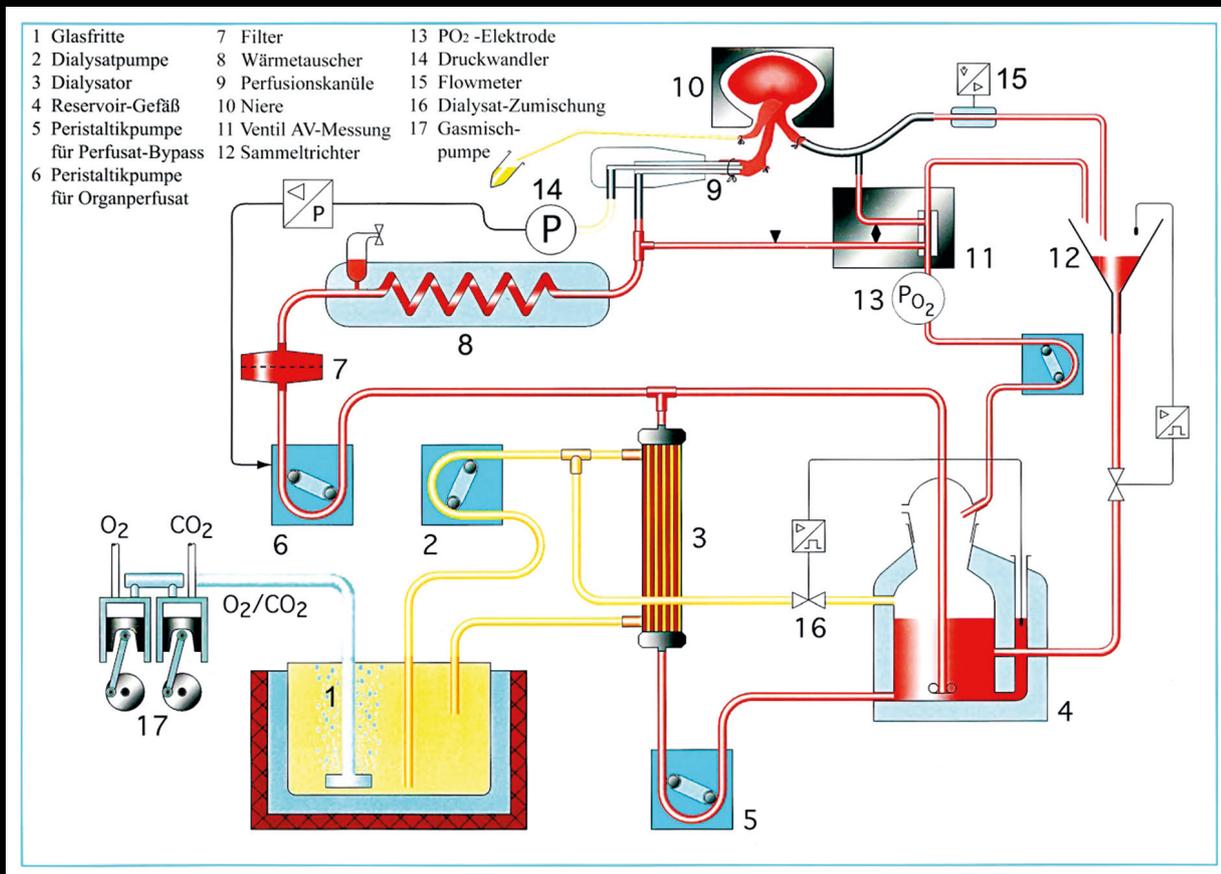


Laborhandbuch Nierenperfusion

Hans-Joachim Schurek

unter Mitarbeit von Klaus Hinrich Neumann und Frank Schweda

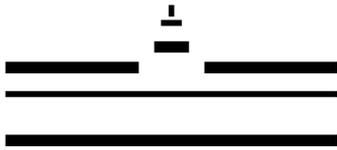


Hans-Joachim Schurek

Laborhandbuch Nierenperfusion



MV WISSENSCHAFT



**WESTFÄLISCHE
WILHELMS-UNIVERSITÄT
MÜNSTER**

Wissenschaftliche Schriften der WWU Münster

Reihe V

Band 5

Hans-Joachim Schurek

Laborhandbuch Nierenperfusion

unter Mitarbeit von Klaus Hinrich Neumann und Frank Schweda

Wissenschaftliche Schriften der WWU Münster

herausgegeben von der Universitäts- und Landesbibliothek Münster

<http://www.ulb.uni-muenster.de>

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek:

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Dieses Buch steht gleichzeitig in einer elektronischen Version über den Publikations- und Archivierungsserver der WWU Münster zur Verfügung.

<http://www.ulb.uni-muenster.de/wissenschaftliche-schriften>

Hans-Joachim Schurek

„Laborhandbuch Nierenperfusion“

Mitarbeiter: Klaus Hinrich Neumann und Frank Schweda

Wissenschaftliche Schriften der WWU Münster, Reihe V, Band 5

© 2015 der vorliegenden Ausgabe:

Die Reihe „Wissenschaftliche Schriften der WWU Münster“ erscheint im Verlagshaus Monsenstein und Vannerdat OHG Münster

www.mv-wissenschaft.com

Dieses Werk ist unter der Creative-Commons-Lizenz vom Typ 'CC BY-SA 3.0 DE' lizenziert: <http://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/de/>

Von dieser Lizenz ausgenommen sind Abbildungen, welche sich nicht im Besitz des Autors oder der ULB Münster befinden.



ISBN 978-3-8405-0132-6

(Druckausgabe)

URN urn:nbn:de:hbz:6-88219516586

(elektronische Version)

direkt zur Online-Version:

© 2015 Hans-Joachim Schurek

Alle Rechte vorbehalten

Satz:

Hans-Joachim Schurek

Titelbild:

Jörg Dieter Biela, *Experimentelle Nephrologie*,
Medizinische Hochschule Hannover

Umschlag:

MV-Verlag

Druck und Bindung:

MV-Verlag



meiner Frau Marianne gewidmet

Danksagung

Meinem 2007 verstorbenen Förderer und Mentor Prof. Klaus Hierholzer verdanke ich die Aufnahme 1969 in das Team der neu etablierten Abt. Klinische Physiologie am damaligen Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin, der mich auch nach dem Wechsel in die Innere Medizin 1972 weiter unterstützt hat, indem ich den Laborarbeitsplatz bis zum Wechsel nach Hannover 1975 behalten konnte. Meinem langjährigen Weggefährten Prof. Hilmar Stolte, der im August diesen Jahres leider verstorben ist, verdanke ich nicht nur meinen Start 1975 an der Medizinischen Hochschule Hannover, wo er mir innerhalb kürzester Zeit einen Laborarbeitsplatz zur Verfügung gestellt hat, sondern auch, dass er über all die Jahre an meiner Seite stand. Auch für die Unterstützung der Kliniksdirektoren Prof. Jan Brod und zuletzt Prof. Karl Martin Koch, der mein Sabbatical 1988 unterstützt hat, das ich in der Physiologie am Irchel/Zürich auf Einladung von Prof. Christian Bauer antreten und einen Versuchsstand aufbauen konnte, um an der isolierten Niere zusammen mit den Drs. Holger Scholz, Armin Kurtz und Kai-Uwe Eckardt die Erythropoetin-Synthese zu studieren.

Meinem Freund und Kollegen Klaus Hinrich Neumann danke ich für die vielen anregenden Gespräche, den unermüdlichen Einsatz bei allen Mikropunktionsprojekten an der IPRK in Hannover und nicht zuletzt für seinen Beitrag zu diesem Handbuch.

Jörg Dieter Biela war mir über Jahrzehnte hinweg ein Berater und aktiver Gestalter von technischen Apparaturen und er hat nicht zuletzt mit seiner früh entwickelten IT-Kompetenz hervorragende Arbeit geleistet.

Brian David Ross aus Altadena (Ca. USA, früher Oxford) danke ich für die Erlaubnis Abbildungen aus seinem Laboratory Manual aus dem Jahre 1972 zu nutzen. Ebenso danke ich Börje Haraldsson von der Universität Göteborg, dass ich eine Abbildung aus seinem Review von 2008 nutzen durfte und der Amerikanischen Physiologischen Gesellschaft für die copy right permission von 4 Abbildungen. Dem Springer Wissenschafts-Verlag danke ich für seine umgehende Antwort für die Nutzung alten Bildmaterials. Dagegen war die Prozedur eine copyright permission von Clarendon Press Oxford zu erhalten über Rechte-Verwertungsgesellschaften anonym und extrem zäh und damit zum Scheitern verurteilt.

Frau Dr. Kerstin Schnurr von der MedInnovation GmbH in Berlin-Adlershof danke ich dafür, dass Sie mir die Möglichkeit angeboten hat, mit dem dort entwickelten ESR-Funktionstest für BSA unsere Albuminchargen erstmals zu untersuchen (Kap. 9.8).

Mein besonderer Dank gilt auch der Else-Kröner-Fresenius-Stiftung, die in den letzten Jahren ein gemeinsames wissenschaftliches Projekt mit Eberhard Schlatter und Bayram Edemir über drei Jahre hinweg gefördert hat.

Vorwort

Angeregt hat mich ein Laborhandbuch von Brian D. Ross: *Perfusion Techniques in Biochemistry*, das 1972 in Oxford erschien bei Clarendon Press. Es gibt eine exzellente Übersicht über damals aktuelle Organperfusionstechniken. Es beginnt in Kapitel 3 mit Techniken der Leberperfusion, die für die Biochemie eine Art Schrittmacherfunktion hatte, speziell als Leon L. Miller 1951 in Rochester ein Modell der isoliert perfundierten Rattenleber etablierte, mit dem er die Synthese von Serum-Proteinen außer Immunglobulinen durch die isolierte Leber demonstrieren konnte. Kapitel 4 ist der Niere gewidmet und umfasst 36 Seiten. Ausgehend von Befunden, die an Nierenschnitten im Labor von Hans-Adolf Krebs erarbeitet wurden, war der Vergleich mit Befunden am isolierten Organ insoweit erhellend, als der aktivere Stoffwechsel des perfundierten Organs gegenüber den Nierenschnitten zeigte, dass der gerichtete Transport v.a. von Natrium für den Energiestoffwechsel der Niere quantitativ dominierend ist. Andererseits ließ sich zeigen, dass durch Auswahl von Stoffwechselsubstraten deutlich Einfluss genommen werden konnte auf den Ionentransport.

Über einen Zeitraum von 20 Jahren habe ich mich mit dem Thema Nierenperfusion inclusive methodischen Fragen beschäftigt, von 1969 bis 1975 im Institut für Klinische Physiologie in Berlin angeregt durch Klaus Hierholzer dem ersten Direktor des damals neu gegründeten Instituts, bis 1972 hauptberuflich, danach parallel zur klinischen Ausbildung in Berlin und seit 1975 in Hannover (bis 1988), wo mir Hilmar Stolte schnell und ganz unbürokratisch einen Laborarbeitsplatz zur Verfügung gestellt hatte in seinem Arbeitsbereich experimentelle Nephrologie. Vieles habe ich dadurch gelernt. Untersuchungen an der isoliert perfundierten Rattenleber war Thema meiner Dissertation in Tübingen und Untersuchungen an der isoliert perfundierten Rattenniere Thema meiner Habilitation an der Medizinischen Hochschule Hannover. Sowohl in Berlin als auch in Hannover waren internationale Kontakte und das wissenschaftliche Umfeld sehr stimulierend. In Hannover war mit Jens Bahlmann ein Pionier der Nierenperfusion vor Ort in der von Jan Brod und später Karl-Martin Koch geführten Abteilung Nephrologie im Zentrum Innere Medizin.

Ein Sabbatical 1988 bei Christian Bauer in der Physiologie in Zürich diente dem Studium der Erythropoietinsynthese an der isoliert perfundierten Rattenniere (IPRK); hier fand ich ein Umfeld, in dem ich in kürzester Zeit auch mit Hilfe der Forschungswerkstatt auf dem Irchel den Versuchsstand aufbauen konnte und das eine Diskussionsplattform bot mit einer stimulierenden Gruppe junger Ärzte wie Armin Kurtz, Kai-Uwe Eckhardt und Holger Scholz.

Nach Ende meiner ärztlichen Tätigkeit 2006 war es mir vergönnt, im Universitätsklinikum Münster mit Unterstützung durch Eberhard Schlatter und Giuliano Ciarimboli ein Labor aufzubauen, das mich in die praktische experimentelle Arbeit zurückversetzte. So blieb die Zeit um experimentelle Expertise zu reflektieren und zusammen zu tragen, was aus meiner Sicht für den erhellend sein mag, der sich mit dem Thema erstmals auseinandersetzt. Die Arbeit wurde in meiner Berliner Zeit von der interdisziplinären Arbeitsgruppe Berlintransplant gefördert, danach sowohl in Berlin als auch in Hannover langjährig von der Deutschen Forschungsgemeinschaft, überbrückend vom Ministerium für Kunst & Wissenschaft in Niedersachsen, zuletzt in Münster durch die Else-Kröner-Fresenius-Stiftung. Eine umfassende Würdigung aller Entwicklungen auf diesem Gebiet kann nicht das Ziel dieses Laborhandbuchs sein. Es ist eine sehr subjektive Auswahl mit dem Versuch Denkanstöße

dafür zu geben, welches Modell für welche Fragestellung angemessen ist und was dieses Modell nicht leisten kann. Das zitierte "Laboratory Manual" von Brian D. Ross von 1972 ist nach wie vor lesenswert. Dankbar bin ich für die Erweiterung durch Beiträge von meinem Freund Klaus Hinrich Neumann über die Besonderheiten von Mikropunktionsuntersuchungen am isolierten Organ und von Frank Schweda über die Perfusion von isolierten Mäusennieren, der in Regensburg bei Armin Kurtz die Nierenperfusion aus der Zürcher Zeit weiterpflegt.

Das Material für dieses Handbuch und viele Ergebnisse hätten ohne die Mitarbeit von Doktoranden und das wissenschaftliche Umfeld nicht entstehen können. Nicht vergessen werde ich die langjährige Mitarbeit von Charlotte Müller-Suur, die mir in Berlin als MTA zur Seite stand und der Gedankenaustausch mit den Mitgliedern der damaligen „Berliner Truppe“ im Institut für Klinische Physiologie unter Klaus Hierholzer: mit Claus Behn, Petra Brandt, J.P. Brecht, Hans Ebel, Michael Fromm, Ulrich Gutsche, Ulrich Hegel, Roland Kirsten, Helge Lohfert, Roland Müller-Suur und Michael Wiederholt. Ingrid Krause war hier meine erste Doktorandin, Petra Brandt und Helge Lohfert konnte ich mitbetreuen.

Hilmar Stolte hatte mich anlässlich eines Besuches in Berlin für Hannover erwärmt und mir beim Start jegliche Unterstützung gegeben. In Hannover werde ich die langjährige Mitarbeit von Iris Kilian immer in Erinnerung behalten, die als MTA ein phänomenales Händchen hatte für die präparative Nierenfreilegung, für die Vorbereitung der Experimente und die Analytik, insbesondere Mikroanalytik. Besonderer Dank gilt meinem langjährigen Techniker, Illustrator und Freund Jörg-Dieter Biela, der mir bei der Entwicklung der Gerätschaften und bei Illustrationen zur Seite stand. Mein erster Doktorand in Hannover war Eberhard Schlatter, es folgten Werner Meier, Eveline Assel und mitbetreut Christel Sonnenburg, Andreas Wiemeyer und mitbetreut Janosz Panzer, Horst Pagel und mitbetreut Christian Kellner, Gisela Wruck und Wulf-Peter Jesinghaus, Michael Hartwig, Hermann Thole, Harald Flohr, Harald Bertram und Uwe Jost, der ein engagierter und wertvoller Mitstreiter war, Mathias Bruno Zeh, Oliver Walter Johns und zuletzt Giuliano Ciarimboli. Jeanette Alt hatte als Laborleiterin einen großen Anteil an der Akribie in den analytischen Methoden in der experimentellen Nephrologie, die Hilmar Stolte in Hannover aufgebaut hatte.

