vasokonstriktion, nach non-pulsatiler Reperfusion ischämischer Nieren zeigen. Im Gegensatz hierzu zeigten sich nach pulsatiler Reperfusion signifikant erhöhter Perfusatfluss, sowie verbesserter Vasoreagibilität und eine etwa 3-fach höhere Kreatinin-Clearance. (119) Dieses Geschehen scheint auf molekularer Ebene durch eine direkte **Scherstress-vermittelte Stimulation der NO-Synthetase** und Inhibition der Endothelin-1 Sekretion durch Phosphorylierung über eine endotheliale Proteinkinase vermittelt zu sein.

Es konnten deutliche Einschränkungen der vaskulären Funktionalität bei statischer Reperfusion im Vergleich zur pulsatilen Perfusion beobachtet werden. Die Beobachtungen waren dabei weniger ausgeprägt bei direkter Perfusion der Organe ohne Phase einer ischämisch hypothermen Konservierung, möglicherweise da der Vorrat an verfügbarem NO durch entstehende Radikale bei Kryokonservierung negativ beeinflusst wird. Während das vaskuläre Endothel in vivo einem konstanten Scherstress durch pulsatilen Blutfluss ausgesetzt ist, fehlt dieser Stimulus der endothelialen **NO-Synthetase** und Inhibitor der Endothelin 1 Sekretion im isoliert statisch perfundierten Organmodell, wodurch es zur endothelialen Dysfunktion kommen kann. (119)

Diese Annahme deckt sich mit unserer Beobachtung einer mutmaßlich mangelnden NO-Sekretion nach Applikation von Acetylcholin. Es existieren darüber hinaus Belege für eine Verbesserung des lymphatischen Abflusses mit verringerter Ödembildung durch pulsatile Perfusion. (120) Die pulsatile (Re-)Perfusion stellt also mit Sicherheit den überlegenen Perfusionsmodus für unser Modell dar und kann möglicherweise einen entscheidenden Beitrag zum Erzielen physiologischer Flussraten sowie zum Erhalt der endothelialen Funktionalität beitragen.

### 2.5. Closed Loop System zur druckkonstanten Perfusion

Abschließend soll vor allem eine technische Verbesserungsmöglichkeit im Sinne der Implementation eines **Closed Loop System** zur direkten Kontrolle der Flussrate über den renalen Perfusionsdruck genannt werden. Bei dem bisher verwendeten System von AD-Instruments besteht keine Möglichkeit der Bereinigung des gemessenen Drucks um den **Eigenwiderstand des Apparats**. Für Perfusionen großer Gefäße, oder bei geringen Flussraten mag dies eine untergeordnete Rolle spielen. Bei IPMK etwa beträgt der so entstehende Fehler weniger als 10mmHg. Der Eigenwiderstand der von uns verwendeten PE-Kanülen beträgt jedoch bis zu  $10 \frac{\text{mmHg} \cdot \text{min}}{\text{ml}}$  bei Flussraten von bis zu  $15 \frac{\text{ml}}{\text{min}}$ . Es ist also durchaus realistisch, dass dieser **Fehler bis zu 60% des gemessenen Drucks** (entsprechend 150 mmHg) ausmacht.

Für die in dieser Arbeit beschriebenen Perfusionen wurde also in LabChart mittels arithmetischer Funktion der von der aktuellen Flussrate abhängige, tatsächliche Perfusionsdruck berechnet und der durch den Pump-Controller konstant gehaltene Gesamtdruck solange manuell angepasst, bis der Gefäßdruck stabil bei 100mmHg eingependelt war. Damit das möglich war, musste vor jeder Perfusion zunächst der geringgradig flussabhängige Eigenwiderstand des verwendeten Katheters für verschiedene Flussraten bestimmt werden und das Skript in LabChart während der Perfusion an die entsprechende

aktuelle Flussrate angepasst werden. In einem closed loop system ist eine **direkte Kommunikation des Skripts mit dem Pump Controller** möglich. Es besteht also keine Notwendigkeit den Perfusionsdruck kontinuierlich zu überwachen und anzupassen. Dies stellt zum einen eine Änderung dar, die die Untersuchungsbedingungen erleichtert, aber auch höhere Genauigkeit ermöglicht und größere Fluktuationen des Perfusionsdrucks vermeiden kann. Für die direkte Kommunikation zwischen LabChart und Pumpe müsste jedoch eine zusätzliche Schnittstelle geschaffen werden, die derzeit vom Hersteller nicht vorgesehen ist. Die einfachste Lösung stellt sicherlich der **Wechsel auf eine Steuereinheit** eines anderen Herstellers dar. Eine alternative Möglichkeit, die sich aus der Korrespondenz mit der Elektrowerkstatt der Universität Regensburg ergab, stellt das **Zwischenschalten eines Spannungswandler** zwischen Pump Controller und BridgeAmp dar, der über die Ausgangsspannung des Pump Controllers die aktuelle Flussrate ermittelt und die eingehende Spannung des Druckabnehmers entsprechend dem vorab festgelegtem flussabhängigen Widerstand anpasst. Schließlich sei noch eine weitere Möglichkeit genannt, die jedoch Bezug und Verwendung einheitlicher Kanülen notwendig macht. Dann nämlich ist die Implementierung eines zweiten Druckabnehmers in einen weiteren Perfusatkreislauf, der aus dem gleichen Schlauchsystem besteht, das Perfusat aber direkt in den Perfusatbehälter zurückfördert möglich. Aus diesem zweiten Kreislauf nämlich kann nun bei gleicher Fördermenge der reine Systemdruck bestimmt werden. Dieser muss anschließend lediglich vom Gesamtdruck im Perfusionskreislauf subtrahiert werden, um den Gefäßdruck zu erlangen.

### 3. Ausblick

#### 3.1. Aussagekraft, sowie Praktikabilität des Modells

Der in dieser Arbeit präsentierten Datenlage kann entnommen werden, dass es sich bei isoliert perfundierten Schweinenierenkeilen um eine mögliche Alternative zu isoliert perfundierten Mäuse- oder Rattennieren für Fragestellungen der renalen Endokrinologie handelt. Zum aktuellen Zeitpunkt werden mit dieser Methodik jedoch keine physiologischen Flussraten erreicht und es ist keine adäquate Vasoreaktion auf bekannte Stimuli zu erwarten. Ohne Zweifel weisen IPMK oder IPRK einige Vorteile gegenüber diesem neuen Modell auf. So gestaltet sich die Logistik hinter dem Versuchsaufbau bei Kleintieren aus eigener Aufzucht einfacher handhabbar, aber auch die Effektstärke und in einigen Fällen statistische Signifikanz ist selbst bei geringer Fallzahl überlegen. Auch bieten Nagetiermodelle eine breitere Auswahl

verschiedener Genotype, mit der Möglichkeit der Beeinflussung durch den Untersucher im Fall der IPMK. Bei IPPKS ist der Untersucher dabei auf rein physiologische Fragestellungen limitiert, sofern die Organe wie in unserem Fall von Wildtypen vom Schlachthof bezogen werden. Dennoch ist die Präparation bei Kleintierperfusionsen arbeitsintensiv und nur durch einen erfahrenen Untersucher sicher umsetzbar, was die Methodik in aller Regel denjenigen Arbeitsgruppen vorbehält, die sich spezifisch isolierten Organperfusionsen widmen und dadurch Untersuchungsaufbauten für kleine Fallzahlen erschwert. Die von uns präsentierte Methodik zur Perfusion von Gewebekeilen aber ist auch von unerfahrenen Untersuchern einfach erlernbar und die Durchführung von 3-4 Perfusionsen pro Tag, je nach Länge des jeweiligen Versuchsaufbaus, auch für fachfremde Arbeitsgruppen realistisch umsetzbar, sofern die logistischen Gegebenheiten geschaffen sind. Bei IPMK-Perfusionsen sind dagegen selten mehr als 2 Perfusionsen pro Tag auch durch erfahrene Untersucher umsetzbar. Auch die Organakquise gestaltet sich bei Gewebe von Schlachttieren sowohl wirtschaftlich als auch ethisch einfacher umsetzbar, zumal es sich bei Nieren häufig ohnehin um Schlachtabfälle handelt. Ebenso gestalten sich die bürokratischen Hindernisse, die sich bei Tierversuchen unausweichbar ergeben, einfacher als bei Versuchen an lebenden Tieren. Insgesamt können die niedrigere Effektstärke und geringere statistische Signifikanz also zumindest in Teilen durch höhere Fallzahlen ausgeglichen werden.

Klar überlegen ist das Schweinmodell der isoliert perfundierten Nagerniere im Bezug auf translationelle Fragestellungen, aufgrund der physiologischen, wie auch anatomischen Ähnlichkeiten, sowie des einfachen Bezugs von häufig als Schlachtabfall gewerteten Organen. Während die Perfusion vollständiger Schweinennieren bei einem Gewicht zwischen 150 und 200 g, sowie Flussraten von bis zu  $10 \frac{ml}{min}{g}$  (bei Nagermodellen) wirtschaftlich nicht im Single-Pass umsetzbar scheint, ermöglicht die Perfusion von 5-15g schweren Gewebekeilen diesen Perfusionsmodus selbst bei Verwendung von hochwertigen Perfusaten mit teuren Additiven. In unseren bislang durchgeführten Versuchen wurden Flussrate von  $15 \frac{ml}{min}$  im Normalfall nicht überschritten. Die Perfusion von Gewebekeilen legt also den Grundstein für die Perfusion von Organen eines weiten Spektrums verschiedener Spezies.

### **3.2. Flussunabhängige Beurteilbarkeit der rein rezeptorvermittelten Reninsekretion**

Bei weiterer Verbesserung des Setups, insbesondere einer Anpassung des Perfusats mit Sauerstoffträgern, sowie entsprechend notwendigen Anpassungen des Perfusionsapparats, scheint es durchaus realistisch zuverlässige Aussagen zur Vasoreaktivität ähnlich der

IPMK/IPRK treffen zu können. Doch auch sollten die geschilderten Optimierungsversuche keine nachvollziehbare Vasoreaktion zulassen, vermag das Modell in seinem derzeitigen Stand den alleinig rezeptorvermittelten Effekt verschiedener Modulatoren auf die Reninsekretion isoliert von indirektem Effekt durch Vasoreaktivität einer Betrachtung zugänglich zu machen. Aktuell nämlich präsentieren sich die Effekte verschiedener Interventionen auf die Reninsekretion in IPPKS nachvollziehbar und entsprechend der bekannten Datenlage bei isoliert perfundierten Mäuse- oder Rattennieren, während selbst potenteste vasoaktiv wirksame Mediatoren keinen Einfluss auf den Gefäßwiderstand auszuüben scheinen. Sofern es sich hierbei lediglich um einen Messfehler bei adäquater Vasoreaktion handelt, gilt es natürlich diese Missstände zu beseitigen. Auch aber darf das Potenzial dieser außergewöhnlichen Situation nicht verkannt werden. Der Effekt verschiedener Mediatoren auf die Reninsekretion kann über zwei verschiedene Pfade vermittelt werden. Zum einen direkt rezeptorvermittelt, etwa im Sinne einer direkten Hemmung der Reninsekretion im Falle von Angiotensin II, aber auch durch die hervorgerufene Vasoreaktion, also einer Vasokonstriktion im Fall von Ang II. Die isolierte Betrachtung des rezeptorvermittelten Effektes ist bisher Versuchen auf molekularer Ebene vorbehalten. Wie die Experimente zum Einfluss einer Änderung des Perfusionsdrucks auf die Reninsekretion in IPPKS zeigen konnten, existiert in diesem Modell scheinbar kein direkter Zusammenhang zwischen Perfusionsdruck und Reninsekretion. Demnach ermöglicht die Methodik in ihrer derzeitigen Form unter Umständen eine vollkommen isolierte Betrachtung des rezeptorvermittelten Effekts verschiedener Substanzen auf die Reninsekretion.