Ein Treffen mit Doktoranden im Sommer 2006 hat dann zu der Einladung von Eberhard Schlatter geführt, einen experimentellen Neustart in der Nephrologie in Münster zu versuchen. Hier habe ich mit Jens Klokkes einen Doktoranden und mit Christina Köppen eine Doktorandin mitbetreut und mit Viktor Repp einen weiteren Doktoranden gefördert. Mit Bayram Edemir und seinem Fokus auf Aquaporin 2 und mit Eberhard Schlatter wurde dann ein Antrag auf Förderung an die Else-Kröner-Fresenius-Stiftung genehmigt und damit konnte zuletzt ein Programm über drei Jahre finanziert werden das u.a. Licht in das Dunkel bringen sollte, warum eine zellfrei perfundierte Niere den Urin nicht konzentrieren kann. In Münster habe ich zuerst mit Rita Schröter und zuletzt mit Antje Stöber zwei technische Assistentinnen zur Seite gehabt, ohne die das Projekt gescheitert wäre und beiden gebührt der Dank des in die Jahre Gekommenen.

Inhaltsverzeichnis

Vorwort	V
Inhaltsverzeichnis	VII
Einführung	1
1. Übersicht über Untersuchungsmodelle an der Niere	5
1.1. Historische Aspekte	5
1.2. Sauerstoffversorgung – ein kritischer Aspekt	7
2. Allgemeine Prinzipien der Nierenperfusion	8
2.1. Single-pass (once-through) Perfusion	9
2.2. Rezirkulation	9
2.3. Rezirkulation und Regeneration des Perfusats durch Dialyse	11
2.4. Reperfusion anatomisch fixierter Nieren als Modell	11
3. Möglichkeiten und allgemeine Grenzen der in vitro Perfusion der Mammalia-Niere	12
3.1. Flusskonstante versus druckkonstante Perfusion	18
3.2. Konzentrier- und Verdünnungsfähigkeit	18
3.3. Zur Permeabilität von Albumin an der IPRK und die „repaired defect“ Hypothese	21
4. Perfusionstechniken	27
4.1. Perfusionsmedium	27
4.1.1. Elektrolytlösungen	27
4.1.2. Substratzusatz	27
4.1.3. Herstellung der Perfusions- und Dialysatlösung	30
4.1.4. Albuminstammlösung	31
4.1.5. Andere Kolloidzusätze	31
4.1.6. Semisynthetisches Perfusat mit Sauerstoffträgern	33
4.2. Antrieb der Perfusion, Druck- und Flussmessung	37
4.2.1. Hydrostatischer Druck	37
4.2.2. Gasdruck	38
4.2.3. Flussmessung, Roller-/Schlauchpumpe, flusskonstante oder druckkonstante Perfusion	39
4.2.4. Andere Techniken der Flussmessung	40
4.3. Temperierung	41
4.3.1. Lufttemperiertes Kabinett	41
4.3.2. Wasserbadtemperierung	44

VIII

4.4.	Begasung	44
4.4.1.	Glasfrittenbegasung	44
4.4.2.	Gasoxxygenator	45
4.4.3.	Membranoxygenator	48
4.4.4.	Kapillaroxygenator	51
4.4.5.	Dialysator als „dialung“ oder „kidney lung“	52
4.5.	Filter	54
4.5.1.	Filtration des Perfusionsmediums	54
4.5.2.	In-line Filtration und Gasblasenfänger	55
4.6.	Kanülierung	57
4.6.1.	Arterieller Zugang zur Niere, Perfusionskanülen	57
4.6.2.	Venöse Kanülierung	60
4.6.3.	Ureterkateter	61
5.	Material für die Perfusionsapparatur	66
5.1.	Single pass System	66
5.2.	Rezirkulations-System	76
5.3.	Rezirkulation mit Regeneration durch Dialyse („kidney lung“)	78
5.4.	Reperfusion von anatomisch fixierten Nieren	80
6.	Sterilisations- und Desinfektionsverfahren	83
6.1.	Desinfektionsbad	84
6.2.	Thermische Desinfektion	84
6.3.	Gassterilisation	84
6.4.	Zur Sterilität des Perfusats	84
7.	Narkoseverfahren	86
8.	Operationstechnik und Anschlußverfahren	87
8.1.	Auswahl des Operationsbestecks	87
8.2.	Operationstechnik und Anschlussverfahren	88
9.	Messmethoden und Messparameter	99
9.1.	Temperierung und Temperaturmessung	99
9.2.	Perfusionsrate	100
9.3.	Sauerstoffverbrauch	102
9.4.	Urinflussrate, Urinflussblockade	102
9.5.	GFR: glomeruläre Filtrationsrate, Messtechnik der GFR	103
9.5.1.	Inulin, Polyfructosan	103
9.5.2.	Kreatinin	103
9.5.3.	Andere GFR Marker	104

9.6.	Elektrolyte Na, K, Ca, Cl, HCO ₃	104
9.7.	Osmolalität und kolloid-osmotischer Druck	106
9.8.	Kolloide, Substrate incl. Aminosäuren, Protein und Glukose	109
9.8.1.	Albumin	109
9.8.2.	Andere Kolloide	110
9.8.3.	Stoffwechselfsubstrate	112
10.	Nierenperfusion: Ergebnisse im Vergleich	114
10.1.	„Single pass“ Perfusion und Rezirkulation mit Dialyse	114
10.1.1.	Perfusionsrate, Urinzeitvolumen, GFR und Filtrationsfraktion in Abhängigkeit von der Albuminkonzentration	115
10.1.2.	Das Problem der Bezugsgröße Nierengewicht	120
10.1.3.	Autoregulation der Perfusions-Flussrate	122
10.1.4.	Natrium-Resorption fraktionell und absolute Transportrate T _{Na}	125
10.1.5.	Glukose-Resorption	127
10.1.6.	Kalium-Sekretion	128
10.1.7.	Effizienz des Natrium-Transports in Bezug auf den Sauerstoffverbrauch.	132
10.2.	Rezirkulationsperfusion. Experimente zur endokrinen Funktion der Niere	133
10.3.	Rezirkulation mit Dialyse	137
10.4.	Anatomisch fixierte Niere zur Analyse des glomerulären Filters	138
10.4.1.	Technik der Perfusionsfixierung der isolierten Niere zur Reperfusion	138
10.4.2.	Fixierungslösung für die Reperfusionsexperimente	140
11.	Tabellarium und Abkürzungsverzeichnis zu den Tabellen	141
12.	Anhang	150
12.1.	Biochemische Untersuchungen zum Energiestoffwechsel der IPRK	150
12.2.	Morphologisches Bildmaterial der isoliert zellfrei oder mit Erythrozyten perfundierten Niere	153
12.3.	Hypothese zum Sauerstoffmangel der zellfrei perfundierten Niere	167
12.4.	Übersicht über die Beiträge der Arbeitsgruppe zu den 4 Techniken der Nierenperfusion	176
13.	Besonderheiten und Erfordernisse der Mikropunktionstechnik an der IPRK	179
	Klaus Hinrich Neumann, Göttingen	
13.1.	Untersuchungen an der isoliert perfundierten Rattenniere	179
13.2.	Morphometrische Untersuchungen	183
14.	Die isoliert perfundierte Mäuseniere	186
	Frank Schweda, Regensburg	

14.1. Perfusionstechniken	186
14.2. Perfusionsmedium	188
14.3. Perfusionsapparatur	189
14.4. Operation und Kanülierung der Nierenarterie	192
Ad 14.2 Schaferythrozyten als Sauerstoffträger Jan Czogalla, Zürich	194
15. Technischer Bildanhang zur IPRK	196
16. Anhang zur Historie der Nierenperfusion von 1849 bis 1908	207
17. Literatur	211

Einführung

Gibt man als Suchfunktion „kidney perfusion“ in die Plattform der amerikanischen Nationalbibliothek PubMed ein, kommt man auf 13599 Zitate (Stand Oktober 2015), gibt man „isolated perfused kidney“ ein, sind es 3394 Zitate, gibt man isolated perfused rat kidney (IPRK) ein, findet man 2197. Dabei sind dies neben einigen Zitaten, die weder mit dem einen noch dem anderen Suchprofil übereinstimmen überwiegend Einzelbefunde. Nur wenige Arbeiten befassen sich mit der Perfusionstechnik und den Hintergründen, den Limitationen und den verschiedenen Möglichkeiten (154-156, 177, 212, 213) für bestimmte Fragestellungen ein optimales Modell herauszusuchen (236). Die beste und normale Funktion hat ein Organ wie die Niere nur im gesunden Organismus. Sobald man die Niere experimentell isoliert, muss man die richtige Balance finden zwischen Fragestellung, der dazu passenden Variante des experimentellen Modells und der Antwort, die man von diesem Experiment erwarten kann. Eine isolierte Niere ist eine "sterbende Niere", auch wenn man über 1-4 h eine Funktion aufrechterhalten kann, je nach Definition und den Ansprüchen an eine normale Funktion. Dies gilt in noch größerem Umfang für experimentelle Modelle mit Desintegration wie Gewebeschnitten, Zellsuspensionen, isolierten Zellorganellen (z.B. Mitochondrien, Zellmembranen). In anderer Form gilt dies auch für das Gebiet der Molekularbiologie mit Untersuchungen an Zellkulturen oder gentechnisch manipulierten Knockout oder Knockin Modellorganismen. Der Grund für die Begrenzung der Überlebensfähigkeit eines isolierten Organs mag in der Übergangsphase liegen zwischen der in vivo Vollblutperfusion zu der Perfusion mit einer mehr oder weniger künstlichen Perfusionslösung als Blutersatz: Goethe lässt im Drama Faust I, Studierzimmer II Mephisto sagen: „Blut ist ein ganz besondrer Saft“. Blut ist als „flüssiges Organ“ eine hochkomplexe Mischung die permanent rekonditioniert wird durch eine Reihe von Organen und wenn wir an diese phantastischen Eigenschaften herankommen wollen, dann sollten wir ein Organ wie die Niere besser im Organismus belassen. Welche Rolle z.B. im Blut zirkulierende micro-RNA spielen bei der Konditionierung der Nieren wird die Zukunft erweisen.

Eine vergessene aber sehr spezielle Funktion des Blutes ist es auch die Integrität des Endothels zu erhalten (158, 220) was von einem künstlichen Perfusat bis heute nicht erreicht werden kann. Sollte dies der Schlüssel sein, dann sollte das genauer analysiert werden.

Die folgende Graphik gibt eine Übersicht von experimentellen Untersuchungstechniken, wie sie historisch sich entwickelt haben zunächst mit in vivo Untersuchungen vorwiegend an Versuchstieren. Um extrarenale Einflüsse auszuschließen entstanden Untersuchungstechniken in vitro v.a. in der Biochemie an Schnitten von parenchymatösen Organen wie Leber und Niere. So wurden eine Fülle von Stoffwechselwegen, Atmungsfermente, Harnstoffzyklus und Krebs- resp. Zitratzyklus entdeckt und vieles andere mehr. Hierzu genügten zunächst noch einfache manometrische Analysen zur Atmungsaktivität mit der Apparatur von Warburg (117). Aus heutiger Sicht mit den aktuellen Möglichkeiten erscheint es überraschend, was damals mit den einfachen Techniken, die Otto Warburg entwickelt hatte bereits entdeckt werden konnte. Ebenso faszinierend sind die Clearancetechniken, hämodynamische Untersuchungen und vor allem die klassischen Mikropunktionstechniken,

die Physiologen entwickelt haben um die Funktion der Niere besser zu verstehen. Erste Untersuchungen an einfachen transportierenden Epithelien wie Froschhaut und Krötenblase mit der von Ussing entwickelten Doppelkammer (142, 289) waren ein Meilenstein. Mit dieser Technik konnte erstmals ein transepithelialer Transport von Natrium gemessen werden, der ein elektrisches Potential induzierte. Legte man eine Gegenspannung an, die das Potential auf ± 0 reduzierte, war der Stromfluss im elektrischen Außenkreis gleich dem Ionenstrom durch die Membran, quasi ein Kurzschluss Strom. Daraus entwickelte sich ein Instrumentarium für transport- und elektrophysiologische Untersuchungen an Harnkanälchen (transepitheliale Messungen, intrazelluläre Ableitungen, ionenselektive Mikroelektroden), das es ermöglichte die z.T. sehr verschiedenen Tubulussegmente des Nephron *in vivo* und *in vitro* an isoliert perfundierten Tubulussegmenten zu charakterisieren sowohl nativ als auch unter dem gezielten Einsatz von z.B. Hormonen oder Pharmaka wie z.B. Diuretika. Ein weiterer Meilenstein war die von Neher und Sakmann eingeführte patch-clamp Technik (170, 171), die eine Fülle an neuen Erkenntnissen mit sich brachte. Damit konnte an Zellmembranflecken die Funktion von Ionenkanälen untersucht werden, „Kanalkrankheiten“ konnten definiert werden, später auch genetisch. Durch die Lichtmikroskopie und besonders die Entwicklung der Elektronenmikroskopie konnten faszinierende bildliche Vorstellungen entstehen um Morphe und Funktion zu fusionieren. Für Pharmakologen taten sich Möglichkeiten auf, Fragen der Arzneimittelwirkung experimentell zu untersuchen und neue Wirkstoffe *in vitro* zu untersuchen. Die Nachteile, die einfache Modelle wie z.B. Nierenschnitte mit sich bringen wurden deutlich, als man an isoliert perfundierten Lebern Stoffwechselprozesse wesentlich genauer erfassen konnte und an isoliert perfundierten Nieren gezeigt hat, dass ein gerichteter Ionenstrom eine wesentlich höhere Atmungsaktivität verlangt als an Schnitten, die nur ihren Basisstoffwechsel bedienen. Hier kann man die Perfusion einer isolierten Niere in den Kanon der Modelle einordnen.

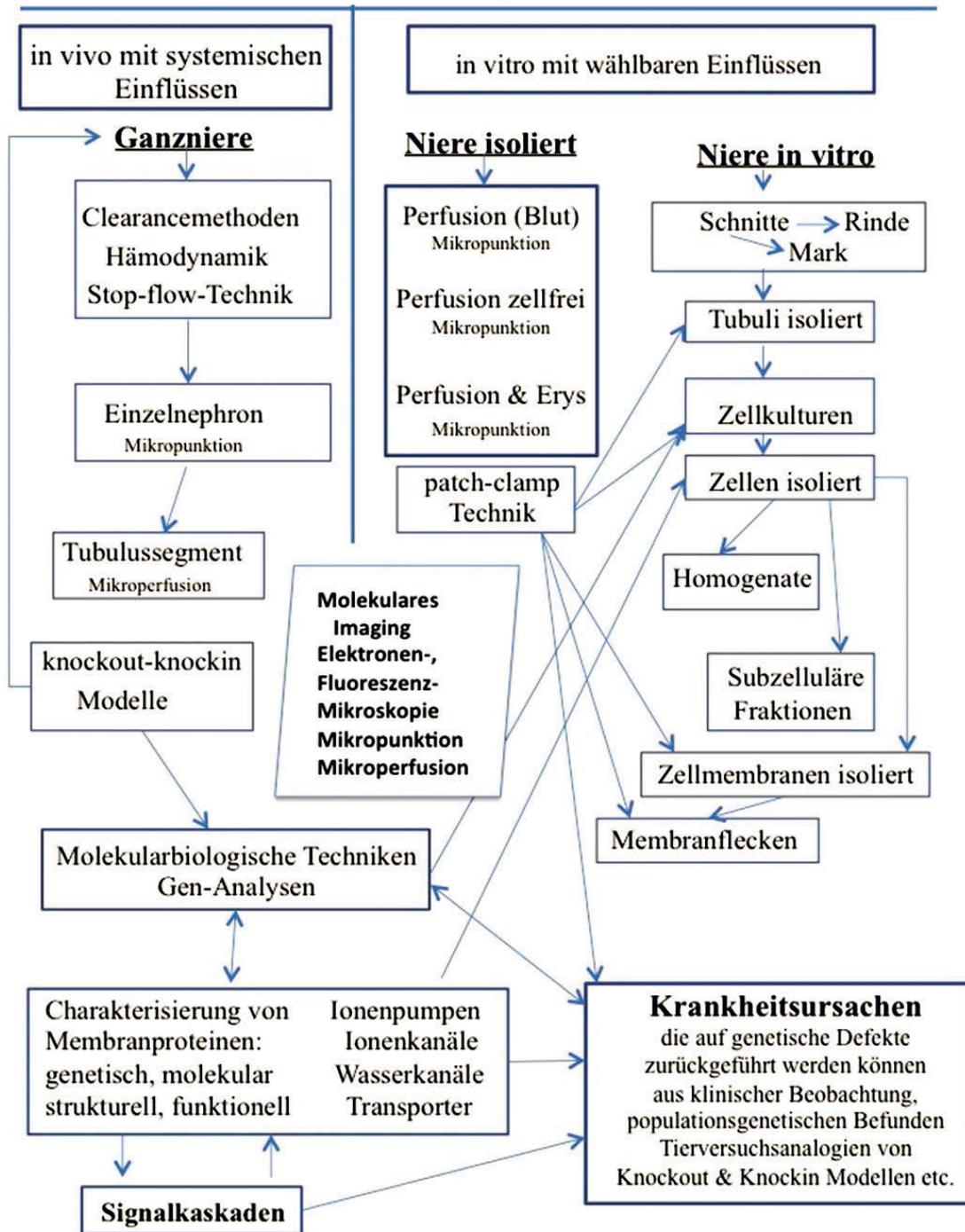
Inzwischen ist die nephrologische Forschung in die molekulare Größenordnung vorgedrungen mit den entwickelten Methoden der Molekularbiologie und Gentechnik. Die Möglichkeiten Gene im Tiermodell gezielt ausschalten zu können an sogenannten Knockout-Modellen oder das Gegenteil, der Einbau von Genen als Knockin-Modelle hat viele neue Wege eröffnet, Pathomechanismen zu verstehen und neue Heilmittel zu entwickeln wie z.B. die Biosynthese von humanem Erythropoietin in Hamster-Ovarialzellkulturen.

Untersuchungen an Zellkultursystemen sind heute so dominant geworden in der Molekularbiologie, dass sie auch die moderne nephrologische Forschung wesentlich prägen. So können Ionen- und Wasserkanäle in der Zellmembran nicht nur genetisch identifiziert und codiert werden, inzwischen kumuliert man immer mehr Informationen über ihre molekulare Struktur, Funktion und Lokalisation in der Membran. Darüber hinaus wurden Eigenschaften der Verbindungsbrücken zwischen den Zellen (sogenannte tight junctions und leaky junctions) erforscht mit faszinierenden neuen Erkenntnissen. Was für Ionen- und Wasserkanäle gilt wird gleichermaßen angewendet für die Charakterisierung von Transportmolekülen, Ionenpumpen und Signalkaskaden, die regelungstechnisch gesehen höchsten Ansprüchen genügen. In der klinischen Medizin werden viele seltene Krankheitsbilder nach und nach enträtselt und auf Genmutationen zurückgeführt wie z.B. die verschiedenen Formen des Bartter-Syndroms, des Gitelman-Syndroms, des Fanconi-Syndroms und des renalen Diabetes insipidus. So komplex die Nierenfunktion auch sein

mag, so hat die auf den ersten Blick primitive Methode, vergiftetes Blut beim schwerst Nierenkranken über eine Dialysemembran zu regenerieren etwas verblüffend „Einfaches“ an sich.

Als ich in der MHH – Medizinischen Hochschule Hannover – als junger Internist auf der Intensivpflegestation Patienten mit akutem Nierenversagen behandelte, kam ein sehr bekannter Biochemiker (Theodor Bücher) aus München zu Besuch auf die Station, um sich diese Technik der Mediziner einmal anzusehen. Was ihn am meisten verwundert hat, dass neben den Elektrolyten das einzige Stoffwechselfsubstrat, das wir mit der Dialyse anboten Glukose war. In seiner Vorstellung musste es ein „Verbrechen“ sein, dem Patienten all das vorzuenthalten, was den Gesamtcocktail der Stoffe im Blut ausmacht. Aber da die Dialysemembran nur 5% dessen sieht, was der Kreislauf pro Minute umsetzt, ist der Organismus in der Lage, dem gegenzusteuern. Das hat ihn dann wohl beruhigt. Dennoch wissen die Nephrologen am besten, was sie mit der Dialyse alles nicht gut regulieren können und dass mit der Dialyse auch Substanzen verloren gehen die man erhalten möchte und deshalb ist auf längere Sicht der bessere Nierenersatz die Transplantation einer biologischen Niere.

Untersuchungsmodelle Niere



1. Übersicht über Untersuchungsmodelle an der Niere

Tafel 1

Übersicht über historische und aktuelle Untersuchungstechniken der Niere, die im historischen Kontext jede für sich zu dem heutigen Wissensstand beigetragen haben. Das gilt sowohl für Untersuchungen der Niere unter in vivo Bedingungen, die den Vorteil haben die Nierenfunktion unter nahezu Normalbedingungen erfassen zu können aber den Nachteil, dass systemische, extrarenale Einflüsse die Übersichtlichkeit beeinträchtigen. Die in vitro Techniken sind am weitesten entfernt von einer normalen Nierenfunktion aber unentbehrlich, um Detailmechanismen zu analysieren. So hat die Entwicklung der patch-clamp Technik an Membranflecken mit elektrophysiologischen Methoden Möglichkeiten eröffnet, die ein ganz neues Forschungsfeld – das der „Kanalkrankheiten“ – hat entstehen lassen. Die isolierte Niere steht dazwischen, extrarenale Einflüsse werden vermieden, aber es ist eine „sterbende“ Niere mit einer eingeschränkten Funktion, die uns vor Augen führt, dass eine wie selbstverständlich funktionierende Niere in vivo doch ein bewundernswert effizientes Organ ist das unseren Salz- und Wasserhaushalt, unseren Säure-Basenhaushalt regiert, Überflüssiges ausscheidet und Ziel- und Produktionsort ist von Hormonen und Stoffwechselfsubstraten. Die Niere greift an vielen anderen Stellschrauben regelnd ein und gibt uns die Freiheiten an Land zu leben und nicht auf einen Lebensraum beschränkt zu sein.

1.1. Historische Aspekte

Zur Perfusion isolierter Nieren

Belegt sind erste Studien an isolierten und künstlich durchströmten Nieren nach den Angaben von C. Jacobj (109) bereits von Carl Eduard Löbell 1849 in seiner Dissertation in Marburg (146) und von Ernst Bidder 1862 in seiner Dissertation an der kaiserlichen Universität zu Dorpat (28), dem heutigen Tartu in Estland. Während die Arbeit von Löbell noch in der klassischen Wissenschaftssprache Latein verfasst ist, ist die Arbeit von Bidder schon in der neuen Wissenschaftssprache Deutsch verfasst. Mit der später durchgeführten Studie an der „isolierten Hundeniere“ haben Bunge und Schmiedeberg (45) 1876 den Nachweis der Hippursäuresynthese in der Niere erbracht (285). Man darf sich die Versuche aber nicht in Form einer Perfusion im heutigen Sinne vorstellen.

Die letzteren Autoren hatten umfangreiche Vorversuche an Fröschen unternommen um den Ort der Hippursäuresynthese einzugrenzen und zu guter Letzt die Niere als den Syntheseort dingfest gemacht. Dazu haben sie beim entscheidenden Experiment beim Hund die Nieren entnommen, die Gefäße einer Niere mit Glasröhren kanüliert und das defibrinierte und „colirte“ – das heißt filtrierte – Blut mit den Synthese-Ausgangsstoffen Benzoessäure und Glykokoll versetzt und aus einem Glasballon per Schwerkraft aus 1,75m Höhe durchgeleitet. Der Nachweis von Hippursäure im ausgeflossenen Blut, in der Niere selbst und im Urin ergab den Beleg der Synthese. Man nannte die Experimente Durchleitungsversuche. Diese Studien sind im Institut für experimentelle Pharmakologie in

Straßburg entstanden und hier ist die erste von Jacobj daraus entwickelte bewundernswerte Perfusions-Apparatur beschrieben worden. C. Jacobj hat 1890 im Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie die erste ausführliche Apparatebeschreibung gegeben (109): „Apparat zur Durchblutung isolirter überlebender Organe“ (Einzelheiten und Abb. 16.1.2./16.1.3. s. Anhang). Jacobj weist daraufhin, dass zuerst Carl Ludwig und seine Schüler in Leipzig die Methode zur künstlichen Durchblutung von Organen entwickelt haben. B.D. Ross hat in seinem Buch aus einer Arbeit von K. Skutul eine Tabelle extrahiert aus dem Jahre 1908 (auf Deutsch, aus dem pharmakologischen Institut der Universität Kiew) zur Übersicht der technischen Entwicklungsschritte (213, 267), s. Anhang Kap. 16.

Ein gravierendes Problem dieser ersten Versuche, die mit Vollblut durchgeführt wurden, war immer wieder eine nicht erklärbare Vasokonstriktion der Nieren. So findet sich in der Beschreibung der ersten „Durchleitungsversuche“ auch immer der Hinweis, dass das arterialisierte Blut vor der Niere hellrot und das venös austretende Blut dunkel war, Indiz für eine extrem niedrige Perfusionsrate. Alphonse Nizet, der selbst eine große experimentelle Expertise gewonnen hatte, hat dies in seinem Review von 1975 ausführlich beschrieben (177). Empirisch war die Einschaltung einer biologischen Lunge in den extrakorporalen Kreislauf in der Lage das Problem auszuräumen (13, 97, 288) und führte zu dem Erkenntnis, dass sowohl ein vasokonstriktorisches Prinzip durch die Lunge neutralisierbar war als auch das Problem von destabilisierten Lipoproteinen, die zu Fettembolien in der Niere führten (23) und den Perfusionswiderstand erhöhten. Nizet war davon überzeugt, dass Erythrozyten die Quelle für dieses vasokonstriktorisches Prinzip sind, das sie, sobald sie außerhalb der Gefäßbahn sind ins umgebende Plasma abgeben. Selbst im wässrigen Hämofiltrat von Hämo-Dialysepatienten (extrakorporaler Kreislauf, Fremdkörperkontakt!) ist dieses vasokonstriktorisches Prinzip nachweisbar (222, 223) und wir konnten es damals nur durch Zugabe des Calciumkanalblockers Verapamil zur Perfusionslösung ausschalten. Erst dieses Vorgehen hat es uns ermöglicht, die Clearance von urämischen Mittelmolekülen an der isoliert perfundierten Rattenniere zu bestimmen. Für den Dialyse-Patienten selbst wirkt sich dies im Analogschluss nicht greifbar aus, weil er es durch seine Lunge inaktivieren kann. Nizet hat beschrieben, dass auch die isolierte Niere selbst in der Lage ist, das vasokonstriktive Prinzip zu neutralisieren, wenn folgende Bedingungen erfüllt sind: ganz frisch entnommenes, nicht gerührtes Spenderblut, ein schonendes Oxygenierungsverfahren wie z.B. ein Membranoxygenator, ein Rezirkulationsvolumen kleiner als das 15fache des Nierengewichts (177, 178, 180) und wenn die initiale Vasokonstriktion gegebenenfalls pharmakologisch unterdrückt wird. Schnermann et al. haben eine Arbeit publiziert über eine mit Vollblut perfundierte Hundenniere (229), bei der sie alle Kriterien von Nizet eingehalten haben und durch Mikropunktions-Experimente zeigen konnten, dass der tubuloglomeruläre Feedback funktioniert. Dies konnte an der isolierten, zellfrei perfundierten Rattenniere nicht gezeigt werden (nicht publizierte Daten von Ullrich Gutsche und Reinhard Brunkhorst in meinem Labor in Hannover im Juni 1979).

Die Vasokonstriktion war primär nicht der Grund alternativ zellfreie Perfusionslösungen zu etablieren und/oder mit dem Zusatz mehrfach gewaschener Erythrozyten zu kombinieren, ein Verfahren, das Schimassek erstmals an der isolierten Rattenleber eingesetzt hat (221) als halbsynthetisches Medium. Für die Niere hat sich dieses Verfahren allerdings positiv ausgewirkt. Historisch ist das Jahr 1959 ein Markstein, als Christoph Weiss

(295) Ergebnisse publizierte, die an der isoliert perfundierten Rattenniere erhoben wurden. Mit der Verwendung einer zellfreien Perfusionslösung konnte er zeigen, dass die Autoregulation der Durchblutung auch ohne Erythrozyten nachweisbar ist. Dies hat die damals vorherrschende Hypothese von Pappenheimer und Kinter, dass Plasmaskimming (116, 186) für die Autoregulation allein verantwortlich ist erschüttert. Bis zu diesem Zeitpunkt waren experimentell isolierte Nieren immer von größeren Säugetieren verwendet worden wie Hund (177), Schwein und Kaninchen. Die Miniaturisierung der Analysetechnik war die Voraussetzung, dass man auch mit Nieren kleinerer Säugetiere experimentieren konnte. Zellfreie Perfusion setzte voraus, dass man genügend physikalisch gelösten Sauerstoff anbieten konnte, also entweder wurde das Perfusat mit reinem Sauerstoff begast ohne Bikarbonat als Puffersystem, oder man hat mit 95% O₂ und 5% CO₂ begast bei Einsatz von Bikarbonat als dem natürlichen Puffersystem. Na-Bikarbonat hat bei der Nierenperfusion den Vorteil, dass es den transepithelialen Natriumtransport aus dem Tubuluslumen heraus deutlich besser stellt als z.B. bei Verwendung eines Phosphatpuffers. Ein Grund liegt darin, dass durch Bikarbonatresorption ein transepithelialer Chlorid-Gradient aufgebaut wird (174), der selbst zur treibenden Kraft wird, was, wie sollte es anders sein auch kontrovers diskutiert wird (27).

1.2. Sauerstoffversorgung - ein kritischer Aspekt

Bedingt durch die Anatomie des renalen Gefäßbaumes führt die Perfusion ohne Sauerstoffträger (z.B. rote Blutzellen) praktisch immer zu Sauerstoffmangelschäden an besonders prädestinierten Stellen wie dem S₃ (P₃)-Segment des proximalen Tubulus und am medullären Teil der dicken aufsteigenden Henleschen Schleife (6, 60). Hier im äußeren Mark ist die Sauerstoffversorgung besonders kritisch (250, 253). Auf die besondere Empfindlichkeit des S₃ (P₃)-Segmentes hat Venkatachalam als Erster hingewiesen (290). Christoph Weiss hat schon früh gezeigt, dass der Sauerstoffverbrauch der IPRK mit Zunahme der Perfusionsstromstärke weiter wächst und hat dies als Anzeichen für eine unzureichende Sauerstoffversorgung angesehen (135, 294) und Dume und Koch et al. haben spekulativ 1966 eine Shunt diffusion für Sauerstoff diskutiert (64).

Will man Sauerstoffmangelschäden vermeiden, so muss man Sauerstoffträger wie z.B. rote Blutzellen hinzufügen, s.a. (66). Dabei genügt schon ein Anteil von 5 Volumenprozent im Perfusat bei Begasung des Mediums mit 95% O₂ und 5% CO₂ (253). Essentiell ist es, mehrfach gewaschene Erythrozyten zu verwenden (bovine, porcine, humane oder vom Schaf) und damit u.a. das vasokonstriktorische Prinzip zu verdünnen. Vollblutzusätze führen sofort zur finalen Vasokonstriktion und seien sie noch so schonend entnommen (s. oben). Man kann dies nur durch eine Blockade der α -Rezeptoren überwinden (177, 178, 180) oder durch Calcium-Antagonisten wie Verapamil (243, 244). Besser ist es darauf zu verzichten und mehrfach gewaschene Erythrozyten einzusetzen, was H. Schimmasek (221) als Erster bei der Perfusion der isolierten Rattenleber mit bovinen Erythrozyten eingeführt hatte. Bovine Erythrozyten gelten als besonders robust. Geringe Größenunterschiede zwischen bovinen Erythrozyten und humanen oder Rattenerthrozyten haben keine praktische Bedeutung (199). Andere Sauerstoffträger wie emulgierte Fluorokarbon-Präparate (78) und vernetzte stromafreie Hämoglobine haben sich bislang nicht durchgesetzt trotz vieler und langjähriger Versuche (persönliche Mitteilung zu stromafreiem Hämoglobin von Walter

Pfaller, Innsbruck s.a. (14, 15, 137, 140, 298, 299). Es gibt weiter Versuche auf der Grundlage beider Prinzipien diese Techniken weiter zu entwickeln (141).