### **3.3. Übertragbarkeit auf den Organismus Mensch**

Die Perfusion von Nierensegmenten eröffnet die Methodik der isolierten Organperfusionen für eine Vielzahl verschiedener Spezies. Es darf aber nicht vergessen werden, dass dieses Modell spezifisch vor dem Hintergrund einer späteren Perfusion menschlichen Gewebes entworfen wurde. Dieses Material kann von totalen oder partiellen Nephrektomien, etwa bei Tumorpatienten gewonnen werden und gilt im Allgemeinen als Überschussmaterial der klinischen Diagnostik. Zwar beschränkt sich die Perfusion von Wildtyp Schweinenieren auf physiologische Fragestellungen, bei Perfusion menschlicher Gewebesegmente ist aber auch die detaillierte Betrachtung verschiedener systemischer, wie auch renaler Erkrankungen und deren Einfluss auf die Regulation der Reninsekretion möglich. Die Verwendung menschlichen Gewebes ermöglicht ein bislang ungekanntes Level der Translation und erlaubt einen

vollständigen Verzicht auf tierisches Gewebe. Aber auch humanisierte genetisch Veränderte Schweinenieren eröffnen das Modell spezifischen pathologischen Fragestellungen.

Aus enger Korrespondenz mit der Abteilung für Urologie des St-Josef-Klinikums Regensburg ergab sich aus rein technischer Sicht kein Hindernis für die Translation der Versuche auf menschliches Gewebe. Die Größe der bislang perfundierten Gewebssegmente sei gut mit dem tumorfreien Anteil totaler Nephrektomien vereinbar, der kaudale Pol menschlicher und porkiner Nieren weist darüber hinaus anatomisch in weiten Teilen Ähnlichkeit auf. Große urologische Abteilungen, wie sie an Universitäten oder deren Partnerkliniken häufig anzutreffen sind, führen häufig weit mehr als 100 Nephrektomien pro Jahr aus, wodurch eine konstante Quelle an Untersuchungsmaterial gegeben ist. Die Verwendung von partiellen Nephrektomien dagegen scheint, sowohl bürokratisch als auch ethisch schwerer umsetzbar, da hier im Gegensatz zum häufig als Überschussmaterial gehandhabten Gewebe der totalen Nephrektomien ein Interessenskonflikt zwischen klinischer Diagnostik, Patientenwohl und Forschungsinteressen unvermeidbar ist.

Zur Bewältigung der logistischen Hürden, die eine regelmäßige Perfusion menschlicher Gewebeproben mit sich bringt, ist eine tiefe Vernetzung der Arbeitsgruppe und urologischen Abteilung unabdingbar. Nur so können Perfusionen und OP-Plan synchronisiert werden, oder aber auch die Operationen so terminiert werden, dass multiple Gewebestücke an einem Tag bezogen werden können. Selbst ein erfahrener Untersucher aber wird selten auf die logistischen Voraussetzungen treffen, die die Durchführung von 3-4 Perfusionen menschlichen Gewebes pro Tag ermöglichen. Auch muss bedacht werden, dass interindividuelle anatomische oder physiologische Eigenheiten der Organe, wie auch ihrer Spender einen Einfluss auf die Vitalität der Perfusion haben und nicht jeder Gewebekeil suffizient perfundierbar ist. Andererseits ist es auch möglich, dass in Absprache mit den klinischen Kollegen mehr als ein Gewebekeil bei entsprechender Größe des Präparats bezogen werden könnte. Die isolierte Perfusion von menschlichem Nierengewebe ermöglicht also eine sinnvolle Verwendung von wertvollem humanen Material, das ansonsten häufig verworfen wird und leistet dabei einen Beitrag zum zunehmend an Bedeutung gewinnenden Tierschutz im Bereich der Grundlagenforschung.

## V. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde ein Perfusionsapparat zur druckkonstanten Perfusion renaler Gewebesegmente im Single-Pass Verfahren präsentiert. Es wurden Schweinenieren vom Schlachthof bezogen und Korrosionspräparate der intrarenalen Gefäßarchitektur angefertigt. Nach Determinierung eines für die Perfusion geeigneten Gefäßes wurden die Organe nach 4 verschiedenen Versuchsprotokollen perfundiert. Hierbei wurden der Effekt von Isoproterenol, Angiotensin II, EGTA, SNAP, Acetylcholin, Bumetanid und einer Änderung des Perfusionsdrucks auf die Flussrate, sowie Reninsekretion untersucht. Als Perfusionskontrolle wurden histologische Schnitte, sowie Korrosionspräparate der Organe post perfusionem angefertigt. Es konnte gezeigt werden, dass das Modell die wesentlichen physiologischen Funktionen der Niere in vivo, im Sinne der Reninregulation als essentieller Teil des renalen Hormonhaushalts, adäquat widerzuspiegeln vermag. Die isoliert perfundierten Schweinenierensegmente stellen daher eine mögliche Alternative zur isolierten Perfusion ganzer Nieren, wie etwa der isoliert perfundierten Mäuse- oder Rattenniere dar. Die Datenlage der oben genannten Modelle war im Bezug auf die Reninregulation replizierbar, wenn auch weniger ausgeprägt. Die Perfusion der Organe von Schlachttieren bietet darüber hinaus wirtschaftliche und ethische Vorteile gegenüber Labortieren. Bislang konnte keine funktionsfähige Vasoreagibilität etabliert werden und es bestehen Hinweise auf eine endotheliale Dysfunktion. Aus Gründen der besseren Replikation ist das bisher verwendete Setup aber sehr simplistisch gehalten und eröffnet sich einer Auswahl an Optimierungen, je nach gewünschter Fragestellung. Die Perfusion unvollständiger Organe ermöglicht so die wirtschaftliche Perfusion von Organen einer Vielzahl von Spezies, am bemerkenswertesten auch des Menschen. Aus Rücksprache mit unseren urologischen Kollegen ergab sich die Eignung der totalen Nephrektomie-Präparate, die häufig als Überschussmaterial nach klinischer Diagnostik verworfen werden, für derartige Perfusionsversuche. Bei zunehmender Bedeutungsschwere des Tierschutzes in der Grundlagenforschung stellt dieses Modell eine attraktive Alternative zu bislang etablierten Modellen der isolierten Organperfusion dar und vermag bei entsprechender Optimierung aufgrund seiner einfachen und kostengünstigen Implementierung die Lücke nach einer geeigneten isolierten Organpräparation für kleine Fallzahlen zu decken. Wertvolles menschliches Gewebe kann so einem sinnvollen wissenschaftlichen Zweck zugeführt, anstatt als Überschuss verworfen zu werden.

## VI. Anhang

### 1. Korrosionspräparate der Perfusionen

21.04.2021 09:00



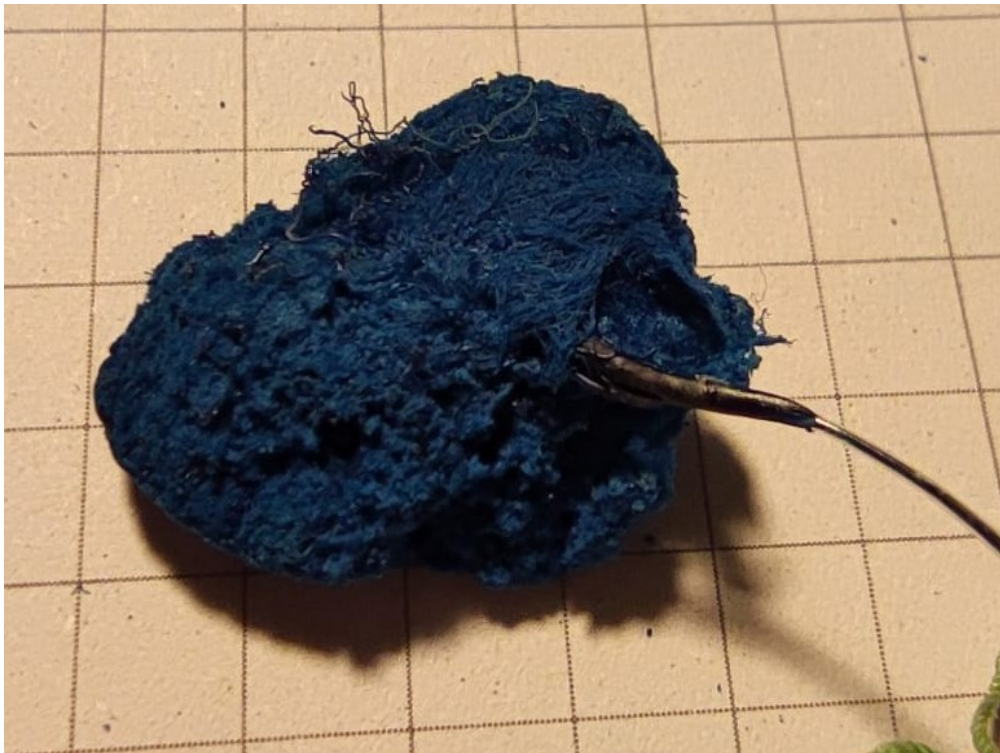
*Abbildung 49 Korrosionspräparat 21.04.2021 9:00  
Innerer Durchmesser des kanülierten Gefäßes: 0,88 mm*

26.04.2021 14:30



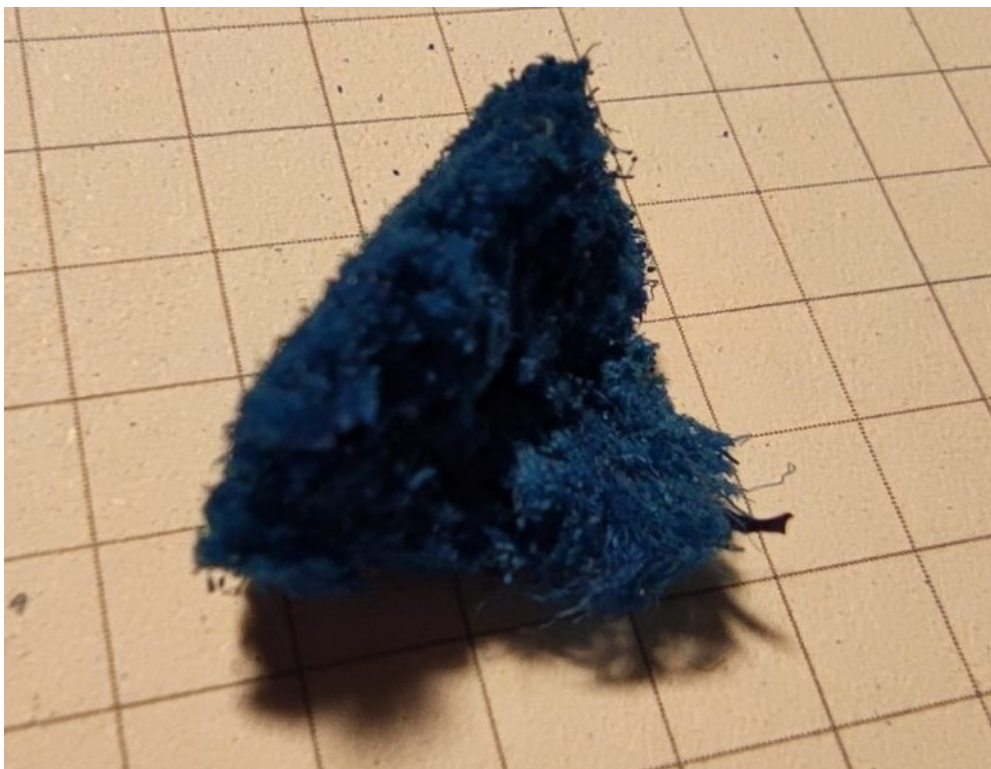
*Abbildung 50 Korrosionspräparat 26.04.2021 14:30  
Innerer Durchmesser des kanülierten Gefäßes: 0,58 mm*

03.05.2021 14:30



*Abbildung 51 Korrosionspräparat 03.05.2021 14:30  
Innerer Durchmesser des kanülierten Gefäßes: 0,76 mm*

10.05.2021 08:10



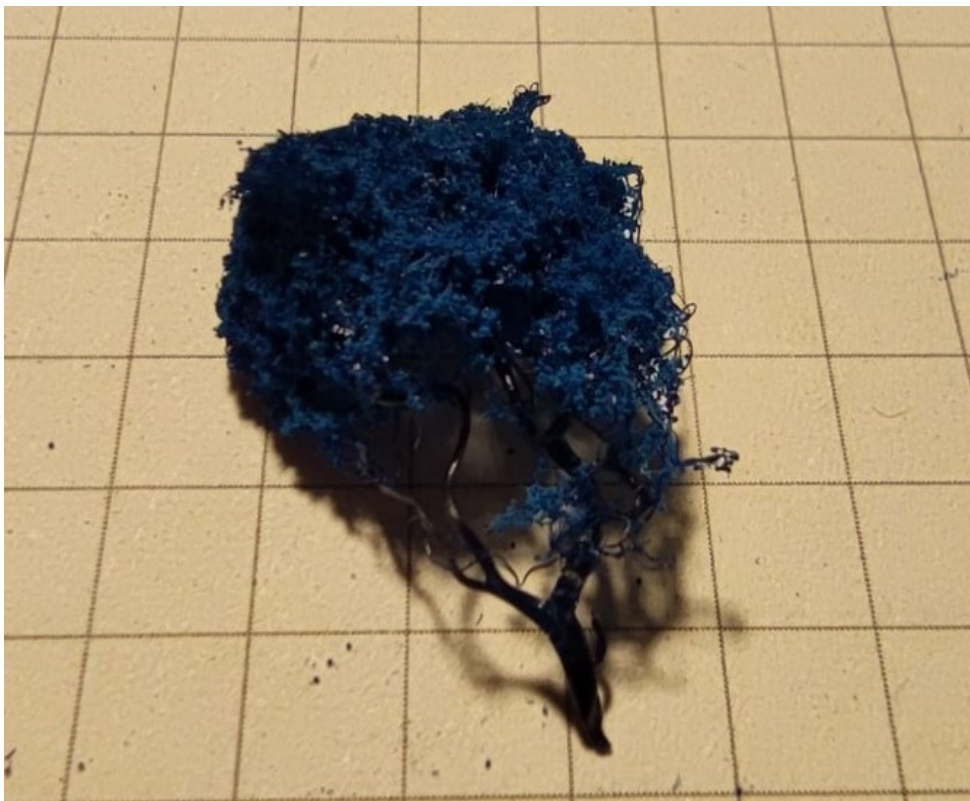
*Abbildung 52 Korrosionspräparat 10.05.2021 08:10  
Innerer Durchmesser des kanülierten Gefäßes: 0,91mm*

25.05.2021 07:30



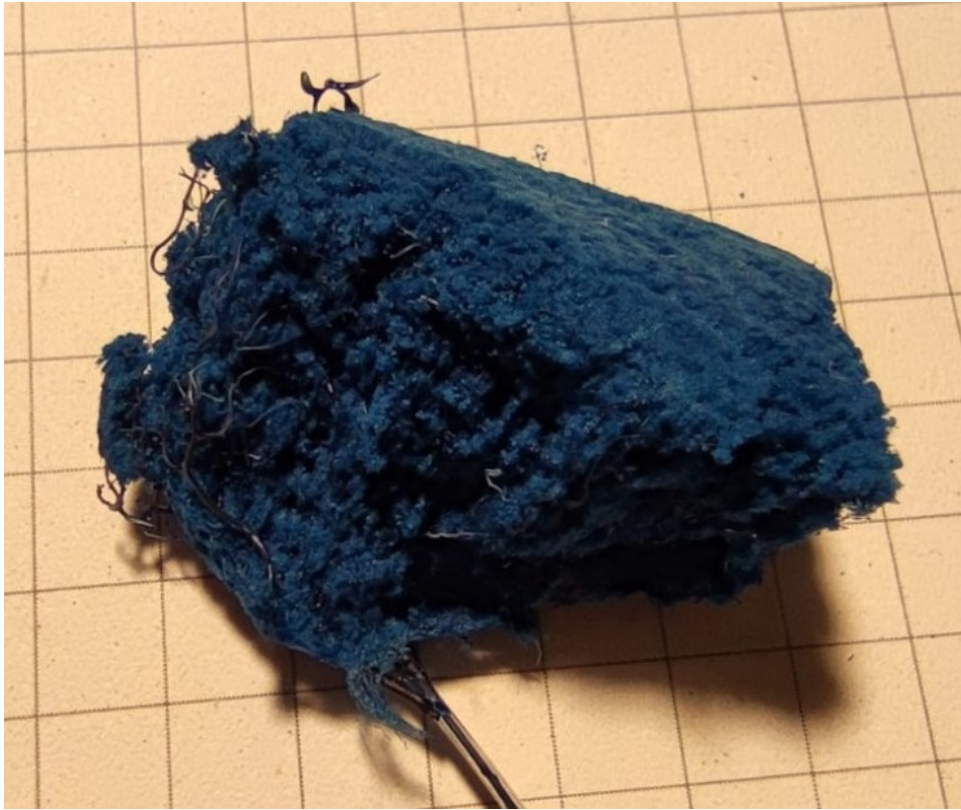
*Abbildung 53 Korrosionspräparat 25.05.2021 07:30  
Innerer Durchmesser des kanülierten Gefäßes: 1,10mm*

25.5.2021 13:30



*Abbildung 54 Korrosionspräparat 25.05.2021 13:30  
Innerer Durchmesser des kanülierten Gefäßes: 0,80mm*

25.05.2021 16:30



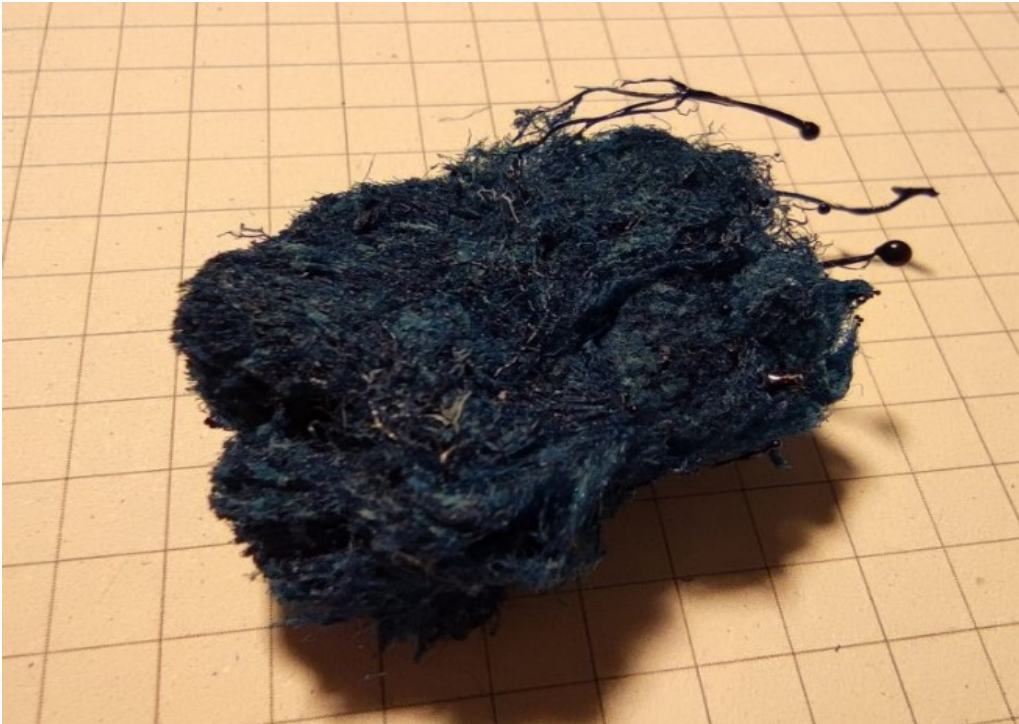
*Abbildung 55 Korrosionspräparat 25.05.2021 16:30  
Innerer Durchmesser des kanülierten Gefäßes: 1,27mm*

28.06.2021 6:50



*Abbildung 56 Korrosionspräparat 28.06.2021 06:50  
Innerer Durchmesser des kanülierten Gefäßes: 1,14mm*

30.06.2021 18:10



*Abbildung 57 Korrosionspräparat 30.06.2021 18:10  
Innerer Durchmesser des kanülierten Gefäßes: 1,28mm*

## **2. Ausgeschlossene Perfusionen**

### **2.1. Protokoll I**

Um die Dynamik im Fluss der ausgeschlossenen Perfusionen zu zeigen wurden die Flusswerte pro Minute erhoben. Die Reninwerte wurden alle 2 Minuten erhoben und in der Graphik die jeweils letzten 3 Werte angegeben.

Perfusionen 1 und 2 vom 07.06., sowie Perfusion 2 vom 09.06. wurden bei unplausibel schnell erreichtem Flussplateau, als Zeichen von Leakage, ausgeschlossen. In Perfusion 1 vom 09.06. wurde das Plateau dagegen erst nach über einer Stunde erreicht, es wurde also von einer ungünstigen Lage der Kanüle ausgegangen. Perfusion 4 vom 30.06. wurde trotz stetig steigender Reninwerte bei guter Ansprache des Flusses auf Interventionen und erfüllten Gütekriterien (s. II.1.1.7.) inkludiert.

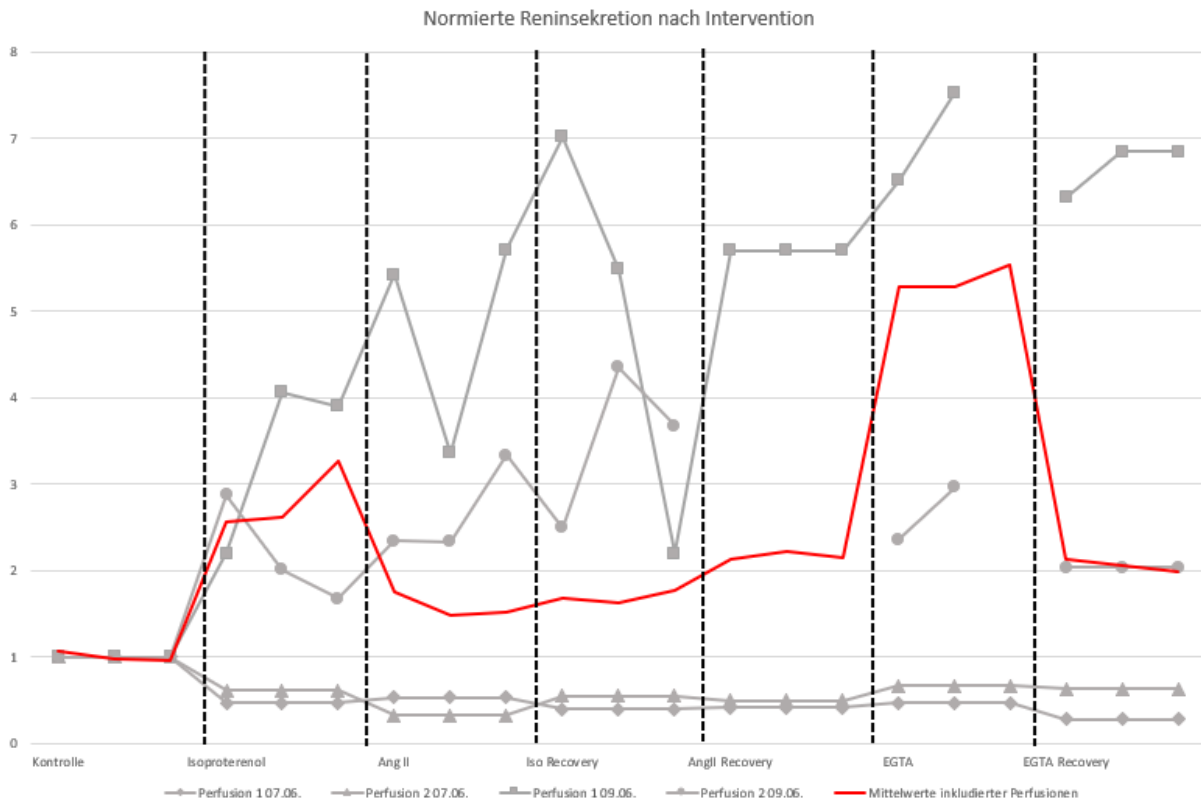


Abbildung 58 Normierte Reninsekretion der ausgeschlossenen Perfusionen Protokoll I nach Intervention