2. Allgemeine Prinzipien der Nierenperfusion

Der Versuch, eine Mammalianiere mit frisch entnommenem Vollblut zu perfundieren scheitert regelmäßig, hierauf hat schon Nizet hingewiesen (177) und dies zeigte sich auch bei defibriniertem Vollblut (97) wie bei heparinisiertem Vollblut (44). Selbst eine vorsichtige Blutentnahme ändert nichts daran. Es kommt regelhaft zur Vasokonstriktion. Daraus hat sich das Verfahren entwickelt Perfusionsmedien aus mehrfach gewaschenen roten Blutzellen und Salzlösungen mit einem Kolloid zu komponieren (221). Verzichtet man auf Sauerstoffträger wie Erythrozyten, führt selbst eine Begasung mit hohen (aber normobaren) Sauerstoffdrücken zu Sauerstoffmangelschäden im Bereich der P₃ (S₃)-Segmente des proximalen Tubulus und der TAL-Segmente (dicke aufsteigende Henle-Schleife); Ursache ist die spezielle Gefäßarchitektur der Niere in Mark und Rinde. Der enge Kontakt im Gefäßbaum der Niere, v.a. der Nierenrinde zwischen Arterien und Venen und in den vasa recta des Nierenmarks erleichtert eine Shunt diffusion von Blutgasen (127, 250, 253) insbesondere wenn Sauerstoffträger wie rote Blutzellen fehlen (253). Verzichtet man auf ein Kolloid wie Albumin (BSA) oder andere künstliche Kolloide, kommt es zu einer deutlichen Volumenzunahme der Niere um 30-50% des Ausgangsgewichtes und das Urinzeitvolumen erreicht 50% des glomerulären Filtrates (241). Es gibt aktuell vier Varianten der Perfusionstechnik der Niere:

2.1. Single-pass (once through) Perfusion (3, 223, 236, 241, 246, 247, 295).

2.2. Rezirkulation (12, 31, 34, 56, 176, 177, 195, 212, 226, 284)

2.3. Rezirkulation mit Begasung und Regeneration des Perfusats durch Dialyse (19, 161, 236, 241).

2.4. Reperfusion einer anatomisch fixierten Niere. Dieses Verfahren haben wir etabliert, weil so unter Vorbehalt die physikalischen Eigenschaften des glomerulären Filterapparates untersucht werden können ohne aufwendige Mikropunktion (48-51, 74, 256, 305).

Aus der experimentellen Fragestellung ergibt sich die Wahl des Verfahrens. Bei Verwendung von bovinem Serumalbumin BSA ist Variante 1 aus ökonomischen Gründen nur bedingt einsetzbar. Variante 2 kommt mit dem kleinsten Perfusionsvolumen aus und hat sich am weitesten verbreitet, bei Variante 3 erhöht sich das Rezirkulationsvolumen durch das Füllvolumen der „kidney-lung“ (Dialysator). Für alle Verfahren gleichermaßen wichtig sind die Sterilfiltration und/oder die online Filtration bei der Rezirkulationstechnik. Für die ersten drei Verfahren gilt, dass ohne Sauerstoffträger wie z.B. gewaschene Erythrozyten Sauerstoffmangelschäden im äußeren Mark und den Markstrahlen der Rinde nicht zu vermeiden sind.

2.1. bis 2.4: Vor- und Nachteile der Varianten

Ad 2.1. Single-pass Perfusion (Modus 1):

Die Begasung des Mediums ist einfach mit einer porösen Glasfritte zu erreichen. Das ist bei Perfusaten mit Kolloiden wie Gelatine (Haemaccel), Dextran, Hydroxyäthylstärke (HAES) und Pluronic (80) auch möglich, nicht jedoch mit BSA wegen der extremen Schaumbildung, welche zudem eine Denaturierung des Albumins begünstigt. Wir haben ein kombiniertes System aus Rezirkulation, das in den single-pass Modus konvertierbar war genutzt um den Stoffwechsel und die Clearance von urämischen Mittelmolekülen zu untersuchen, indem wir das albuminhaltige Perfusat mit einem Membranoxygenator äquilibriert haben (222, 223). Smyth et al. haben ein single-pass System mit Albumin allein (270) oder kombiniert mit Ficoll genutzt (269) indem sie das Perfusat mit einem Kapillardialysator mit hohem Gasfluss verwendet haben. In der Arbeit findet sich keine Angabe zu Flüssigkeitsverlusten über die Hohlfasern. Zudem ist aus hygienischen Gründen kritisch, dass Teile des Systems incl. Dialysator in ein Wasserbad inkubiert waren. Dies wurde historisch bei der Peritonealdialyse des Menschen praktiziert, später aber wegen Kontaminationen gegen eine trockene Temperierung aufgegeben. Man kann vor und hinter dem Dialysator besser wasserbadtemperierte Glasschlangen einsetzen.

Verzicht auf ein Kolloid ist möglich, setzt aber besondere Maßnahmen voraus anders als beim Langendorff-Präparat des Herzens (63); so ist es bei kolloidfreiem Perfusat essentiell die Niere vor Anschluss zu dekapsulieren (s.a. Abb. 4.4.4.) und keine zu engen Ureterkatheter zu verwenden wie PE/PP10 Katheter. Cortell (57) hat zu Recht vor zu klein dimensionierten Ureterkathetern gewarnt wie PE10, s.a. Abb. 4.4.3., besonders bei hohen Urinflussraten wie bei kolloidfreiem Perfusat (240, 241). Die single-pass Perfusion hat den Vorteil, dass vorgegebene Substrate weitgehend konstant sind, z.B. eine vorgegebene NO-Quelle wie Arginin konstant erhalten bleibt, die bei reiner Rezirkulation schnell erschöpft ist, dies gilt besonders für kleine Rezirkulationsvolumina (197, 198). Bei Zusatz von Erythrozyten muss die Begasung durch einen Oxygenator erfolgen, Glas- oder Membranoxygenator oder durch einen Dialysator ("kidney-lung") wie bei Modus 3, hierbei dient das begaste Dialysat zum Äquilibrieren des Perfusats und zu dessen Regenerierung. Auch die proportionale Zuinfusion von Peptid-Hormonen wie z.B. Arginin-Vasopressin (AVP) und auch der Entzug von Hormonen kann einfacher untersucht werden als bei Modus 2 (293).

Ad 2.2. Rezirkulation (Modus 2):

Das Verfahren wird bevorzugt, wenn man biochemische oder pharmakologische Effekte kumulativ verfolgen will, wie Glukoneogenese oder Arzneimittelausscheidung und/oder -abbau (22, 31, 56, 101, 102, 154, 155, 168, 176, 212, 214, 216, 226, 285). Die am häufigsten verwendeten künstlichen Lungen sind Glas- oder Membranoxygenatoren. Das funktionell beste Kolloid ist Albumin – BSA (bovines Serumalbumin), es hat bei vergleichbarem COP (colloid-osmotic pressure) die geringste Viskosität, dementsprechend sind die Perfusionsraten am höchsten bei definiertem Perfusionsdruck. Im Unterschied zu künstlichen Kolloiden hat Albumin ein gut definiertes Molekulargewicht. Die von Bowman und Maack bevorzugte Perfusionstechnik ist relativ unkompliziert und einfach zu etablieren

und die funktionellen Ergebnisse sind denen der Oxforder Arbeitsgruppe von BD Ross und Nachfolgern vergleichbar. Urin sollte bei kleinen Perfusativolumina zurückgeführt werden außer für Clearance-Proben und Probenentnahmen müssen gegebenenfalls ausgeglichen werden. Pegg hat allerdings zu Recht darauf hingewiesen, dass im Urin auch Partikel gefunden werden, die Kapillaren verstopfen können und so zum Widerstandsanstieg führen (187). Bei zellfreier Perfusion sieht man ca. 30min nach Perfusionsbeginn die ersten abgestoßenen Tubulusepithelien im Urinsediment (207), was man aus den morphologischen Untersuchungen der Nieren auch ableiten konnte (6, 253), und dies bestätigt die Beobachtungen von Pegg und Mitarbeitern. Das hat auch die Konsequenz nach sich gezogen, dass zwischen Pumpe und Niere ein Filter eingebaut wurde. Ein weiterer Grund ein Filter einzusetzen ist der Eintrag von Partikeln, die präparativ bei der Isolierung der Niere entstehen können und bei Rezirkulation in die Gefäßbahn geraten.

Das Rezirkulationsverfahren eignet sich besonders für biochemische oder pharmakologische Fragestellungen, indem Effekte kumulativ verfolgt werden können. Nicht einig sind sich die Autoren, ob BSA als Cohn Fraktion V unverändert einzusetzen ist (22, 32, 154, 155) oder ob es zuvor entfettet und dialysiert werden sollte (55, 145, 212). Erstere Autoren nutzen an Albumin gebundene Substanzen und halten diese für nützlich, die zweite Gruppe Autoren möchte eine Kontrolle darüber, was vorgegeben ist, zudem entstand der Eindruck einer besseren Funktionsstabilität, die man allerdings umso besser beurteilen kann, je mehr Parameter wie z.B. Fluss, Druck, pO_2 und Temperatur kontinuierlich gemessen werden. Bei der isolierten, rezirkulierend perfundierten Rattenleber führte die Beobachtung einer rasch sich entwickelnden Azidose bei kleinem Perfusativolumen dazu, das Dialyseverfahren erstmals dagegen einzusetzen (19), möglicherweise kam es zur Azidose bedingt durch den $NaHCO_3$ -Verbrauch bei der Harnstoffsynthese und/oder zur Laktatazidose durch Hypoxie.

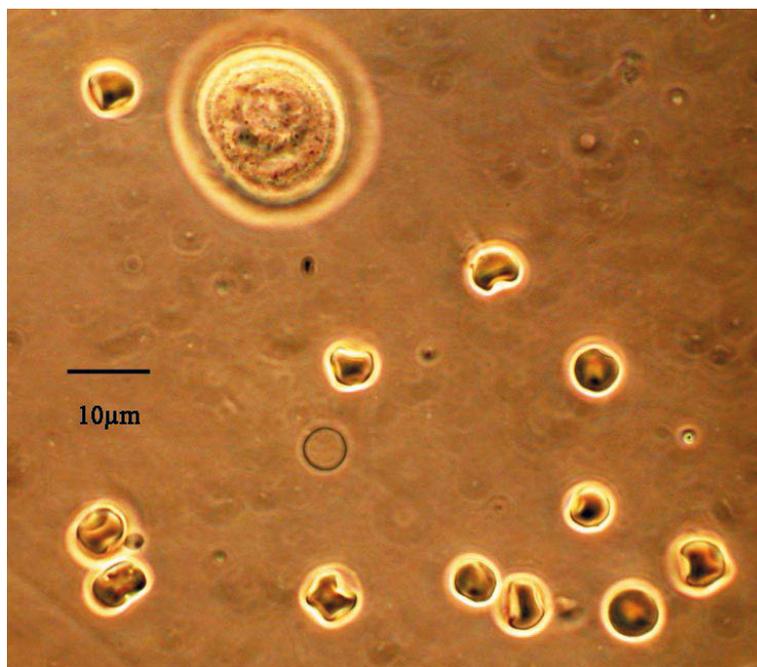


Abb. 2.1.: *Urinsediment (IPRK)* mit mehreren Humanerythrozyten, einem Erythrozyten-Ghost und einer deutlich größeren Tubuluszelle, die durchaus Kapillaren verstopfen kann, wenn sie in die Gefäßbahn der Kapillaren gerät.

Ad 2.3. Rezirkulation und Regeneration des Perfusats durch Dialyse (Modus 3):

Das Verfahren vereint im günstigsten Fall die Vorteile der single-pass Perfusion mit der Rezirkulation und hat uns v.a. für physiologische Fragen gedient. Mit dem Dialysator hat man zusätzlich die Funktion eines Oxygenators, wenn das Dialysat wie bei der single-pass Perfusion per Glasfritte kontinuierlich begast wird. Die Kumulation von Stoffwechseleffekten bei kleinen Molekülen wie bei reiner Rezirkulation ist hier nicht nutzbar. Nachteilig ist auch der höhere technische Aufwand, v.a. muss wegen der Ultrafiltration im Dialysator eine Regelung mit Kompensation eingebaut werden (technische Details im Anhang). Dadurch kann aber auch z.B. der Volumenverlust von Probenentnahmen und von gesammeltem Urin ausgeglichen werden. Ein gängiges Verhältnis von Perfusat zu Dialysat wie wir es nutzen ist 1:20, 200-250ml Perfusat und 5000ml Dialysat. Das sorgt für eine stabile Zusammensetzung des Perfusats wie bei einem single-pass Modus und verhindert den schnellen Verlust von Arginin als Quelle für Stickstoffmonoxid (NO) (197, 198). Damit ist das Verfahren für physiologische Fragestellungen mit höherem Zeitaufwand wie z.B. Mikropunktions-Untersuchungen am besten geeignet (173, 175, 197, 198, 235, 238, 241, 256, 257, 282, 283) und hat sich auch in anderer Hinsicht bewährt (100, 128, 129, 230, 231, 253, 257). Als Dialysator eignen sich sogenannte lowflux Dialysatoren mit kleiner Porengröße, damit Albumin nicht ins Dialysat übertritt (wie z.B. bei high-flux Dialysatoren, was aber in vivo bei Vollblutkontakt keine wesentliche Rolle spielt durch „Abdichtphänomene“). Das System ist inzwischen seit mehr als 12 Jahren auch bei Nieren von größeren Säugetieren wie Hund und Schwein in Gebrauch (84, 85, 104). Gegenüber der Zeit, als Baumung und Peterlik das Verfahren bei der Leberperfusion einsetzten und den Dialysator noch selbst aus Cellophanschläuchen gewickelt haben, ist der Einsatz eines Dialysators heute kein Problem mehr und auch erschwinglich, zumal auch eine Wiederverwendung nach entsprechender Reinigung gut möglich ist.

Ad 2.4. Die Reperfusion anatomisch perfusionsfixierter Nieren (Modus 4):

Durch Reperfusion anatomisch fixierter Nieren war es uns möglich, das glomeruläre Filter unter Versuchsbedingungen zu untersuchen, die in vivo nicht möglich sind. Z.B. war es möglich, die Permeabilität von Albumin bei saurem pH zu untersuchen in der Nähe des isoelektrischen Punktes oder darunter, wenn sich die negative Oberflächenladung des Albumins in eine positive Ladung umwandelt. Die Idee entstand unter dem Eindruck des großen Aufwands von Mikropunktions-Experimenten an der isolierten Niere um die Permeabilität der glomerulären Kapillaren für Albumin zu untersuchen (235, 238, 256, 283). Die Ladungsverhältnisse des glomerulären Filters sind selbst am fixierten Organ erhalten. Reale et al. konnten histochemisch zeigen, dass die negativen Ladungen der glomerulären Kapillarwand nach Perfusionsfixation mit Glutaraldehyd erhalten bleiben (200-205). Ziel war es eine Präparation zu erhalten mit ausreichend hoher GFR, die mit dem Endurin identisch ist. Dazu wurden die Nieren 15 Minuten lang perfundiert mit einem effektiven Perfusionsdruck von 100mmHg mit dem Zusatz von Verapamil (4,4µmol/l), zwei Minuten vor der Fixation wurde der Perfusionsdruck auf 150mmHg erhöht und während der Fixation

in der Höhe beibehalten. Die Fixationslösung war eine 1,25% monomere Glutaraldehyd-Lösung in NaCl mit Phosphatpuffer bei pH 7,1 und mit 6% HAES als Kolloid. Weshalb der Kolloidzusatz? Die ersten Fixationen ohne Kolloidzusatz aber in Normothermie haben uns gezeigt, dass der sprunghafte Wechsel im kolloidosmotischen Druck auf null zum drastischen Anstieg des Perfusionswiderstands führt und damit die Fixation verzögert und erschwert. Der Zusatz von HAES hat die Fixierungsqualität wesentlich verbessert (s.a. morphologische Studie: (253)) und die Etablierung dieses Modells erst ermöglicht.

Die Nieren wurden zusammen mit Ihrer doppelläufigen Perfusionskanüle bei 4°C in einer speziell angefertigten Acrylglasbox aufbewahrt, bis sie zur Reperfusion Tage oder Wochen später zum Einsatz kamen, s.a. Abb. 5.4.1. – 5.4.4., S. 81-83. (48-51, 74, 256, 305).