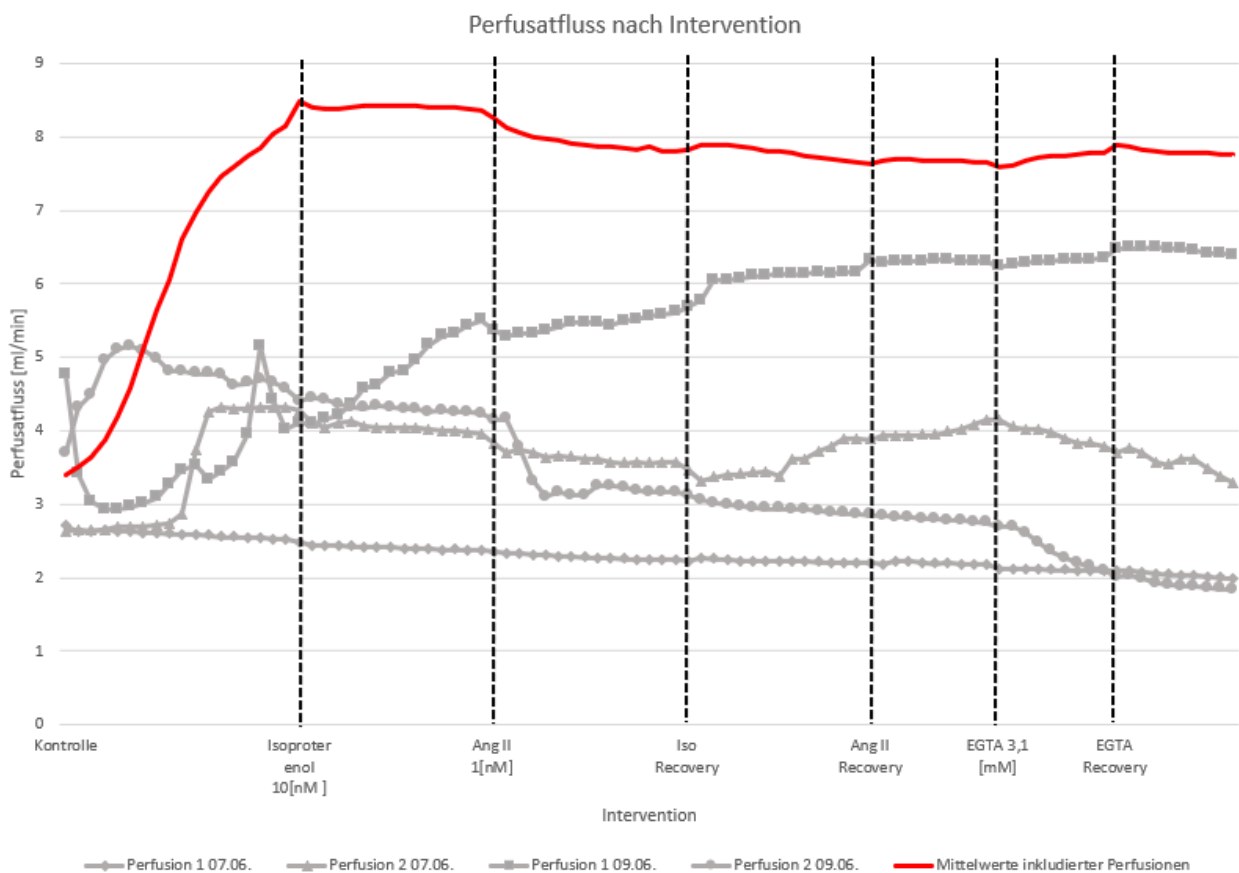


Abbildung 59 Absoluter Perfusatfluss der ausgeschlossenen Perfusionen Protokoll I nach Intervention

## 2.2. Protokoll II

Perfusion 3 vom 05.07. wurde wegen interventionsunabhängig extrem niedrigen Reninsekretionswerten von der Auswertung ausgeschlossen. Weiterhin traten bei der vierten Perfusion vom 05.07., sowie bei der ersten Perfusion vom 07.07. ausgeprägte Spontanooszillationen des Flusses auf, die eine zuverlässige Ermittlung der Reninsekretion nicht erlaubten, weswegen auch diese Perfusionen exkludiert werden mussten. Die Ursache für die Spontanooszillation am 05.07. ist ungeklärt, während die Oszillation am 07.07. mutmaßlich der Verwendung eines inline Membranfilters zuzuschreiben ist.

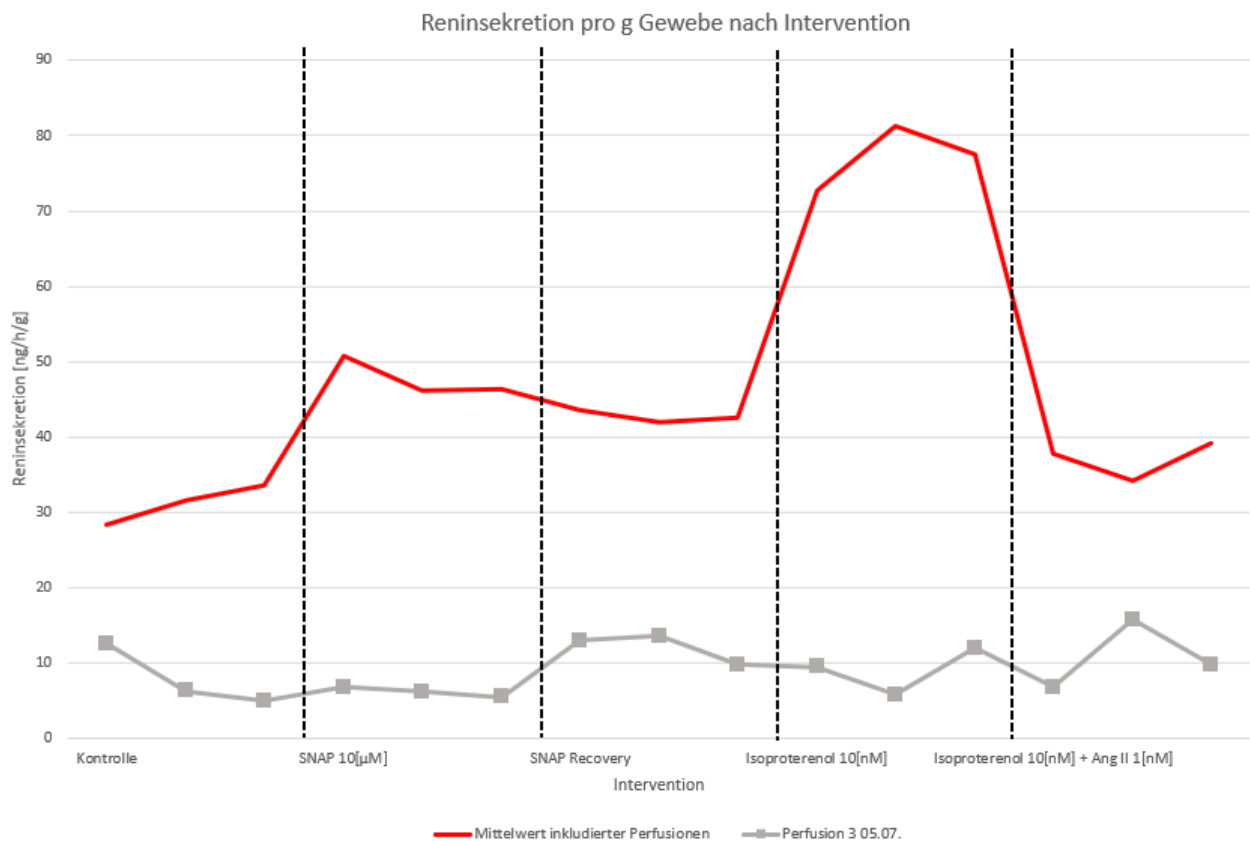


Abbildung 60 Reninsekretion pro g Gewebe der ausgeschlossenen Perfusionen Protokoll II nach Intervention

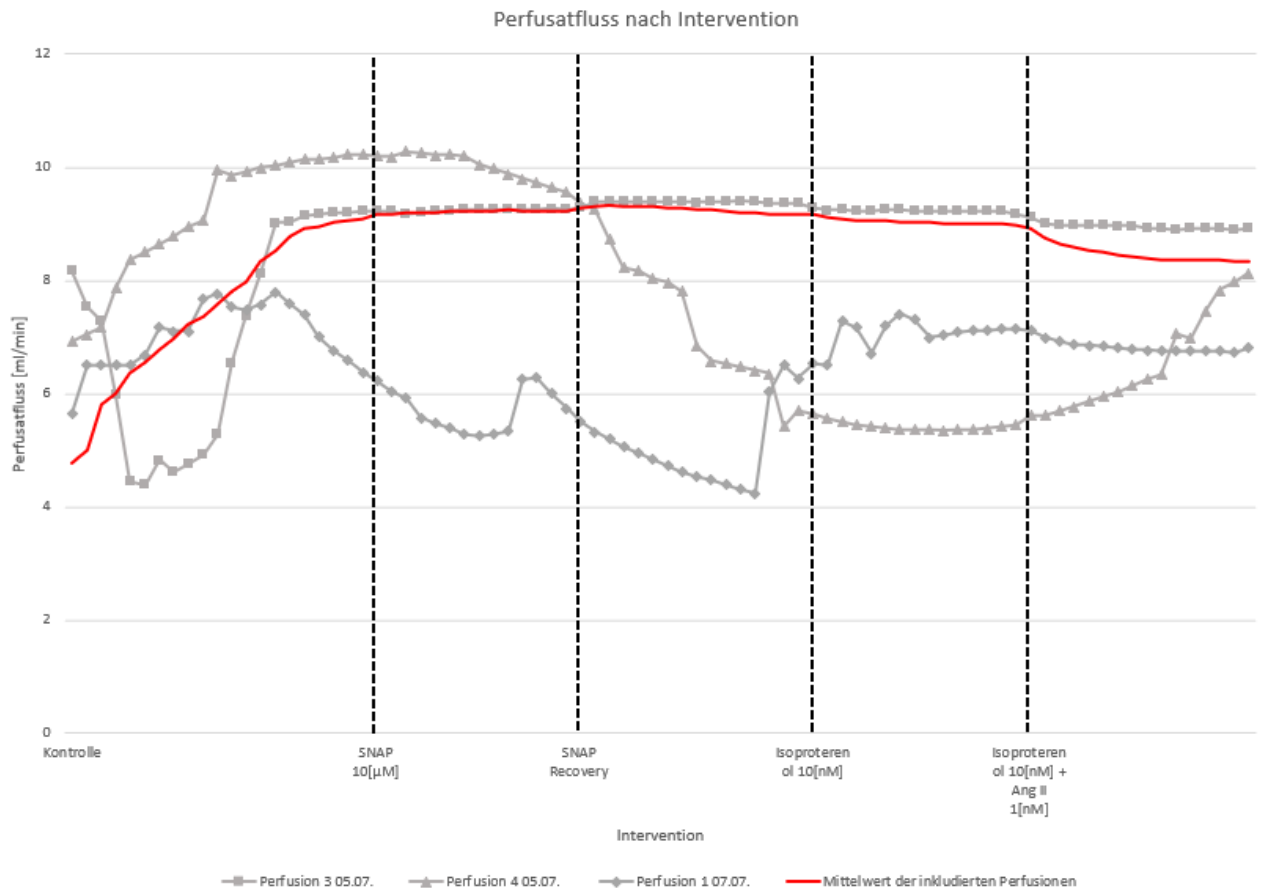


Abbildung 61 Absoluter Perfusatfluss der ausgeschlossenen Perfusionen des Protokolls II nach Intervention