3. Möglichkeiten und allgemeine Grenzen der in vitro Perfusion der Mammalia-Niere

Blutperfundierte Organe in vivo sind in der Regel einem Sauerstoffdruck ausgesetzt, der 100mmHg nicht überschreitet. Bei diesem Druckniveau ist Hämoglobin, der rote Blutfarbstoff der Erythrozyten voll gesättigt und auf dieses Druckniveau sind die Schutzmechanismen der Niere gegen eine Sauerstoffintoxikation ausgelegt. Andererseits hat der Gesamtorganismus Strategien, Sauerstoffmangelzustände kurz- und langfristig zu überbrücken. Die Amplitude des Sauerstoffdrucks in vivo liegt immer unter 100mmHg, in vitro ist diese deutlich höher wenn mit höheren Partialdrucken äquilibriert wird (95% O₂). Andererseits legt der Nachweis einer präglomerulären arteriovenösen Shunt diffusion für Sauerstoff (Blutgase) die Vermutung nahe, dass Druckspitzen abgeglättet werden und damit eine Sauerstoffintoxikation abmildern (68, 182, 250). Wird eine Niere in vitro zellfrei perfundiert, ist eine ausreichende Sauerstoffversorgung nur dann begrenzt erreichbar, wenn das Perfusat mit 95-100% Sauerstoff gesättigt ist, und das führt dann zu wesentlich höheren Amplituden des Sauerstoffdrucks als in vivo. Nur so kann über die physikalisch gelöste Gasmenge genügend Sauerstoff antransportiert werden. Ein Organ wie die Niere ist gekennzeichnet durch eine komplexe Gefäßarchitektur, wie die Gegenstromaustauschersysteme im Gefäßbaum von Nierenmark und -rinde. Hier gibt es Areale, die unter diesen Bedingungen trotz hoher venöser Sauerstoffdrucke Sauerstoffmangelschäden zeigen. So finden sich nach kurzer Zeit Läsionen im Bereich des äußeren Marks, so der P₃ (S₃)-Segmente des proximalen Tubulus und der TAL-Segmente, die vom Gefäßbündel der Vasa Recta entfernt liegen (6, 253). Das liegt u.a. an der sehr viel höheren Sauerstoffausschöpfung in diesem Areal als an der Gesamtniere, weil schon die Einspeisung aus dem Nierenmark mit vorausgeschöpft erniedrigtem pO₂ erfolgt. Es genügt die Addition von 5% gewaschenen Erythrozyten um diese Schäden kurzfristig (Stunden) zu verhindern (bei Begasung mit 95% O₂), (253). Während die Gesamt-Niere in vivo ca. 8% des angebotenen Sauerstoffs entnimmt, liegt dies bei zellfreier Perfusion bei hohen Partialdrucken in der Größenordnung von 50%. Im Areal des äußeren Marks ist die Sauerstoff-Extraktion in vivo mit ca. 80% wesentlich höher und wie hoch ist dies dann erst in vitro zu erwarten?, selbst dann wenn ein zellfreies Perfusat zu einer deutlich höheren Markperfusion führt als in vivo. Die 80% Sauerstoff-Ausschöpfung im äußeren Mark wurde von Mayer Brezis beschrieben

(37) auf der Grundlage einer Berechnung von Julius J. Cohen (54). Ein weiterer Aspekt ist, dass bei zellfreier Perfusion wesentlich höhere Amplituden von $p\text{CO}_2$ und pH auftreten zwischen arteriellem und venösem Perfusat, die bei Präsenz von Erythrozyten deutlich kleiner sind und dies ist der hohen Transportkapazität der Erythrozyten für CO_2 - bzw. HCO_3 geschuldet bzw. der Präsenz der Carboanhydratase und der Pufferkapazität von v.a. Hämoglobin und Plasmaproteinen. Dieser Unterschied im Vergleich zur in vivo Situation bedeutet zumindest eine Störung der Homöostase, wie bedeutsam das funktionell ist bleibt zu klären.

Unter in vivo Bedingungen findet sich ein deutlicher Anstieg des COP (kolloid-osmotischen Drucks) entlang der filtrierenden glomerulären Kapillarstrecke (s. Abb. 3.0.1). In vitro ist die Perfusionsrate verglichen mit dem Plasmastrom in vivo um Faktor 4 - 15 höher (je nach Kolloid) bei vergleichbarer GFR, sodass kaum ein Anstieg des COP entlang der Kapillarstrecke entsteht wie in vivo, d.h. auch, dass bei einem Ausgangs-COP von z.B. 20mmHg keine wesentliche Veränderung im postkapillären Gefäßbett auftritt wie in vivo, was für die Aufnahme des Reabsorbats wichtig ist (83, 300). Dies erklärt teilweise, warum die fraktionelle Natrium- und Flüssigkeitsresorption nicht in vivo Werte erreicht. Setzt man dagegen eine höhere Konzentration von Albumin ein, wie sie im postglomerulären Gefäßbett frühproximal in vivo zu erwarten ist, dann ist die fraktionelle Natriumresorption zwar höher, aber die GFR erreicht nicht in vivo Werte und nicht die Werte der 5g Albumin Versuche (33, 145, 241). Dennoch ist das Konzept mit hohem COP zu perfundieren (z.B. 6,7-7,5g% Albumin) und das niedrige Filtrat in Kauf zunehmen in Hinblick auf die Stabilität der Präparation ein guter Kompromiss und ist v.a. beim Rezirkulationsmodus in Gebrauch. Um einen Vergleich der Resorptionsleistung bei vergleichbarer GFR zu erreichen haben wir bei hohem COP (Albumin >7,5g%) mit Verapamil das vas afferens geöffnet, den Perfusionsdruck leicht erhöht und so eine vergleichbar hohe GFR erreicht wie bei 6g% Albumin. Damit zeigt sich, dass die absolute Na-Resorption (T_{Na}) und die fraktionelle Na-Resorption bei hohem und mittlerem COP praktisch gleich sind. Eine hohe fraktionelle Na-Resorption ist in vitro nur bei reduzierter GFR zu erreichen, ein weiterer Beleg, dass das Modell nicht die in vivo Effizienz und Leistungsfähigkeit erreicht (s. Tab. 11.1.0., Abb. 10.2.3) (241). Ein Grund könnte u.a. an der in vivo optimierten Sauerstoffversorgung liegen.

Worauf beruht der große Unterschied zwischen dem Plasmastrom in vivo und der Perfusionsrate in vitro? Dies ist zum einen auf die niedrige Viskosität der zellfreien Albuminlösung zurückzuführen (deutlich niedriger als Blutplasma und alle anderen Plasmaersatzstoffe), zum anderen v.a. auf das Fehlen gefäßwirksamer Hormone wie u.a. Katecholaminen und Angiotensin bzw. Reninsubstrat und betrifft sowohl die Perfusion der Nierenrinde wie auch des Nierenmarks. Letzteres hat Konsequenzen für die Konzentrierfähigkeit der IPRK. Die hohe Markperfusion verhindert den Erhalt bzw. den Aufbau von hohen osmotischen Gradienten zwischen Nierenmark und Rinde. Dies bedeutet nicht, dass antidiuretisches Hormon keinen Einfluss hat. Gemessen an der Freiwasser-Resorption kann man den Effekt von AVP auf den Einbau von AQP2 in die luminale Membran des Sammelrohrs sowohl physiologisch erfassen als auch mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern nachweisen (Abb. 3.2.).

Formulierung von osmotischer Clearance, Freiwasser-Clearance und Freiwasser-Resorption:

Osmotische Clearance: $C_{\text{osmol}} = U_{\text{osmol}}/P_{\text{osmol}} \cdot \dot{V}$

Die **Freiwasser-Clearance CH_2O**
errechnet sich aus: Urinzeitvolumen
und osmotischer Clearance

die **Freiwasser-Resorption TH_2O** aus:
osmotischer Clearance und Urinzeitvolumen

$$CH_2O = \dot{V} - C_{\text{osmol}}$$

$$TH_2O = C_{\text{osmol}} - \dot{V}$$

Wie weiter unten und im Kapitel Ergebnisse im Vergleich gezeigt wird, ist der Unterschied in der Konzentrier- und Verdünnungsfähigkeit zwischen der in vivo Niere und der isoliert perfundierten Niere darin zu sehen, dass hohe Perfusionsraten im Mark bei zellfreier Perfusion den Aufbau eines nennenswerten Konzentrationsgradienten verhindern, aber durch Zusatz von gewaschenen Erythrozyten kommt man auf U/P_{osmol} Gradienten, die immerhin den Faktor 4 erreichen, wie Lieberthal 1987 zeigen konnte (138, 139). Gemessen an der Freiwasserresorption oder -ausscheidung ist der Unterschied nicht zu sehen, d.h. dass die Potenz der Konzentrier- bzw. Verdünnungsfähigkeit gegeben ist, wegen des fehlenden Konzentrationsgradienten aber nicht zum Tragen kommt. Was könnte der Grund sein für die Diskrepanz in der Konzentrierfähigkeit der in vivo Niere (der Ratte) die U/P_{osmol} Quotienten bis zu 10 erreicht und der Präparation von Lieberthal, die bei einem Hämatokrit von 45% (gewaschene Erythrozyten) nur 3-4 erreicht? Wahrscheinlich ist es der Unterschied der Perfusionsrate im Nierenmark, die mit gewaschenen Erythrozyten und Albumin als alleinigem Protein immer noch höher sein dürfte als mit Vollblut, das eine wesentlich höhere plasmatische Viskosität hat, v.a. durch Komponenten wie z.B. Fibrinogen, das mit 0,3g/dl einen ebenso hohen Beitrag zur Viskosität leistet wie 4g/dl Albumin. Dabei blieben gefäßwirksame Faktoren noch unerwähnt, die sicherlich auch einen Beitrag leisten, wie z.B. Katecholamine, Prostaglandine und Peptidhormone wie Angiotensin, Endothelin, ADH, etc. Im Innenstreifen des äußeren Nierenmarks ist die Rezeptoren-Präsenz für Angiotensin II besonders hoch ebenso wie die für Prostaglandin E_2 (36).

Wir wissen noch sehr wenig darüber, ob und wie z.B. Endothelin als hochwirksamer Vasokonstriktor am isolierten Organ zum Tragen kommt. Es kann prinzipiell vom Endothel selbst synthetisiert und abgegeben werden. Im Nierenmark findet sich v.a. im Bereich der Sammelrohre die höchste Dichte an natriuretischen Endothelin-Rezeptoren (119). Erwähnenswert scheint mir, dass die Flusskonstanz der perfundierten Niere besser erscheint bei der auf 8 Aminosäuren begrenzten Rezeptur gegenüber der Rezeptur aller 20 Aminosäuren. Dies ist jedoch bislang nicht systematisch untersucht worden, v.a. nicht mit Endothelin-Antagonisten bzw. Rezeptor-Antagonisten.

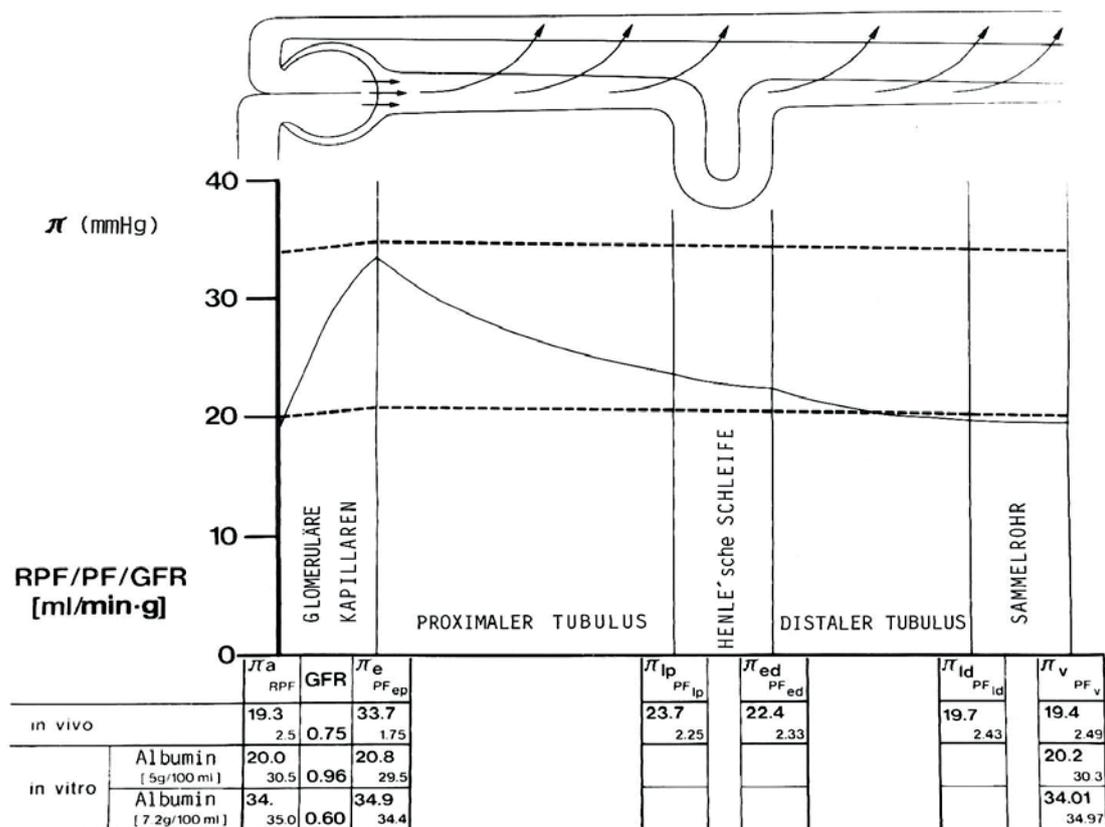


Abb. 3.0.1.: Profil des kolloid-osmotischen Drucks COP (idealisiert, schematisch) entlang des Nephrons. Vergleich von in vivo Befunden (durchgezogene Linie) mit der zellfrei isoliert perfundierten Niere bei zwei unterschiedlichen Albuminkonzentrationen (5g und 7,2g/dl). Originalzeichnung aus (240) entnommen und als Basisdaten publiziert (241).

In der Abb. 3.0.1. ist der gravierende Unterschied zwischen in vivo und in vitro Perfusion schematisch am Verlauf des kolloid-osmotischen Drucks dargestellt entlang des Nephron, zuerst entlang der glomerulären Kapillaren – da steigt der COP bei der Ratte stark an von 19,3 auf 33,7mmHg bei einer Filtrationsfraktion von rund 30% im Unterschied zur zellfreien in vitro Perfusion ob mit normalem oder überhöhter BSA Konzentration erreicht die Filtrationsfraktion weniger als ein Zehntel dessen (<3%). Im weiteren Verlauf ist der hohe postglomeruläre COP in der Lage das Reabsorbat des proximalen Tubulus in vivo optimal aufzunehmen. Das ist mit der zellfreien in vitro Perfusion nicht zu leisten, entweder der postglomeruläre COP ist zu niedrig wie bei „normalem COP “ des Perfusats mit einem Albumin von 5g%, oder er ist überhöht wie bei 7,2g% wie in diesem Schema vorgegeben.

In Abb. 3.0.2. ist die Darstellung auf die Druckverhältnisse der glomerulären Kapillaren beschränkt. Unter in vivo Verhältnissen ist eine Variante Hydropenie, bei der das Filtrationsgleichgewicht schon nach der Hälfte der Kapillarstrecke erreicht wird, bei der zweiten Variante erst am Ende der Strecke. Dagegen ist die in vitro Situation wesentlich übersichtlicher, ohne dass eine aufwendige Mathematik zur Beschreibung notwendig wäre.