## VII. Materialien und Geräte

### 1. Reagenzien

<u>Produktbezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
Acetylcholin-Chlorid	Sigma Aldrich
ADH/LVP	Sigma Aldrich
Aminoplasmal	Braun
Ampicilling	Ratiopharm
Angiotensin-II human	Sigma Aldrich
Bumetanid	Sigma Aldrich
CaCl · 2H <sub>2</sub> O	Carl Roth
CaCl <sub>2</sub>	Merck
Carbogen Lab	Linde
Kreatinin	Merck
Dextran from Leuconostoc mesenteroides [Avg. mol wt. 150.000]	Sigma Aldrich
EDTA	Merck
EGTA	Sigma Aldrich
Eisessig	Merck
Eosin	Merck
Epoxidharz E20 Plus Blau Epoxidharz-Aminhärter E20 Plus	Biodur
Ethanol	Carl Roth
Evans Blue	Sigma Aldrich
Flucloxacillin	Actavis
Paraformaldehyd	Sigma Aldrich
Glucose	Merck
HCl	Carl Roth
Hepes	Carl Roth
Isopropanol	Carl Roth
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 3H <sub>2</sub> O	Merck
KCl	Merck
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck
KOH	Sigma Aldrich
Maleinsäure	Merck
Mannitol	Sigma Aldrich
Mayer's Hämalaun	Merck
Methanol	Fisher Scientific
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	Merck

MgCl <sub>2</sub>	Sigma Aldrich
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	Merck
Na-2-Oxyglutamat	Sigma Aldrich
NaCl	Carl Roth
Na-Glutamat · H <sub>2</sub> O	Merck
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	Merck
NaHCO <sub>3</sub>	Merck
Na-Laktat	Sigma Aldrich
Na-Malat	Sigma Aldrich
NaOH	Fisher Scientific
Na-Pyruvat	Fisher Scientific
Parrafin	Leica
Roti-Histol	Carl Roth
SNAP	Sigma Aldrich / Cayman Chemical
Tris	Carl Roth
Urea	Fluka Biochemika
Xylol	Carl Roth

## 2. Verbrauchsmaterialien

<b><u>Materialbezeichnung</u></b>	<b><u>Hersteller oder Lieferant</u></b>
Aqua Care Wasserbadkonzentrat AC10	Hartenstein
Clip-On BP Domes MLA844	ADInstruments/Memscap
Deckgläser	Hartenstein
Dreiwegehahn Discifix-3	Braun
Einbettkassetten	Hartenstein
Falcon-Tube 15ml Falcon-Tube 50ml	Sarstedt
Helipur® H plus N Desinfektionsmittel	Hartenstein
In-Line Luer Injection Port	Ibdi
Kanülen 18G	Sterican
Kanülen 20G	Microlance
Kanülen 22G	Neopoint
Kanülen 25G	Neobject
Kanülen SUS304; 0,4445x0,508mm	Teshima
Labomedic Medizinschlauch 1,6x3,2mm	KronLab
Ligaturen	Santa Lucia
Mikrotomklingen	Leica
Objektträger	Hartenstein
PE-Tubing 800/110/300/100; 1,02x1,98mm PE-Tubing 800/110/160/100; 0,50x1,00mm	Portex

Petrischalen	Sarstedt
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nerbe
Reagiergefäß 1,5-5ml	Sarstedt, Nerbe
Schlauch PharMed Ismaprene ID: 1,14mm; 1,52mm; 2,79mm;	Ismatec
Schlauch Tygon Standard R-3607 ID: 0,13mm; 1,85mm ID	Ismatec
Serologische Pipetten (5-25ml)	Sarstedt; Nerbe
Skalpellklingen	Herenz
Spritze Plastipak 1ml	Becton Dickinson
Spritze 10ml	Braun
Spritze 20ml	Becton Dickinson
Spritze Luer 10ml	Becton Dickinson
Syringe-Filter 0,8µm	Nalgene
Syringe-Filter 5µm	Schleicher & Schuell

### 3. Lösungen und Kits

Angiotensin I ELISA	IBL International
---------------------	-------------------

### 4. Laborgerätschaften

Druckabnehmer SP844	Memscap
Druckeichgerät nach Prof. O.H. Gauer	Eigenbau (Ing. Büro Diefenbach, Ffm.)
Glasware: Bechergläser	Schott
Messkolben, Messzylinder, Trichter	Brand
Halbmikrowaage Secura125-1S	Sartorius
Halogen-Kaltlichtquelle 1500 LCD	Schott
Kaltlichtquelle CL1500 Eco	Zeiss
Kamera EOS 1000D	Canon
Kameraadapter T2-T2 DSLR 1,6x 426115	Zeiss
Laborabzug nach DIN EN 14175	Vinitex
Lichtmikroskop Primo Star	Zeiss

OP-Mikroskop Stereo-Mikroskop Discovery V8	
Microplate Reader Sunrise	Tecan
Mikrowellenofen LMW1	Panasonic
OP-Besteck: Pinzette Dumont Inox #7, #7B Skalpellhalter #4 Schere 14084-08 Klammern: 18039-45, 18038-45; 18051-35, 18050-35; 18055-02, 18055-04; Klammerapplikator 18057-14	FST
pH-Meter 766 Calimatic	Knick
Mikroprozessor-pH-Meter Multi-Calimatic pH Sensor	Knick
Pipetten, Dispenser	Eppendorf, Gilson
Elektrische Pipette Xplorer 100µl Elektrische Pipette Xplorer 300µl Multipette M4	Eppendorf
Titertek 8-Kanal Pipette	Flow Laboratories
Pipettierhilfe accu-jet pro	Brand
PowerLab 4/35 Bridge Amp FE221 STH Pump Controller	ADInstruments
Präzisionswaage KB 2000-2N Schulwaage EMB 200-3	Kern
Rollpumpe Reglo Analog MS-4/8 MS/CA Kassetten mit Anpresshebel	Ismatec
Rührplattform Maxi-M1	Janke & Kunkel
Schüttelplattform DOS-10L	neoLab
Stoppuhr	Greiner-bio-one
Tischzentrifuge Typ UJO 46656	Heraeus Christ
Tuberacks	Hartenstein
Vortex-Mixer REAX-2000 Vortex Genie 2	Heidolph neoLab

Vortex-Mixer mit Zentrifuge	neoLab
Wasseraufbereitungssystem Milli-Q Direct	Merck
Wasserbad B3 mit Pumpe DC1	Haake Fision
Wasserbad 18P	
Wärmeschrank	Binder
Wärmeschrank	Memmert
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf
Zentrifuge 5427R	

## 5. Software

Labchart V8.1.19	AD Instruments
Office 16 Excel	Microsoft
Windows 10 Pro 22H2	Microsoft
Graph Pad Prism V.5	Graphpad Software Inc.
xFluor 4	Tecan
Acrobat Read DC	Adobe
Mikroskopier-Software Zen Blue	Zeiss
Citavi 6.15	Swiss Academic Software
PubMed	NCBI

## VIII. Literaturverzeichnis

1. Hemingway A. Some observations on the perfusion of the isolated kidney by a pump. *J Physiol* 1931; 71(2):201–13. doi: 10.1113/jphysiol.1931.sp002726.
2. Brodie TG, Cullis WC. An apparatus for the perfusion of the isolated mammalian heart. *J Physiol* 1908; 37(4):337–40. doi: 10.1113/jphysiol.1908.sp001275.
3. Jacobj C. Apparat zur Durchblutung isolirter überlebender Organe. *Archiv f. experiment. Pathol. und Pharmakol.* 1890; 26:S. 388–400.
4. Nizet A. The isolated perfused kidney: possibilities, limitations and results. *Kidney Int* 1975; 7(1):1–11. doi: 10.1038/ki.1975.1.
5. Schurek H-J. A laboratory manual of kidney perfusion techniques. [1. aktuelle Auflage]. [Münster]: MV Wissenschaft; 2017. (Wissenschaftliche Schriften der WWU Münster : Reihe 5Band 6).
6. Fuller BJ, Pegg DE, Walter CA, Green CJ. An isolated rabbit kidney preparation for use in organ preservation research. *J Surg Res* 1977; 22(2):128–42. doi: 10.1016/0022-4804(77)90052-x.
7. Czogalla J, Schweda F, Loffing J. The Mouse Isolated Perfused Kidney Technique. *J Vis Exp* 2016; (117). doi: 10.3791/54712.
8. Kulatilake AE. Isolated perfusion of canine and human kidneys. *Br J Surg* 1967; 54(10):877–82. doi: 10.1002/bjs.1800541021.
9. Frangogiannis NG. Why animal model studies are lost in translation. *J Cardiovasc Aging* 2022; 2(2). doi: 10.20517/jca.2022.10.
10. BAuA. TRBA 100 Schutzmaßnahmen für Tätigkeiten mit biologischen Arbeitsstoffen in Laboratorien; 2013. Verfügbar unter: <https://www.baua.de/DE/Angebote/Rechtstexte-und-Technische-Regeln/Regelwerk/TRBA/TRBA-100.html>.
11. Zentrale Ethikkommission. Die (Weiter-)Verwendung von menschlichen Körpermaterialien für Zwecke medizinischer Forschung; 2003. Verfügbar unter: <https://www.zentrale-ethikkommission.de/stellungnahmen/koerpermaterialien/>.
12. Wallace MA. Anatomy and physiology of the kidney. *AORN J* 1998; 68(5):800, 803-16, 819-20; quiz 821-4. doi: 10.1016/s0001-2092(06)62377-6.

13. Glodny B, Unterholzner V, Taferner B, Hofmann KJ, Rehder P, Strasak A et al. Normal kidney size and its influencing factors - a 64-slice MDCT study of 1.040 asymptomatic patients. *BMC Urol* 2009; 9:19. doi: 10.1186/1471-2490-9-19.
14. Molina DK, DiMaio VJM. Normal organ weights in men: part II-the brain, lungs, liver, spleen, and kidneys. *Am J Forensic Med Pathol* 2012; 33(4):368–72. doi: 10.1097/PAF.0b013e31823d29ad.
15. Molina DK, DiMaio VJM. Normal Organ Weights in Women: Part II-The Brain, Lungs, Liver, Spleen, and Kidneys. *Am J Forensic Med Pathol* 2015; 36(3):182–7. doi: 10.1097/PAF.0000000000000175.
16. Aumüller G, Aust G, Engele J, Kirsch J, Hrsg. *Anatomie (Duale Reihe)*. 3. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2014.
17. Fine H, Keen EN. The arteries of the human kidney. *J Anat* 1966; 100(Pt 4):881–94.
18. Pollak MR, Quaggin SE, Hoenig MP, Dworkin LD. The glomerulus: the sphere of influence. *Clin J Am Soc Nephrol* 2014; 9(8):1461–9. doi: 10.2215/CJN.09400913.
19. Silbernagl S, Despopoulos A, Hrsg. *Taschenatlas Physiologie*. 8. überarb. und erw. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2012.
20. Mederos y Schnitzler M, Storch U, Meibers S, Nurwakagari P, Breit A, Essin K et al. Gq-coupled receptors as mechanosensors mediating myogenic vasoconstriction. *EMBO J* 2008; 27(23):3092–103. doi: 10.1038/emboj.2008.233.
21. Carlström M, Wilcox CS, Arendshorst WJ. Renal autoregulation in health and disease. *Physiol Rev* 2015; 95(2):405–511. doi: 10.1152/physrev.00042.2012.
22. Staden H von, Chalcedonius H. Herophilus. *The art of medicine in early Alexandria*. Cambridge: Cambridge University Press; 2004.
23. Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft. Daten zur Verwendung von Versuchstieren im Jahr 2019; 2020 [Stand: 03.04.2023]. Verfügbar unter: <https://www.bmel.de/DE/themen/tiere/tierschutz/versuchstierzahlen2019.html>.
24. Walters EM, Wells KD, Bryda EC, Schommer S, Prather RS. Swine models, genomic tools and services to enhance our understanding of human health and diseases. *Lab Anim (NY)* 2017; 46(4):167–72. doi: 10.1038/labani.1215.

25. Gutierrez K, Dicks N, Glanzner WG, Agellon LB, Bordignon V. Efficacy of the porcine species in biomedical research. *Front Genet* 2015; 6:293. doi: 10.3389/fgene.2015.00293.
26. Walters EM, Prather RS. Advancing swine models for human health and diseases. *Mo Med* 2013; 110(3):212–5.
27. Huppertz ND, Tolba RH, Grosse JO. Micturition in Göttingen minipigs: first reference in vivo data for urological research and review of literature. *Lab Anim* 2015; 49(4):336–44. doi: 10.1177/0023677215570993.
28. Swindle MM, Makin A, Herron AJ, Clubb FJ, Frazier KS. Swine as models in biomedical research and toxicology testing. *Vet Pathol* 2012; 49(2):344–56. doi: 10.1177/0300985811402846.
29. Pereira-Sampaio MA, Favorito LA, Sampaio FJB. Pig kidney: anatomical relationships between the intrarenal arteries and the kidney collecting system. Applied study for urological research and surgical training. *J Urol* 2004; 172(5 Pt 1):2077–81. doi: 10.1097/01.ju.0000138085.19352.b5.
30. Pereira-Sampaio M, Favorito LA, Henry R, Sampaio FJB. Proportional analysis of pig kidney arterial segments: differences from the human kidney. *J Endourol* 2007; 21(7):784–8. doi: 10.1089/end.2006.0318.
31. Hollenberg NK. Implications of species difference for clinical investigation: studies on the renin-angiotensin system. *Hypertension* 2000; 35(1 Pt 2):150–4. doi: 10.1161/01.hyp.35.1.150.
32. Wang W, Liang TC. Substrate specificity of porcine renin: P1', P1, and P3 residues of renin substrates are crucial for activity. *Biochemistry* 1994; 33(48):14636–41. doi: 10.1021/bi00252a032.
33. Natesh R, Schwager SLU, Sturrock ED, Acharya KR. Crystal structure of the human angiotensin-converting enzyme-lisinopril complex. *Nature* 2003; 421(6922):551–4. Verfügbar unter: <https://www.nature.com/articles/nature01370>.
34. Atlas SA. The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition. *J Manag Care Pharm* 2007; 13(8 Suppl B):9–20. doi: 10.18553/jmcp.2007.13.s8-b.9.
35. PubChem. PubChem Compound Summary for CID 3082042, Angiotensin III: National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004 [Stand:

- 2023 Apr. 12]. Verfügbar unter:  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Angiotensin-III>.
36. Speckmann E-J, Hescheler J, Köhling R, Alzheimer C, Hrsg. Physiologie. 6. Aufl. München: Elsevier Urban & Fischer; 2013.
  37. Booth RE, Johnson JP, Stockand JD. Aldosterone. *Adv Physiol Educ* 2002; 26(1-4):8–20. doi: 10.1152/advan.00051.2001.
  38. Funder JW. New biology of aldosterone, and experimental studies on the selective aldosterone blocker eplerenone. *Am Heart J* 2002; 144(5 Suppl):S8-11. doi: 10.1067/mhj.2002.129971.
  39. Schweda F, Friis U, Wagner C, Skott O, Kurtz A. Renin release. *Physiology (Bethesda)* 2007; 22:310–9. doi: 10.1152/physiol.00024.2007.
  40. Kurtz A. Renin release: sites, mechanisms, and control. *Annu Rev Physiol* 2011; 73:377–99. doi: 10.1146/annurev-physiol-012110-142238.
  41. Kurtz A. Control of renin synthesis and secretion. *Am J Hypertens* 2012; 25(8):839–47. doi: 10.1038/ajh.2011.246.
  42. Schnermann J, Briggs JP. Tubular control of renin synthesis and secretion. *Pflugers Arch* 2013; 465(1):39–51. doi: 10.1007/s00424-012-1115-x.
  43. Le Gallois JJ. Expériences sur le principe de la vie; notamment sur celui des mouvemens du coeur, et sur le siège de ce principe: suivies du rapport fait à la première classe de l'Institut sur celles relatives aux mouvemens du coeur. Chez D'Hautel, A Paris 1812:S.129-138.
  44. Loebbel CE. De Conditionibus, quibus secretionis in glandulis perficiuntur.: Dissertatio. Universität Marburg 1849.
  45. Bidder E. Beiträge zur Lehre von der Function der Nieren.: Dissertation. Kaiserliche Universität zu Dorpat, Estland: Universität Tartu 1862.
  46. Skutul K. Über Durchströmungsapparate. *Pflüger, Arch.* 1908; 123(4-6):249–73. Verfügbar unter: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01677749>.
  47. Béguin P, Crambert G, Guennoun S, Garty H, Horisberger JD, Geering K. CHIF, a member of the FXYD protein family, is a regulator of Na,K-ATPase distinct from the gamma-subunit. *EMBO J* 2001; 20(15):3993–4002. doi: 10.1093/emboj/20.15.3993.

48. Bunge G, Schmiedeberg O. Ueber die Bildung der Hippursäure. *Archiv f. experiment. Pathol. u. Pharmakol* 1876; 6(3-4):233–55. Verfügbar unter: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01830969>.
49. Schmidt A. Die Athmung innerhalb des Blutes: Zweite Abhandlung. *Arbeiten aus der Physiologischen Anstalt zu Leipzig*: 1867:99–130.
50. Ludwig C, Schmidt A. Das Verhalten der Gase, welche mit dem Blut durch den reizbaren Säugethiermuskel strömen. *Arbeiten aus der physiologischen Anstalt zu Leipzig* 1868; 3:1–61.
51. Jacobj C, Sobieranski vW. Ueber das Functionsvermögen der künstlich durchbluteten Niere. *Archiv f. experiment. Pathol. U. Pharmakol.* 1891; 19:25–40.
52. Jacobj C. Ein Beitrag zur Technik der künstlichen Durchblutung überlebender Organe. *Archiv f. experiment. Pathol. U. Pharmakol.* 1895; 36:330–48.
53. Boettcher W, Merkle F, Weitkemper H-H. History of extracorporeal circulation: the conceptional and developmental period. *J Extra Corpor Technol* 2003; 35(3):172–83.
54. Hemingway A. A comparison of methods used for oxygenating blood in perfusion experiments. *J Physiol* 1931; 72(3):344–8. doi: 10.1113/jphysiol.1931.sp002778.
55. SCHIMASSEK H. Perfusion of isolated rat liver with a semi-synthetic medium and control of liver function. *Life Sci* (1962) 1962; 1:629–34. doi: 10.1016/0024-3205(62)90096-6.
56. WEISS C, PASSOW H, ROTHSTEIN A. Autoregulation of flow in isolated rat kidney in the absence of red cells. *Am J Physiol* 1959; 196(5):1115–8. doi: 10.1152/ajplegacy.1959.196.5.1115.
57. Gayle WE. Isolated Organ Perfusion: Physiology and Application. *MCV* 1969; 4(Q 5):173–81.
58. Cohen BE, Folkman M. Cell death and the measurement of oxygen consumption in the isolated perfused organ.: In: *Organ Perfusion and Preservation*. New York: Appleton Century-Crofts 1968:471–86.
59. Daniel CR, Labens R, Argyle D, Licka TF. Extracorporeal perfusion of isolated organs of large animals - Bridging the gap between in vitro and in vivo studies. *ALTEX* 2018; 35(1):77–98. doi: 10.14573/altex.1611291.

60. Maack T. Physiological evaluation of the isolated perfused rat kidney. *Am J Physiol* 1980; 238(2):F71-8. doi: 10.1152/ajprenal.1980.238.2.F71.
61. Berkowitz HD, Miller LD, Itskovitz HD. Renal function and the renin-angiotensin system in the isolated perfused kidney. *Am J Physiol* 1967; 213(4):928–34. doi: 10.1152/ajplegacy.1967.213.4.928.
62. Schurek HJ, Neumann KH, Schweda F, Czogalla J., Hrsg. Laborhandbuch Nierenperfusion. Reihe V, Band 5; 2015.
63. Ross BD. The isolated perfused rat kidney. *Clin Sci Mol Med Suppl* 1978; 55(6):513–21. doi: 10.1042/cs0550513.
64. Epstein FH, Brosnan JT, Tange JD, Ross BD. Improved function with amino acids in the isolated perfused kidney. *Am J Physiol* 1982; 243(3):F284-92. doi: 10.1152/ajprenal.1982.243.3.F284.
65. Gimbrone MA, Aster RH, Cotran RS, Corkery J, Jandl JH, Folkman J. Preservation of vascular integrity in organs perfused in vitro with a platelet-rich medium. *Nature* 1969; 222(5188):33–6. doi: 10.1038/222033a0.
66. Franke H, Mályusz M, Runge D. Improved sodium and PAH transport in the isolated fluorocarbon-perfused rat kidney. *Nephron* 1978; 22(4-6):423–31. doi: 10.1159/000181485.
67. Goodman MN, Parrilla R, Toews CJ. Influence of fluorocarbon emulsions on hepatic metabolism in perfused rat liver. *Am J Physiol* 1973; 225(6):1384–8. doi: 10.1152/ajplegacy.1973.225.6.1384.
68. Baines AD, Christoff B, Wicks D, Wiffen D, Pliura D. Cross-linked hemoglobin increases fractional reabsorption and GFR in hypoxic isolated perfused rat kidneys. *Am J Physiol* 1995; 269(5 Pt 2):F628-36. doi: 10.1152/ajprenal.1995.269.5.F628.
69. Schurek HJ, Alt JM. Effect of albumin on the function of perfused rat kidney. *Am J Physiol* 1981; 240(6):F569-76. doi: 10.1152/ajprenal.1981.240.6.F569.
70. Aldehni F, Tang T, Madsen K, Plattner M, Schreiber A, Friis UG et al. Stimulation of renin secretion by catecholamines is dependent on adenylyl cyclases 5 and 6. *Hypertension* 2011; 57(3):460–8. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.167130.

71. Schurek HJ. Application of the isolated perfused rat kidney in nephrology. *Contrib Nephrol* 1980; 19:176–90. doi: 10.1159/000428777.
72. Taft DR. The isolated perfused rat kidney model: a useful tool for drug discovery and development. *Curr Drug Discov Technol* 2004; 1(1):97–111. doi: 10.2174/1570163043484824.
73. Newton JF. Detoxication and Drug Metabolism: Conjugation and Related Systems: Volume 77 || [12] Isolated perfused rat kidney. *Methods Enzymol* 1981; 77:94–105.
74. Strieder T, Puelles VG, Vogt M, Buhl EM, Saritas T, Hausmann R et al. Effects of Perfusion Pressures on Podocyte Loss in the Isolated Perfused Mouse Kidney. *Cell Physiol Biochem* 2021; 55(S4):1–12. doi: 10.33594/000000355.
75. Wei J, Zhu J, Zhang J, Jiang S, Qu L, Wang L et al. Aging Impairs Renal Autoregulation in Mice. *Hypertension* 2020; 75(2):405–12. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.13588.
76. Rahgozar M, Guan Z, Matthias A, Gobé GC, Endre ZH. Angiotensin II facilitates autoregulation in the perfused mouse kidney: An optimized in vitro model for assessment of renal vascular and tubular function. *Nephrology (Carlton)* 2004; 9(5):288–96. doi: 10.1111/j.1440-1797.2004.00316.x.
77. Köhrmann KU, Back W, Bensemman J, Florian J, Weber A, Kahmann F et al. The isolated perfused kidney of the pig: new model to evaluate shock wave-induced lesions. *J Endourol* 1994; 8(2):105–10. doi: 10.1089/end.1994.8.105.
78. Hauet T, Faure JP, Baumert H, Bardou A, Gibelin H, Beguinot S, Germonville T, Hebrard W, Choulet P, Carretier M, Eugene M. Influence of different colloids on hemodynamic and renal functions: comparative study in an isolated perfused pig kidney model. *Transplant Proc.* 1998; 6(Sep;30):2796–7.
79. Bergsdorf T, Thüroff S, Chaussy C. The isolated perfused kidney: an in vitro test system for evaluation of renal tissue damage induced by high-energy shockwaves sources. *J Endourol* 2005; 19(7):883–8. doi: 10.1089/end.2005.19.883.
80. Peters K, Michel MS, Matis U, Häcker A. Das Modell der isolierten perfundierten Schweineniere zur Erforschung chirurgischer Therapieverfahren [The isolated perfused porcine kidney model for investigations concerning surgical therapy procedures]. *ALTEX* 2006; 23(3):203–7.