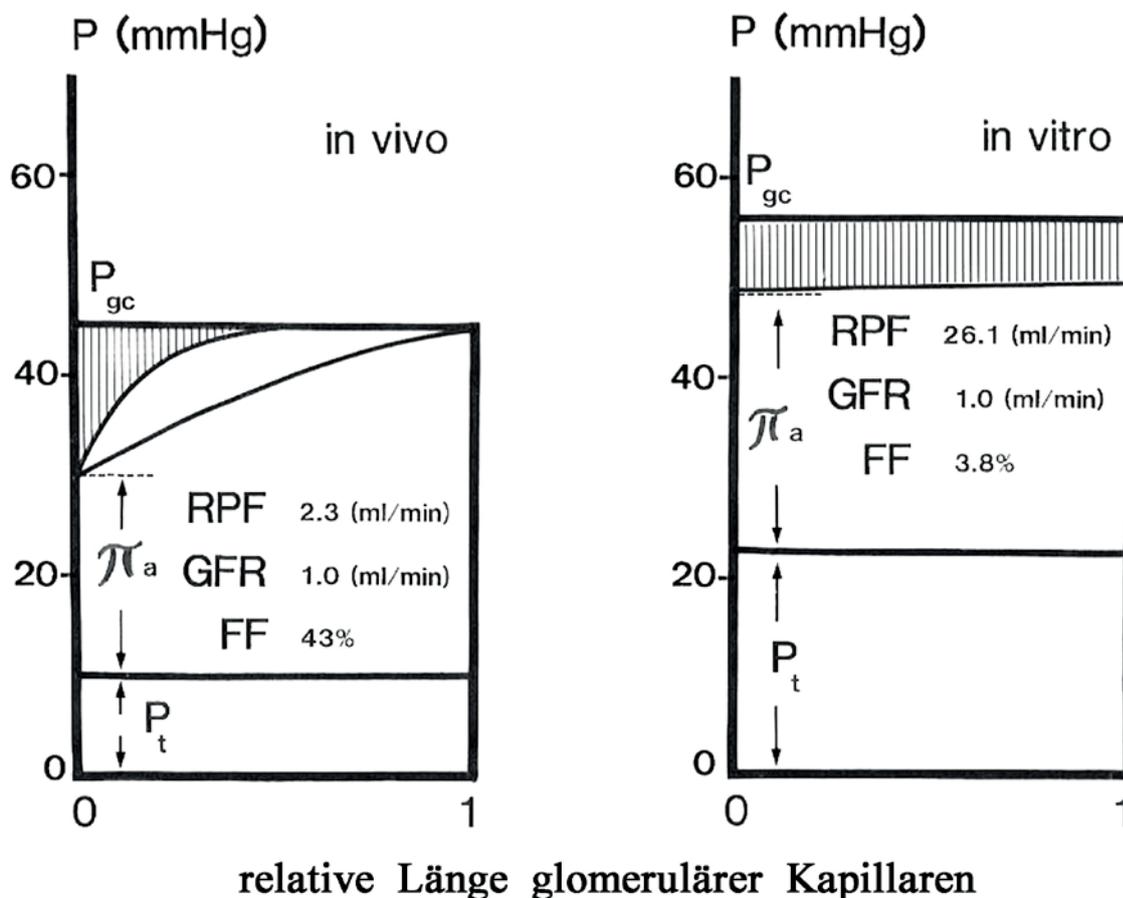


Abb. 3.0.2.: Vergleich der die Filtration treibenden Kräfte auf Einzelnephron-Ebene in vivo: unter normalem/ reduziertem Extrazellulärraum (EZR) mit Äquilibrium bzw. Disäquilibrium **mit der in vitro Situation** hoher Perfusionsraten bei um eine Zehnerpotenz niedrigerer Filtrationsfraktion bei gleicher GFR. Dementsprechend dynamische Veränderung des COP (π_a) in vivo entlang der Kapillaren, nicht so bei der in vitro Perfusion. Dies ist eine optimale Voraussetzung für die Analyse der glomerulären Filtrationsdynamik an der IPRK mit Mikropunktionstechnik (172, 173, 175, 257). P_t : Tubulusdruck, π_a : kolloid-osmotischer Druck, RPF: renaler Plasmafluss oder Perfusionsfluss, FF: Filtrationsfraktion.

Die letzte Abb. 3.0.3. zeigt die Parameter dreidimensional entlang der glomerulären Kapillarstrecke mit dem effektiven Filtrationsdruck **efp** auf der Ordinate, der Kapillarstrecke auf der Abszisse und dem Plasma- bzw. Perfusatfluss \dot{Q} auf der Z-Achse, im Vordergrund die Verhältnisse in vitro mit den hohen Perfusatflüssen bei einem sehr konstanten efp entlang der Kapillarstrecke, im Hintergrund die Kennlinien der in vivo Verhältnisse mit Plasmaflüssen im Bereich von 70-120nl/min. Auch hier eine Variante, bei der das Filtrationsgleichgewicht nach der halben Kapillarstrecke schon erreicht wird und weiteren auch unrealistischeren Varianten.

Eine ausführliche Diskussion über Fragen der Filtrationsdynamik unter in vivo Bedingungen findet sich bei William J. Arendshorst aus Chapel Hill (8, 9).

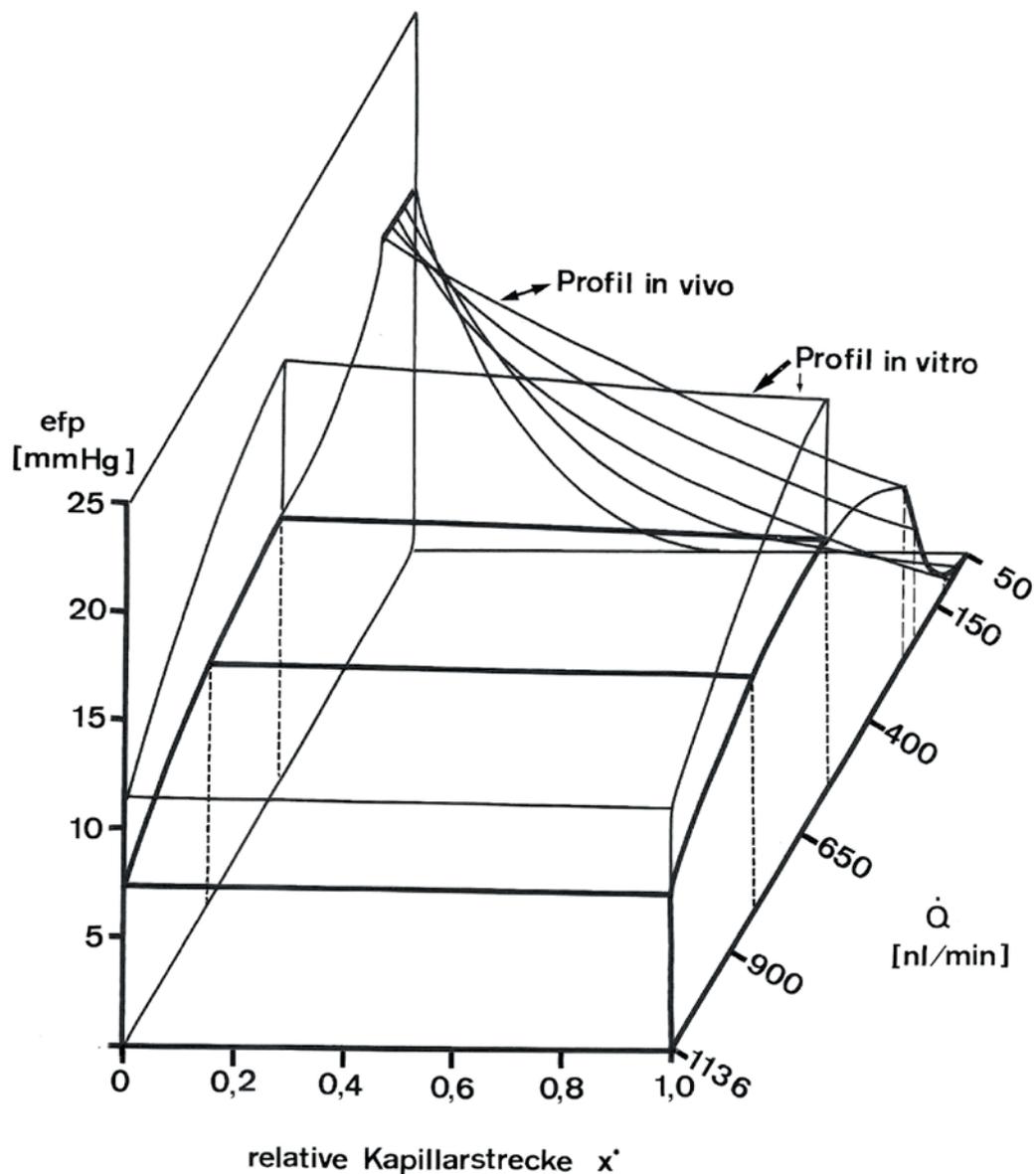


Abb. 3.0.3.: Auswirkungen von Änderungen des glomerulären Plasmaflusses \dot{Q} (nl/min) auf die efp Profile entlang der Länge der Glomeruluskapillaren. Im Unterschied zur in vivo Situation verändert sich der effektive Ultrafiltrationsdruck (efp) entlang der Kapillarstrecke bei der IPRK kaum, in vivo dagegen sehr deutlich, wenn sich der Plasmafluss (\dot{Q}) verändert. Der Plasmafluss \dot{Q} in nl/min erreicht bei der Ratte in vivo 70 bis maximal 120nl/min auf Einzelnephron-Ebene, in vitro liegt der Perfusatfluss dagegen um rund Faktor 10 höher (Z-Achse), sodass die um Faktor 10 niedrigere Filtrationsfraktion ermöglicht, dass die gesamte Filtrationsfläche unter sehr übersichtlichen Bedingungen zur Verfügung steht. Ein Filtrationsgleichgewicht noch vor Erreichen des Kapillarendes wie es in vivo vorkommt z.B. in Hydropenie gibt es nicht, s.a. Abb. 3.0.1., 3.0.2., die Abbildung ist der eigenen Arbeit entnommen (240).

3.1. Flusskonstante versus druckkonstante Perfusion

Für biochemische und pharmakologische Fragestellungen wird häufig die einfachere flusskonstante Perfusion bevorzugt, je nach Entwicklung des Perfusionswiderstands regelt der steigende oder fallende Perfusionsdruck dann einen Teil der Veränderungen wieder aus. Seitdem höhere BSA-Konzentrationen und regelmäßig in-line Filter im Rezirkulationskreislauf verwendet werden ist dies gut praktikabel. Speziell die reduzierte GFR bei hoher Albuminkonzentration und die dadurch geringere Transportarbeit kann zu der höheren Stabilität der in vitro Präparation beitragen (32).

Für physiologische Fragestellungen z.B. zur Hämodynamik oder Hydrodynamik im Tubulussystem ist eine druckkonstante Perfusion die Methode der Wahl. Dies setzt eine etwas aufwendigere Apparatur voraus mit Druckmessung in der Perfusionskanüle selbst (doppelläufige Kanüle) und Feedbackregelung der Perfusionspumpe und einer Ausdämpfung der Pulsatilität durch einen Windkessel und zusätzlich gegebenenfalls eine elektronische Dämpfung. Um die Konstanz für z.B. Mikropunktionsuntersuchungen zu erreichen haben wir selbst hierfür die 3. Perfusionsvariante bevorzugt mit einer substratangereicherten BSA Krebs-Henseleit-Lösung ohne/mit 5% humanen Erythrozyten, die über ein größeres Dialysatvolumen (5Ltr) permanent regeneriert und begast wird unter Ausnutzung des Dialysators als „kidney-lung“. Damit war eine Versuchszeit über 2-3h mit ausreichend konstanten Bedingungen zu erreichen auch für Mikropunktionsuntersuchungen an der isolierten Niere (172, 173, 175, 241, 257).

3.2. Konzentrier- und Verdünnungsfähigkeit

Während eine Rattenniere in vivo den Endurin um Faktor 4-10 gegenüber dem Blut konzentrieren kann, ist dies bei zellfreier Perfusion nicht erreichbar, auch bei ausreichend hoher Konzentration des antidiuretischen Hormons (AVP) Arginin-Vasopressin oder (1-deamino)-D-Arg-Vasopressin (dDAVP) nicht. Dies hängt im Wesentlichen mit der hohen Markperfusion zusammen, die in vivo u.a. deshalb viel niedriger ist, weil Vollblut visköser ist und Erythrozyten die langen engen Kapillarstrecken der Vasa recta passieren müssen, den Fluss auch wegen der mehrfachen Aufzweigung verlangsamen und dadurch erst den Aufbau hoher osmotischer Gradienten ermöglichen. Hinzu kommt als weiterer vielleicht entscheidender Faktor, dass Transportproteine für Harnstoff im medullären Sammelrohr und in der Erythrozytenmembran erst in Kombination die hohe Anreicherung von Harnstoff im Nierenmark ermöglichen, weil Erythrozyten positionsabhängig Harnstoff über diese Transportproteine schnell aufnehmen und ins Mark hineintragen es aber auch wieder schnell abgeben können (114, 217-219, 287). Das passive Modell zur Harnkonzentrierung, von Kokko und Rector propagiert (120), dürfte ausgedient haben seit der Entdeckung der Harnstofftransporter und aktuellen Untersuchungen in einzelnen Abschnitten der Henleschen Schleife (169, 218).

Zudem spielt eine Rolle, dass die TAL-Segmente, die als Motor des Konzentrierprozesses gelten besonders im Interbündelareal (zwischen den vasa recta Gefäßbündeln) bei der zellfrei perfundierten Niere rasch in Sauerstoffmangel geraten. Diese sind kortikalen und midkortikalen Nephronen zuzuordnen, während die TAL-Segmente der juxtamedullären Nephronen die Gefäßbündel unmittelbar umgeben und damit von der Radiärdiffusion von

Sauerstoff aus dem Gefäßbündel profitieren und bei Bedarf auch ihre GFR entsprechend erhöhen können. Erwähnenswert ist, dass auch diejenigen S_3 -Segmente des proximalen Tubulus, die im Interbündelareal direkt neben den betroffenen TAL-Segmenten liegen ebenfalls geschädigt sind (253).

Gemessen an der erreichbaren Freiwasser-Resorption bzw. Freiwasser-Clearance sind die Unterschiede zur in vivo Situation in der steady state Phase der ersten Stunde nicht sehr verschieden (Publikation in Vorbereitung). Das spricht für eine intakte Funktion der Sammelrohre (CD) in diesem Zeitabschnitt. Mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen Aquaporin 2 lassen sich die Verteilung von AQP2 entweder in der luminalen Membran der Sammelrohre unter AVP-Zugabe oder nach AVP-Entzug die Rückverteilung ins Zytoplasma nachweisen (118, 252). So kommt es im single pass Perfusionsmodus bereits 10 Minuten nach Perfusionsbeginn und AVP-freiem Perfusat zur Verdünnung des Urins, d.h. dass die Urinosmolalität unter die Perfusat-Osmolalität absinkt und freies Wasser ausgeschieden wird. Zugabe von AVP ergibt dann sehr schnell einen Wiederanstieg der Osmolalität und wie die Abb. 3.2.c zeigt kann man bei hoher Konzentration auch den Einbau von AQP2 nicht nur in die luminalen, sondern auch zusätzlich in die basolateralen Membranen nachweisen. Letzteres war unter in vivo Bedingungen nur unter erheblichem Aufwand und zusätzlichen Stimuli wie Langzeitbehandlung mit Aldosteron nachweisbar (61). Baines und Ross haben darauf hingewiesen, dass vor allem der nichtoxidative Stoffwechsel von Glukose für die Verdünnungsfähigkeit des Urins durch die Sammelrohre eine wesentliche Rolle spielt (16), eine Sichtweise die Julius J. Cohen bereits früher beschrieben hatte (52). Die dominante Rolle der Erythrozyten für den Aufbau einer hohen Konzentrierfähigkeit an der isoliert perfundierten Niere haben Lieberthal et al. gezeigt als sie einen steigenden Anteil aufwendig präparierter und gewaschener boviner Erythrozyten bis zu einem Hämatokrit von 45% addiert haben (138, 139). Dennoch konnte die höchste Urinkonzentration nur bei einem blockierten Prostaglandinsystem erreicht werden bei Anwesenheit von dDAVP in Höhe von 1200 mosmol/l, aber nicht wie in vivo bis zu 3000 mosmol/l in Antidiurese.