81. Hauet T, Mothes D, Goujon JM, Caritez JC, Carretier M, Le Moyec L et al. Trimetazidine prevents renal injury in the isolated perfused pig kidney exposed to prolonged cold ischemia. *Transplantation* 1997; 64(7):1082–6. doi: 10.1097/00007890-199710150-00025.
82. Unger V, Grosse-Siestrup C, Fehrenberg C, Fischer A, Meissler M, Groneberg DA. Reference values and physiological characterization of a specific isolated pig kidney perfusion model. *J Occup Med Toxicol* 2007; 2:1. doi: 10.1186/1745-6673-2-1.
83. Robb WL. Thin silicone membranes--their permeation properties and some applications. *Ann N Y Acad Sci* 1968; 146(1):119–37. doi: 10.1111/j.1749-6632.1968.tb20277.x.
84. Bhaumik G, Srivastava KK, Selvamurthy W, Purkayastha SS. The role of free radicals in cold injuries. *Int J Biometeorol* 1995; 38(4):171–5. doi: 10.1007/BF01245384.
85. Höcherl K, Gerl M, Schweda F. Proteinase-activated receptors 1 and 2 exert opposite effects on renal renin release. *Hypertension* 2011; 58(4):611–8. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.173229.
86. Wagner C, Wit C de, Kurtz L, Grünberger C, Kurtz A, Schweda F. Connexin40 is essential for the pressure control of renin synthesis and secretion. *Circ Res* 2007; 100(4):556–63. doi: 10.1161/01.RES.0000258856.19922.45.
87. Schweda F, Klar J, Narumiya S, Nüsing RM, Kurtz A. Stimulation of renin release by prostaglandin E2 is mediated by EP2 and EP4 receptors in mouse kidneys. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; 287(3):F427-33. doi: 10.1152/ajprenal.00072.2004.
88. Kurtz A, Schweda F. Osmolarity-induced renin secretion from kidneys: evidence for readily releasable renin pools. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006; 290(4):F797-805. doi: 10.1152/ajprenal.00240.2005.
89. Schweda F, Riegger GA, Kurtz A, Krämer BK. Store-operated calcium influx inhibits renin secretion. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 279(1):F170-6. doi: 10.1152/ajprenal.2000.279.1.F170.
90. Schweda F, Kurtz A. Regulation of renin release by local and systemic factors. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2011; 161:1–44. doi: 10.1007/112\_2008\_1.
91. Schweda F, Kurtz A. Cellular mechanism of renin release. *Acta Physiol Scand* 2004; 181(4):383–90. doi: 10.1111/j.1365-201X.2004.01309.x.

92. Castrop H, Schweda F, Mizel D, Huang Y, Briggs J, Kurtz A et al. Permissive role of nitric oxide in macula densa control of renin secretion. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; 286(5):F848-57. doi: 10.1152/ajprenal.00272.2003.
93. Wagner C, Kurtz A. Regulation of renal renin release. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1998; 7(4):437–41. doi: 10.1097/00041552-199807000-00015.
94. Wagner C, Jensen BL, Krämer BK, Kurtz A. Control of the renal renin system by local factors. *Kidney Int Suppl* 1998; 67:S78-83. Verfügbar unter: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S008525381530884X>.
95. Tagawa H, Vander AJ. Effect of acetylcholine on renin secretion in salt-depleted dogs. *Proc Soc Exp Biol Med* 1969; 132(3):1087–90. doi: 10.3181/00379727-132-34372.
96. Drexler H, Hornig B. Endothelial dysfunction in human disease. *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31(1):51–60. doi: 10.1006/jmcc.1998.0843.
97. Gajecki D, Gawryś J, Szahidewicz-Krupska E, Doroszko A. Role of Erythrocytes in Nitric Oxide Metabolism and Paracrine Regulation of Endothelial Function. *Antioxidants (Basel)* 2022; 11(5). doi: 10.3390/antiox11050943.
98. Bruns FJ, Alexander EA, Riley AL, Levinsky NG. Superficial and juxtamedullary nephron function during saline loading in the dog. *J Clin Invest* 1974; 53(4):971–9. doi: 10.1172/JCI107663.
99. Castrop H, Lorenz JN, Hansen PB, Friis U, Mizel D, Oppermann M et al. Contribution of the basolateral isoform of the Na-K-2Cl<sup>-</sup> cotransporter (NKCC1/BSC2) to renin secretion. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 289(6):F1185-92. doi: 10.1152/ajprenal.00455.2004.
100. Schweda F, Segerer F, Castrop H, Schnermann J, Kurtz A. Blood pressure-dependent inhibition of Renin secretion requires A1 adenosine receptors. *Hypertension* 2005; 46(4):780–6. doi: 10.1161/01.HYP.0000183963.07801.65.
101. Nakajima T, Nakayama T, Sokabe H. Examination of angiotensin-like substances from renal and extrarenal sources in mammalian and nonmammalian species. *Gen Comp Endocrinol* 1971; 17(3):458–66. doi: 10.1016/0016-6480(71)90180-8.
102. Dumbill R, Knight S, Hunter J, Fallon J, Voyce D, Barrett J et al. Prolonged normothermic perfusion of the kidney prior to transplantation: a historically controlled, phase 1 cohort study. *Nat Commun* 2025; 16(1):4584. Verfügbar unter: <https://www.nature.com/articles/s41467-025-59829-5>.

103. Haan MJA de, Jacobs ME, Graaf AMA de, van Scheppingen RH, Derks RJE, Vries DK de et al. Normothermic human kidney preservation drives iron accumulation and ferroptosis. *Nat Commun* 2025; 16(1):5420. Verfügbar unter: <https://www.nature.com/articles/s41467-025-61058-9>.
104. Hamelink TL, Ogurlu B, Jaynes CL, Lantinga VA, Leuvenink HGD, Keller AK et al. Perfusate Biomarker Comparison During Renal Hypothermic and Normothermic Machine Perfusion: Do These Techniques Provide Similar Insights? *Transplantation* 2025. doi: 10.1097/TP.0000000000005440.
105. Schurek HJ, Jost U, Baumgärtl H, Bertram H, Heckmann U. Evidence for a preglomerular oxygen diffusion shunt in rat renal cortex. *Am J Physiol* 1990; 259(6 Pt 2):F910-5. doi: 10.1152/ajprenal.1990.259.6.F910.
106. Schweda F, Krämer BK, Kurtz A. Differential roles of the sodium-calcium exchanger in renin secretion and renal vascular resistance. *Pflugers Arch* 2001; 442(5):693–9. doi: 10.1007/s004240100591.
107. Hauet T, Mothes D, Goujon J, Germonville T, Caritez JC, Carretier M et al. Trimetazidine reverses deleterious effects of ischemia-reperfusion in the isolated perfused pig kidney model. *Nephron* 1998; 80(3):296–304. doi: 10.1159/000045190.
108. Endre ZH, Ratcliffe PJ, Tange JD, Ferguson DJ, Radda GK, Ledingham JG. Erythrocytes alter the pattern of renal hypoxic injury: predominance of proximal tubular injury with moderate hypoxia. *Clin Sci (Lond)* 1989; 76(1):19–29. doi: 10.1042/cs0760019.
109. Pries AR, Secomb TW, Gaehtgens P. The endothelial surface layer. *Pflugers Arch* 2000; 440(5):653–66. doi: 10.1007/s004240000307.
110. Schafer AI. Vascular endothelium: in defense of blood fluidity. *J Clin Invest* 1997; 99(6):1143–4. doi: 10.1172/JCI119266.
111. Schurek H-J, Neumann KH, Schweda F, Czogalla J. *A Laboratory Manual of Kidney Perfusion Techniques*. Münster (Germany); 2017.
112. Wang J, Nation RL, Evans AM, Cox S. Isolated rat kidney perfused with dextran and bovine serum albumin: a stable model for investigating renal drug handling. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2004; 49(2):105–13. doi: 10.1016/j.vascn.2003.11.001.

113. Southard JH, van Gulik TM, Ametani MS, Vreugdenhil PK, Lindell SL, Pienaar BL et al. Important components of the UW solution. *Transplantation* 1990; 49(2):251–7. doi: 10.1097/00007890-199002000-00004.
114. Opelz G, Döhler B. Multicenter analysis of kidney preservation. *Transplantation* 2007; 83(3):247–53. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17297393/>.
115. Hosgood SA, van Heurn E, Nicholson ML. Normothermic machine perfusion of the kidney: better conditioning and repair? *Transpl Int* 2015; 28(6):657–64. doi: 10.1111/tri.12319.
116. Wyatt HL, Richards R, Pullin R, Yang TJ, Blain EJ, Evans SL. Variation in electrosurgical vessel seal quality along the length of a porcine carotid artery. *Proc Inst Mech Eng H* 2016; 230(3):169–74. doi: 10.1177/0954411915621092.
117. Gabryel P, Kasprzyk M, Roszak M, Campisi A, Smoliński S, Zieliński P et al. Comparison of the LigaSure™ bipolar vessel sealer to monopolar electrocoagulation for thoracoscopic lobectomy and lymphadenectomy: a prospective randomized controlled trial. *Surg Endosc* 2023; 37(6):4449–57. Verfügbar unter: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00464-023-09892-0>.
118. Schulten L, Spillner J, Kanzler S, Teubner A, Jockenhoevel S, Apel C. A polyurethane-based surgical adhesive for sealing blood vessel anastomoses-A feasibility study in pigs. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2022; 110(8):1922–31. doi: 10.1002/jbm.b.35049.
119. Horn C von, Minor T. Isolated kidney perfusion: the influence of pulsatile flow. *Scand J Clin Lab Invest* 2018; 78(1-2):131–5. doi: 10.1080/00365513.2017.1422539.
120. Gayle WE, JR. Isolated Organ Perfusion: Physiology and Application. *MCV/Q, Medical College of Virginia Quarterly* 1969; 4(5):173–81.

## IX. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Schaubild Niere [Prometheus Lernatlas der Anatomie 5. Auflage, 2018]; S. 10

Abbildung 2 Histologischer Aufbau der Niere [Lüllmann-Rauch, Taschenlehrbuch Histologie, 4. Auflage, 2012]; S. 12

Abbildung 3 Makroskopischer Vergleich Menschenniere (links), Schweineniere (Mitte) und Nagetierniere (rechts) [Giraud S. et al.(2011): Contribution of large pig for renal ischemia-reperfusion and transplantaion studies: the preclinical model.]; S. 16

Abbildung 4 Vergleich Gefäß- sowie Kelcharchitektur der menschlichen (A), sowie porcinen Niere (B). Es handelt sich hierbei, um eine linke Schweineniere und eine rechte menschliche Niere. Zur besseren Anschaulichkeit wurde das Bild der menschlichen Niere hier gespiegelt. Jeweils dorsale Ansicht. [Pereira-Sampaio MA et al. (2004): Pig kidney: anatomical relationships between the intrarenal arteries and the kidney collecting system. Applied study for urological research and surgical training. J Urol. 172(5 Pt 1):2077-81].; S. 17

Abbildung 5 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System; S. 18

Abbildung 6 Apparat zur Durchblutung isolierter Organe nach Jacobj. A: Künstliches Herz; B: Reservoir für Luft und Blut; D: Sauerstoffgasometer H: Kohlensäureabsorber; K: Glasspirale zur Erwärmung des Blutes; O: Gefäß zur Aufnahme des Organes; P: Messzylinder zur Bestimmung des Blutflusses.[Archiv f. experiment. Pathol. und Pharmakol. 1890; 26:S. 388–400]; S. 24

Abbildung 7 Aufbau eines Apparats zur isolierten Perfusion von Mäusenieren der AG Schweda [Bild: Robert Götz]; S. 38