Bei zellfreier Perfusion erreicht man an der IPRK ein U/P_{osmol} im Minimum von 0,5-0,6, entsprechend einem U_{osmol} von ca. 160 mosmol/kg H_2O . Bei Zusatz von ADH, Arginin-Vasopressin (AVP) oder Desmopressin (dDAVP) erreicht man ein U/P_{osmol} von 1,1 bis 1,2, mit Erythrozytenzusatz wie beschrieben mehr. Im Einzelnen hängt es davon ab, ob man aus der in vivo Situation heraus ADH weiter zugibt und es dann entzieht oder sofort mit Perfusionsbeginn auf ADH verzichtet. Untersuchungen zu diesem Fragenkomplex haben wir in den letzten Jahren durchgeführt und eine Publikation hierzu ist in Vorbereitung (252).

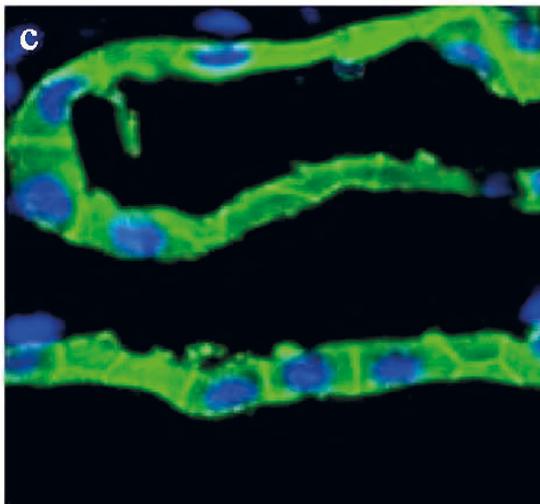
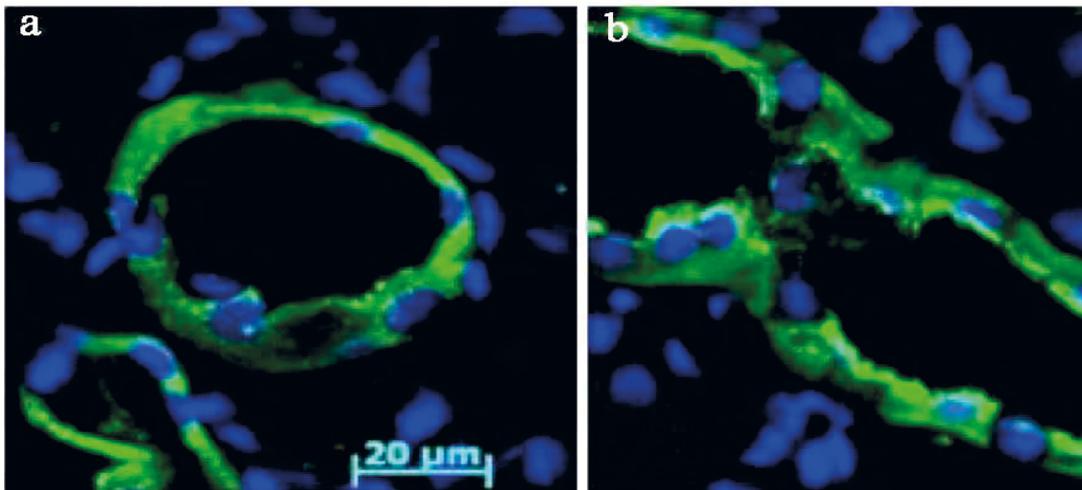


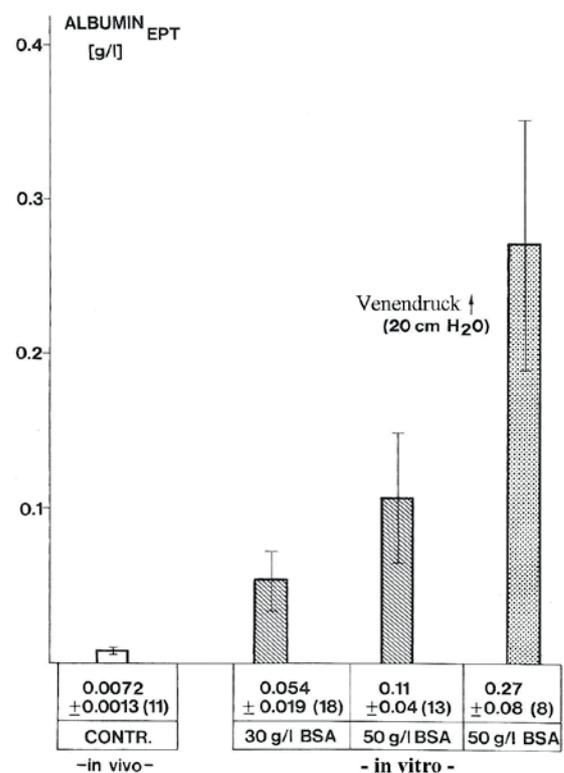
Abb. 3.2.a,b,c: Fluoreszenzmarkierung von AQP2 an der IPRK, a) nach AVP-Entzug diffuse Verteilung im Zytoplasma; b) unter AVP (10nmol) vorrangig eingebaut in die luminal Membran; c) bei überhöhter (x10) AVP Dosis Einbau in luminal und basolaterale Membranen des Sammelrohrs. Akutexperimente an der isoliert perfundierten Rattenniere. Zellkerne sind blau gegengefärbt.

Die Daten der Abb. 3.2.a-c wurden 2011 auf dem 90th Kongress der Deutschen Physiologischen Gesellschaft in Regensburg vorgestellt (252) und finden sich auch in der Dissertation von Jens Klockers (118), im Jahre 2010 promoviert zum Dr. rer.nat. im Fachbereich Biologie der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Münster.

3.3. Zur Permeabilität von Albumin an der IPRK und die „repaired defect“ Hypothese

In der ersten experimentellen Arbeit der Arbeitsgruppe von Brian D. Ross mit der isoliert perfundierten Rattenniere ist eine erhöhte Ausscheidung von Eiweiß im Urin der mit BSA perfundierten Niere gefunden worden. Bei einer sehr niedrigen Kreatininclearance von ca. 150 μ l/min fand man 3-5,3mg Protein/ml Urin (176). Begründet wurde dies mit einem Zitat von Richard W. Lippman, der in vivo bei der Ratte eine erhöhte Proteinurie fand, wenn er BSA injiziert hatte (143, 144). Wir haben uns intensiv mit diesen Fragen beschäftigt (185, 234, 235, 238, 242, 256, 282, 283). Die folgenden Abbildungen sollen exemplarisch diese Befunde charakterisieren, die zur Hypothese der „repaired defects“ geführt haben (234).

Abb. 3.4.: Mikropunktionsdaten für Albumin im frühproximalen Tubulus in vivo und in vitro. Die Tubulusflüssigkeit wurde durch Mikropunktion von frühproximalen Tubuli gewonnen. Die Albuminkonzentration wurde aus nl-Proben mit Hilfe einer Ultramikrodiscelektrophorese in Microcaps bestimmt durch Planimetrie (Joyce-Loebl Zweistrahl-Mikrodensitometer). Kontrollwerte wurden in Inactin-Narkose an der zur Mikropunktion exponierten Niere der Ratte in vivo gemessen. In vitro Werte wurden an der isolierten und mit Rinderserumalbumin (BSA) perfundierten Niere gemessen mit 2 verschiedenen Konzentrationen von BSA (3g% und 5g%) und die letzte Säule zeigt einen weiteren Anstieg nach Venendruckhöhung auf 20cm H₂O (280, 283). Das venöse Effluat wurde in einer Höhe von 20cm über Nierenniveau abgeleitet. Albumin_{EPT} = early proximal tubule.



Die Kritik von Michael Weiner, dass BSA nicht identisch ist mit Rattenserumalbumin ist nur insofern richtig, als es die Zahl an negativen Ladungen betrifft, die Größe und Form des Moleküls ist praktisch identisch (237). Das Rinderalbuminmolekül hat nach Peters 17 negative Ladungen im Vergleich zu 12 bei Rattenalbumin (194). Wenn negative Ladungen die glomeruläre Passage behindern (wovon wir ausgehen), müsste Rattenalbumin unter in vitro Bedingungen noch besser penetrieren als Rinderalbumin. Damit wird der Effekt also eher unterschätzt. Ein anderer Aspekt ist, dass Albumin in vivo als Transportmolekül für Lipide und auch wasserlösliche Substrate unterschiedlich beladen sein kann und dass dies mit den in vitro genutzten Molekülen nicht direkt vergleichbar sein dürfte. Eine Entfettung von BSA durch Aktivkohle haben wir nicht durchgeführt, lediglich eine intensive Dialyse. Danach wurden Aliquots bei -20°C bis zum Einsatz konserviert. Neuerdings ist ein Funktionstest von Albumin möglich (s. Kap. 9.8).

Um den Zeitgang im Anstieg der Proteinurie in der Übergangsphase *in vivo*/ *in vitro* genauer zu erfassen wurde im Stoffwechsellkäfig die Ausgangsproteinurie aus dem Sammelurin erfasst, der zweite Wert in der Narkose aus Ureterurin der später perfundierten Niere. Unmittelbar vor der Übergangsphase wurde die Urinflußrate durch Mannitol erhöht. Die folgende Abbildung ist modifiziert nach der Dissertation von Horst Pagel und ist in unserem Labor in Hannover entstanden.

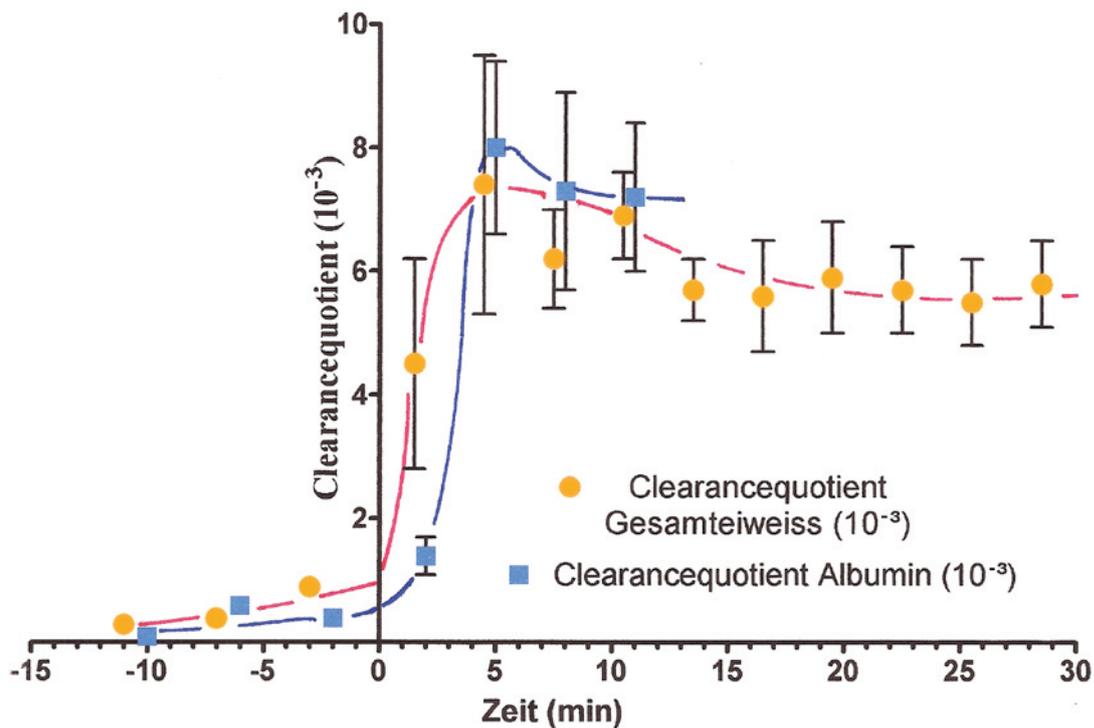


Abb. 3.5.: Der Clearance-Quotient für Protein/Albumin in der Übergangsphase *in vivo* – *in vitro*. Die ersten Werte auf der negativen Zeitskala sind Daten aus dem Stoffwechsellkäfig, dann folgen vor der Nullzeit Werte aus der Barbiturat-Narkose und der Wert unmittelbar vor dem Übergang wurde in Mannit-Diurese erhoben um das Urinzeitvolumen ausreichend anzuheben für die frühe Befunderfassung nach dem Übergang in die *in vitro* Perfusion (modifiziert nach Pagel (184, 185)). In der frühen *in vitro* Phase ist der Clearance-Quotient für Gesamteiweiß höher als der für Albumin, kurz danach gleicht er sich an, wenn die Auswaschphase des Übergangs abgeschlossen ist und mit dem Perfusat nur noch Albumin nachkommt.

Gibt man von Beginn an zum Perfusat einen Anteil von 5% Erythrozyten hinzu, reduziert sich der Clearance-Quotient auf die Hälfte und bleibt im weiteren Verlauf stabil, während er ohne Erythrozytenzusatz über die Zeit weiter ansteigt. Wie Swanson zeigen konnte, kann man den weiteren Anstieg auch nach späterer Zugabe zum Stehen bringen, sodass er nicht weiter ansteigt (284). Daraus ergibt sich die Frage, wie man das erklären kann. Die Beschäftigung mit dieser Frage hat mich zu der Hypothese gebracht, dass mit der *in vitro* Perfusion mit zellfreien Medien Membrandefekte demaskiert werden, die für die Passage von Albumin genutzt werden können. Die größeren Defekte können von einer Erythrozyten-

passage blockiert werden, die kleineren unterhalten die hohe Restausscheidung von Protein/Albumin (234).

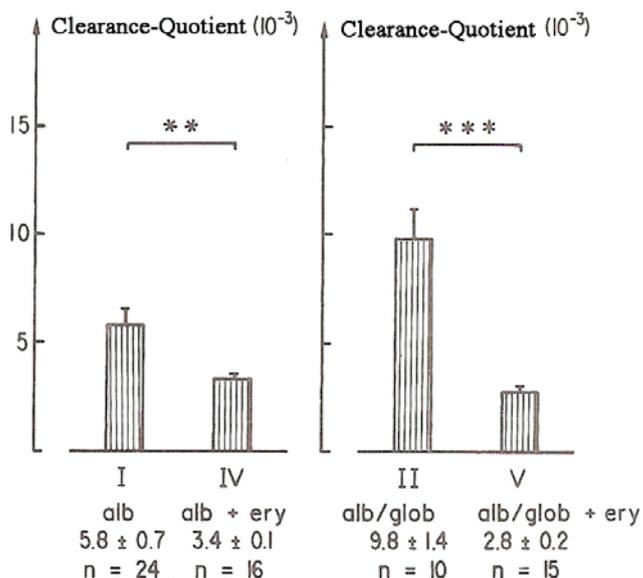


Abb. 3.6.1.: Clearance-Quotient für Albumin an der IPRK ohne und mit Erythrozytenzusatz.

Deutliche Reduktion des Clearancequotienten bei vergleichbarer GFR, (Versuchsgruppe I und IV). Der Unterschied wird in dem Kollektiv mit Albumin und Globulinzusatz noch deutlicher (Versuchsgruppe II und V) (184, 185).

Die folgende Abbildung ist modifiziert und der Untersuchung von Swanson (284) entnommen (mit copyright permission der American Physiological Society).

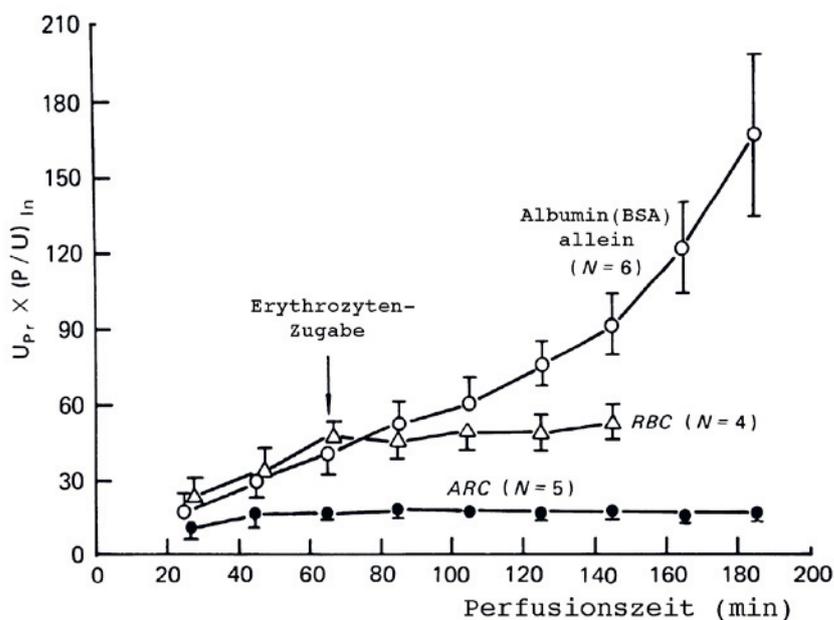


Abb. 3.6.2.: Errechnete Albuminkonzentration im Ultrafiltrat bei drei Versuchsreihen.

1. Perfusat mit Albumin und Erythrozyten (ARC),
2. zeitverzögerter Zusatz von roten Blutzellen (RBC) und
3. reine Albuminlösung ohne Zellzusatz.

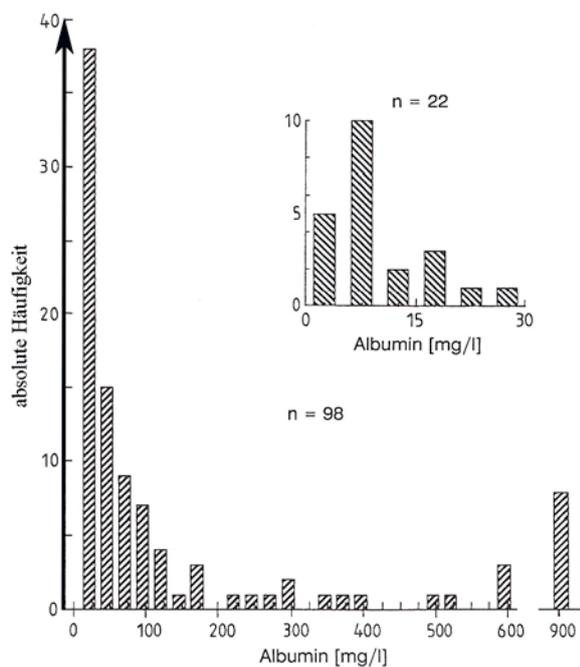


Abb. 3.7.: Häufigkeitsverteilung der Konzentration von Albumin in frühproximalen Mikropunktionsproben an der isolierten und zellfrei perfundierten Niere. Das kleine Insert sind Normalbefunde aus in vivo Untersuchungen an der Ratte (65). 17 von 22 Proben lagen unter 1,5mg%, 5 Proben bis maximal 3mg%. Unter dem Einfluss von Angiotensin kommt es zur Rechtsverschiebung der Häufigkeitsverteilung wie sie an der isoliert perfundierten Niere auch ohne All Infusion besteht.

Mit Angiotensin II ist an der IPRK keine weitere Erhöhung der Proteinurie zu finden (286). Dies könnte eine Basis sein für das Verständnis von funktionellen Proteinurien unter Belastung, Orthostase, Fieber, Herzinsuffizienz, die unter ACE-Hemmern blockiert werden können und alle der sogenannten unselektiven Proteinurieform zuzuordnen sind (29, 98, 232, 238, 239, 256).

Besteht ein Zusammenhang zwischen Proteinurie und Erythrozyten an der IPRK?

Die 1986 erstmals formulierte Hypothese der „repaired defects“ beruhte auf der Beobachtung, dass bei zellfreier Perfusion mit BSA als Kolloid die Niere sofort abbläst und ihre Eigenfarbe annimmt aber relativ lange nach Perfusionsbeginn noch eine mikroskopisch nachweisbare Hämaturie im Urinsediment sichtbar ist, die im Sinne einer e-Funktion abnimmt und nach ca. 60min sistiert (234). Perfundiert man mit einem Zusatz von 5% Erythrozyten, bleibt die Hämaturie mit ca. 100 Erys/min auch in der 2. Stunde der Perfusion erhalten; das liegt um Faktor 100 höher als in vivo. Viktor Repp hat in seiner aktuellen Dissertation (207) diese Untersuchungsreihen ergänzt und gezeigt, dass bei Perfusionen im single pass Modus ohne Kolloid und damit verbunden sehr hohen Urinzeit-Volumina die Ausscheidung von Erythrozyten noch schneller sistiert als mit BSA als Kolloid. Rechnet man die Zahl der insgesamt ausgeschiedenen Erythrozyten hoch kommt man auf $0,5-1,0 \times 10^6$

Erst mit einer höheren Anzahl von Mikropunktionsproben ($n = 98$) wurde klar, dass eine schiefe Häufigkeitsverteilung vorliegt. Viele Befunde lagen im Bereich der in vivo Werte und ein Anteil von ca. 16% lag im deutlich höheren Bereich, sodass man davon ausgehen konnte, dass nur der kleinere Teil an Glomeruli deutlichere Lecks bzw. Defekte aufweist, die unter der Bedingung einer zellfreien Perfusion demaskiert sind, durch Erythrozyten aber abgedichtet werden. Um valide Daten zu erhalten erfolgte die Probensammlung frühproximal unter Druckkontrolle mit dem in Berlin entwickelten System einer Mikroperfusionspumpe mit kombiniertem Miniaturdruckmesssystem (147).

Zellen, die via glomeruläre Kapillaren ihren Weg in den Endurin finden (Kalkulation aus AUC, area under the curve). Umgerechnet auf 30.000 Glomeruli pro Einzelniere sind es 17-34 rote Blutzellen pro Glomerulus, die aus „erythrozytär“ maskierten Defekten aus seinen glomerulären Kapillaren herausgewaschen werden – soweit die Hypothese. Was sie hinterlassen ist die höhere Albuminpermeabilität bei BSA im Perfusat, die wiederum durch Zusatz von nachdichtenden Erythrozyten reduziert werden kann. Die verbleibende Proteinurie ist noch immer vielfach höher als in vivo. Die Abdichterythrozyten sind also nur für die größeren Defekte zuständig (minimal 200nm). Unter in vivo Bedingungen gibt es eine Vielzahl an Möglichkeiten mit den Mitteln, die das Vollblut bietet, Defekte zu versiegeln. Das können zelluläre Elemente wie Erythrozyten und Leukozyten für größere Lecks sein und Thrombozyten sowie Gerinnungsfaktoren, Eiweißkörper wie z.B. Orosomuroid und die funktionelle Barriere der sogenannten „sieve plugs“, was einer funktionellen Auskleidung der Endothelfenster entspricht in den glomerulären Kapillaren. Diese „sieve plugs“ sind bei konventioneller Perfusionsfixierung verschwunden und lassen sich nur mit speziellen Verfahren nachweisen. Auch durch eine hämodynamische Störung wie z.B. eine Angiotensin II Wirkung lassen sie sich funktionell beeinflussen. Das könnte viele Formen einer funktionellen Proteinurie erklären ebenso wie Formen der permanenten oder funktionellen Hämaturie (Glomerulopathie der dünnen Basalmembran, höhere Basishämaturie bei Kindern gegenüber Erwachsenen – dünnere Basalmembran). Funktionelle Proteinurien wie die bei Fieber, Orthostase, Belastung, Stress oder Angiotensin II induziert, sind „unselektive“ Proteinurien und basieren demnach auf größeren Defekten als sie für die Albuminpassage benötigt werden. Experimente mit Dextranen unterschiedlicher Größe haben gezeigt, dass es durch Angiotensin II zu einer Verschiebung zur Durchlässigkeit der größeren Dextranmoleküle kommt (30).

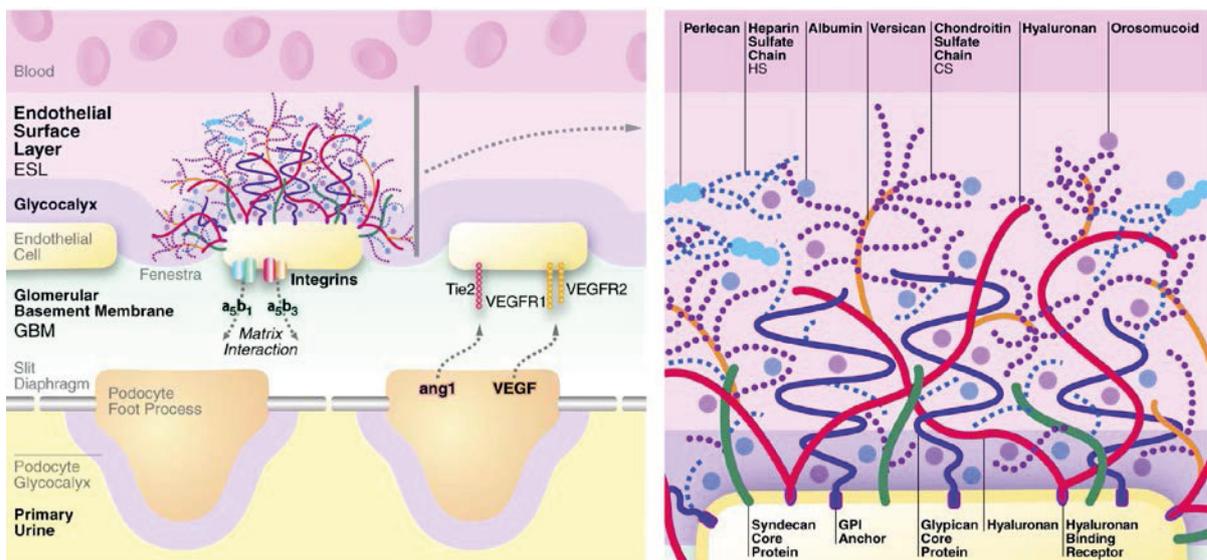


Abb. 3.8.: Darstellung der „sieve plugs“ in einem Review von Börje Haraldsson (92). Die Funktion von Orosomuroid wurde zufällig entdeckt bei Untersuchungen mit einem durch Orosomuroid „verunreinigten“ Humanalbuminpräparat (93) (copyright permission vom Autor und der American Physiological Society).

Untersuchungen am Modell der IPRK zur Bedeutung negativer Ladungen der glomerulären Barrierefunktion.

Die Siebungseigenschaften am Modell der IPRK für Makromoleküle sind ein dynamischer Prozess, der sich deutlich von den in vivo Bedingungen unterscheidet. Um die Bedeutung der negativen Ladungen für die Penetration negativ geladener Makromoleküle zu erfassen haben wir verschiedene Perfusionstechniken eingesetzt. Mit dem Einsatz des Polykation Protaminchlorid, mit dem man negative Ladungen neutralisieren kann, kommt es zu einer starken Vasokonstriktion, die aber mit Verapamil nahezu aufgehoben werden kann. Bei einer Permeabilität von Albumin an der IPRK, die als Ausgangswert gegenüber der in vivo Situation 10-20fach höher ist kommt es zu einem kontinuierlichen weiteren Anstieg auf das 100fache gegenüber der in vivo Situation (10, 11, 274, 275). Wenn man die gleiche Untersuchung an der reperfundierten, anatomisch fixierten Niere macht, sieht man nur einen geringen Anstieg der Permeabilität. Das komplexierende Polykation Protamin kann keine wesentlichen ultrastrukturellen Veränderungen der glomerulären Kapillarwand mehr bewirken, wenn durch Fixierung das Kollagengerüst der GBM bereits vernetzt ist. Ohne diese Vernetzung können negative Ladungen zu Ladungshaufen zusammengerafft werden und auf diese Weise können große Ladungslücken entstehen (74). Das Modell der fixierten und reperfundierten Niere wurde auch dazu eingesetzt, Perfusate mit BSA und mit unterschiedlichem pH zu perfundieren und mit einem chemisch kationisierten Albumin (305). Letzteres hat die Permeabilität um Faktor 2 erhöht, die pH Variation von pH 7,4 zu pH 4,0 um Faktor 8. In der gleichen Arbeit wurden verschiedene Größenklassen von Dextranen untersucht die unter Protamin nur in der Klasse T110 mit hohem Molekulargewicht einen Anstieg um Faktor 2,5 zeigten (305). Weitergehende Befunde an diesem Modell wurden in den Jahren 1999 bis 2003 publiziert (48-51) und zeigen, wozu dieses Modell genutzt werden konnte.

Die von Swanson beschriebenen Veränderungen mit Zunahme der Clearancequotienten für Albumin über die Zeit bei zellfreier Perfusion und stabilem Verlauf bei Erythrozytenzusatz entspricht qualitativ unseren eigenen Erfahrungen. Dies betrifft einen Erythrozytenzusatz von 5%. Damit lassen sich die sonst morphologisch nachweisbaren Schäden an TAL-Segmenten und proximalen S₃ Tubuli vermeiden. Viktor Repp hat in seiner Dissertation zeigen können (207), dass bei zellfreier Perfusion im Urinsediment bereits nach 30min erste Epithelzellen bzw. Epithelzellfragmente auftauchen als Ausdruck hypoxischer Zellschäden, die bei Erythrozytenzusatz ausbleiben. Reizvoll wäre es, die Grenzkonzentration an Erythrozytenzusatz auszutarieren, die notwendig ist um morphologische Schäden zu vermeiden. Die 5% haben wir bislang nicht unterschritten. Vorstellbar ist, dass bereits 2% ausreichen könnten (s.a. Beitrag Frank Schweda, Kapitel 14). Schon bei 5% ist die Kombination aus reduzierter Sauerstoffkapazität (nur ca. 10% der in vivo Kapazität) und mutmaßlich wesentlich höheren Durchflußraten auch im Nierenmark möglicherweise ausreichend, um hypoxische Schäden zu verhindern.

4. Perfusionstechniken

4.1. Perfusionsmedium

4.1.1. Elektrolytlösungen

Als Basis hat sich bei der normothermen Nierenperfusion eine Lösung vom Typ Krebs-Henseleit durchgesetzt, andere Salzlösungen (Tyrode- oder Ringerlösung in verschiedenen Varianten) haben für die Nierenperfusion nur historische Bedeutung, insbesondere Phosphatpuffer an Stelle von Bikarbonatpuffer sind verlassen. Der Bikarbonatpuffer macht eine Begasung mit z.B. 5% CO₂ (5-6%) erforderlich. Die Originalzusammensetzung der Lösung zeigt Tabelle 1. In Ergänzung hierzu die von uns bevorzugte, substratangereicherte Variante.

Tabelle 4.1.: Komposition der Salzlösung nach Krebs-Henseleit und Modifikation (mmol/l). Die *Cl-Konzentration wird bei Substratzusatz entsprechend reduziert bei konstant gehaltener Natriumkonzentration. Die Calciumkonzentration ist als Gesamtcalcium und gemessen als ionisiertes Calcium (Ca⁺⁺) angegeben. Das ionisierte Calcium liegt gemessen meist niedriger als theoretisch erwartet und errechnet, bei kontinuierlicher Dialyse kann das ionisierte Calcium selbst bei steigender Albuminkonzentration recht stabil niedrig gehalten werden, je nach Dialysatvorgabe (s.a. Abb. 9.1.1.).

Krebs-	NaCl	Na	Cl*	K(Cl)	Ca(Cl ₂)/Ca ⁺⁺	MgSO ₄	MgCl ₂	NaHCO ₃	HCO ₃	NaH ₂ PO ₄	KH ₂ PO ₄	Glukose	Harn-
Henseleit	118			4,7	2,52	1,64		24,88		Na ₂ HPO ₄	1,18	5,55	stoff
modifiziert		140	109	5	2,5/0,9		1		25-27	0,72		8,4	6
Substrate		140	105*	5	2,5/0,9		1(0,8)		25-27	0,72		8,4	6

4.1.2. Substratzusatz

Die Beobachtung, dass die Zugabe von verschiedenen Stoffwechselsubstraten der Glykolyse, des Zitratzyklus, von Fettsäuren lang- und kurzkettig wie Butyrat und von Aminosäuren die tubulären Transportprozesse verbessern, den Sauerstoffverbrauch erhöhen und die Präparation funktionell stabilisieren hat zum Einsatz verschiedener Substratmischungen geführt (24, 67, 246, 247, 254), quasi die Natur zum Vorbild.

Tabelle 4.2.: Rezepturen an Substratzugaben. Rezeptur R1 wurde seit 1972 genutzt und erstmals 1975 beschrieben (247). Glukose wurde von 5,5mmol/l auf 8,4mmol/l angehoben. Rezeptur R2 nutzen wir seit 1985 (253), Ketoglutarat und Malat seit 1986 (231). Butyrat wurde punktuell eingesetzt (236).

R1