Abbildung 8 A Schematische Übersicht des Apparats zur Perfusion von Nierensegmenten. Hellrot: oxygeniertes Perfusat; Dunkelrot: Venöses Effluat, sowie Primärharn; Blau: Temperiertes Wasser; Geld und Grün: Verabreichte Substanzen. B Apparat zur Perfusion von Schweinenierensegmenten, AG Schweda.; S. 41

Abbildung 9 Schematischer Aufbau Perfusionsbehältnis; S. 42

Abbildung 10 PE-Kanüle mit Außendurchmesser von 0,5mm; S. 46

Abbildung 11 LabChart Interface; Kanal 1: Systemdruck (gemessen); Kanal 2: Perfusatfluss (gemessen); Kanal 3: Durchschnittliche Flussrate (errechnet); Kanal 4: Gefäßwiderstand (errechnet); Kanal 5: Gefäßdruck (errechnet). (Von oben nach unten nummeriert); S. 49

Abbildung 12 Links: Abtrennen des kaudalen Nierensegments vor Perfusion. Rechts: PE-Kanüle in A. interlobaris. Fixiert mit Gefäßklemme und Ligatur; S. 53

Abbildung 13 Mit Evans Blue markiertes Nierensegment. Das umliegende Gewebe wurde bereits abgetragen; S. 59

Abbildung 14 Blick auf dichtes glomeruläres Bett des Korrosionspräparates einer Schweineniere; S. 61

Abbildung 15 Korrosionspräparat einer Schweineniere nach Abtragung der Kapillaren und feinen Gefäße; S. 62

Abbildung 16 Links: Kapillarerhaltende Präparation Kaudales Nierensegment; Rechts Aufstellung einer A. Arcuata im OP Mikroskop; S. 62

Abbildung 17 Korrosionspräparat Schaubild Intrarenale Gefäße 1. A. renalis; 2. Aufzweigung craniales Segment der A. renalis in ventralen und dorsalen Ast; 3. caudales Segment der A. renalis; 4. A. segmentalis; 5. A. lobaris; 6. A. interlobaris; 7. A. arcuata; 8. A. interlobularis; S.63

Abbildung 18 Korrosionspräparate der Gewebekeilperfusionen neben Korrosionspräparat einer vollständigen Schweineniere; S. 64

Abbildung 19 Links: Erkennbare Leakage mit Tropfenbildung (1) im Korrosionspräparat einer Nierenkeilperfusion, Rechts: Minderperfundierte blasse Gefäße im Randbereich des Gewebesegments (2); S. 65

Abbildung 20 Korrosionspräparat Nierenkeilperfusion mit erkennbaren Vasa vasorum (1). Die minderperfundierten Randareale mit deutlich blasseren Gefäßen zeugen von Leckfluss (2); S. 66

Abbildung 21 Eigenwiderstand verschiedener Kanülen im Vergleich; S. 68

Abbildung 22 Fluss und Reninsekretion Perfusion vom 25.05.2021 16:15; S. 70

Abbildung 23 Fluss und Temperatur; Perfusion vom 10.05.2021 14:30; S. 71

Abbildung 24 MIPK nach statischer ischämie. n=8; S. 72

Abbildung 25 HE gefärbte Schnitte nach 115 min Perfusionen mit (rechts) und ohne Dextran (links). 10, bzw. 40-fache Vergrößerung; S. 73

Abbildung 26 Effekt der Isoproterenol-Gabe auf Flussrate und Reninsekretion; S. 76

Abbildung 27 Effekt der Isoproterenol-Recovery auf Flussrate und Reninsekretion; S. 76

Abbildung 28 Effekt der Angiotensin II-Gabe auf Flussrate und Reninsekretion; S. 77

Abbildung 29 Effekt der Angiotensin II - Recovery auf Flussrate und Reninsekretion; S.78

Abbildung 30 Effekt der EGTA-Gabe auf Flussrate. Protokoll III (links) vs Protokoll I + III (rechts); S. 79

Abbildung 31 Effekt der EGTA-Gabe auf die Reninsekretion. Protokoll III (links) vs Protokoll I + III (rechts); S. 79

Abbildung 32 Effekt der EGTA-Recovery auf Flussrate und Reninsekretion; S. 80

Abbildung 33 Effekt der Gabe von EGTA direkt nach Ang II auf Flussrate und Reninsekretion; S. 81

Abbildung 34 Effekt der SNAP-Gabe auf Perfusatfluss und Reninsekretion; S. 81

Abbildung 35 Effekt der SNAP-Recovery auf Perfusatfluss und Reninsekretion; S. 82

Abbildung 36 Effekt der Acetylcholin-Gabe auf Perfusatfluss und Reninsekretion; S. 83

Abbildung 37 Effekt der Gabe von Bumetanid auf Flussrate und Reninsekretion; S. 83

Abbildung 38 Effekt der Bumetanid-Recovery auf Flussrate und Reninsekretion; S. 84

Abbildung 39 Effekt der Reduktion des Perfusionsdrucks auf Flussrate und Reninsekretion; S. 85

Abbildung 40 Effekt der Perfusionsdruck-Recovery auf Flussrate und Reninsekretion; S.86

Abbildung 41 Vergleich des Effekts von Isoproterenol auf Flussrate und Reninsekretion bei IPPKS und IPMK; S. 87/88

Abbildung 42 Vergleich des Effekts von Angiotensin II auf Flussrate und Reninsekretion bei IPPKS und IPMK; S. 89

Abbildung 43 Vergleich des Effekts von EGTA auf Flussrate und Reninsekretion bei IPPKS und IPMK; S.90

Abbildung 44 Vergleich des Effekts von EGTA nach Ang II auf Flussrate und Reninsekretion bei IPPKS und IPMK; S.91

Abbildung 45 Vergleich des Effekts von SNAP auf Flussrate und Reninsekretion bei IPPKS und IPMK; S. 92

Abbildung 46 Vergleich des Effekts von Acetylcholin auf Reninsekretion bei IPPKS und IPRK; S. 93

*Abbildung 47 Vergleich des Effekts von Bumetanid auf Flussrate und Reninsekretion bei IPPKS und IPMK; S. 94/95*

*Abbildung 48 Vergleich des Effekts des Perfusionsdrucks auf die Reninsekretion bei IPPKS und IPMK; S. 96*

*Abbildung 49 Korrosionspräparat 21.04.2021 9:00; S. 111*

*Abbildung 50 Korrosionspräparat 26.04.2021 14:30; S. 111*

*Abbildung 51 Korrosionspräparat 03.05.2021 14:30; S. 112*

*Abbildung 52 Korrosionspräparat 10.05.2021 08:10; S. 112*

*Abbildung 53 Korrosionspräparat 25.05.2021 07:30; S.113*

*Abbildung 54 Korrosionspräparat 25.05.2021 13:30; S. 113*

*Abbildung 55 Korrosionspräparat 25.05.2021 16:30; S. 114*

*Abbildung 56 Korrosionspräparat 28.06.2021 06:50; S. 114*

*Abbildung 57 Korrosionspräparat 30.06.2021 18:10; S. 115*

*Abbildung 58 Normierte Reninsekretion der ausgeschlossenen Perfusionen Protokoll I nach Intervention; S. 116*

*Abbildung 59 Absoluter Perfusatfluss der ausgeschlossenen Perfusionen Protokoll I nach Intervention; S. 116*

*Abbildung 60 Reninsekretion pro g Gewebe der ausgeschlossenen Perfusionen Protokoll II nach Intervention; S. 117*

*Abbildung 61 Absoluter Perfusatfluss der ausgeschlossenen Perfusionen des Protokolls II nach Intervention; S. 118*

## X. Abkürzungen

A. / Aa.	Arteria / Arteriae
A1	Adenosin 1 - Rezeptor
AC	Adenylatzyklase
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
Ach	Acetylcholin
AD	Außendurchmesser
ADH	Antidiuretisches Hormon
Ang I-IV	Angiotensin I - IV
ANOVA	Analysis of variance
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
AT <sub>1-4</sub>	Angiotensinrezeptor 1-4
ATP /ATPase	Adenosintriphosphat /Adenosintriphosphatase
BSA	Bovines Serum Albumin
BUM	Bumetanid
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECMO	Extrakorporale Membranoxygenierung
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycolbis(aminoethylether)- N,N,N',N'-tetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ENaC	Epithelialer Natriumkanal
G	Gauge
GC	Guanylatzyklase
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
Ggl./Ggll.	Ganglion / Ganglia
HE	Hämatoxylin-Eosin
HES	Hydroxyethylstärke
ID	Innendurchmesser
IPK / IPN	Isolated perfused kidney / isoliert perfundierte Niere
IPMK / IPMN	Isolated perfused mouse kidney / isoliert perfundierte Mäuseniere
IPPKS / IPSNS	Isolated perfused pig kidney segments / isoliert perfundierte Schweinenierensegmente
IPRK / IPRN	Isolated perfused rat kidney / isoliert perfundierte Rattenniere
ISO	Isoproterenol

MD	Macula Densa
MR	Mineralcorticoid-Rezeptor
MRT	Magnetresonanztomographie
MW	Mittelwert
NKCC1/2	Natrium-Kalium-2 Chlorid-Cotransporter 1/2
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
PDE	Phosphodiesterase
PE / LDPE	Polyethylen / Low-Density-Polyethylen
PEG	Polyethylenglykol
PET/CT	Positronen-Emissions- Tomographie/Computer-Tomographie
PFA	Paraformaldehyd
PKA/PKG	Proteinkinase A/G
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
R / R <sub>Ge</sub> / R <sub>S</sub>	Widerstand / Gefäßwiderstand / Systemwiderstand
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
REC	Recovery
RIA	Renin-Immunoassay
RPM	Rounds per minute / Umdrehungen pro Minute
SEM	Standard error of the mean / Standardfehler des Mittelwerts
SERCA	Sarcoplasmic endoplasmic reticulum calcium-transporting ATPase
SNAP	S-Nitroso-N-acetylpenicillamin
SUS304	Japanisches JIS G4303 Edelstahl-Äquivalent
U / U <sub>Ge</sub> / U <sub>S</sub>	Druck / Gefäßdruck / Systemdruck
V. / Vv.	Vena / Venae

## XI. Danksagung

Ich möchte all jenen Menschen meinen Dank aussprechen, die maßgeblich zur Erstellung dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonders hervorzuheben ist hier als Doktorvater und Betreuer dieser Arbeit Prof. Dr. Frank Schweda, der mir die Bearbeitung dieses spannenden Themas ermöglichte und wann immer notwendig den ausschlaggebenden Denkanstoß liefern konnte. Neben fachlichem Rat und kollegialem Umgang möchte ich hier auch die weit über das übliche Maß hinausgehende Bereitstellung der notwendigen Mittel, sowie persönliches Engagement, zur Umsetzung des Projektes erwähnen. Neben Materialien und Gerätschaften inkludierte diese unter anderem auch die Zurverfügungstellung eines privaten Autos zum Transport der Organe.

Natürlich möchte ich mich auch beim restlichen Team der AG Schweda bedanken. Unter anderem bei Philipp Tauber für seinen fachlichen Rat, bei Robert Götz für seine Hilfe bei der technischen Umsetzung des Perfusionsapparats, sowie die Durchführung der IPMK, bei Elena Heintz für die Einführung in die Präparation, bei Claudia Lehrmann für die Hilfe bei der Datenauswertung und schließlich bei Katharina Krieger und Rosmarie Heydn für ihre Hilfe bei der Durchführung des Immunoassays, sowie der Histologie und in allgemeinen laboratischen Fragen.

Ich möchte mich ebenso bei Herrn Manfred Zeller, sowie dem gesamten Team der Metzgerei Meindl in Burglengenfeld bedanken. Ohne die großzügige Spende von beinahe 100 Schweinenieren, sowie eine Anpassung des Schlachtvorgangs zur optimalen Organkonservierung wäre die Durchführung der Experimente in oben geschilderter Form nicht möglich gewesen.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie, sowie meinem Freundeskreis und natürlich auch Anna für die bedingungslose Unterstützung in jeder Lebenssituation bedanken.

## XII. Erklärung

Ich, Thomas C. Beham, geboren am 02.06.1999 in Deggendorf, erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift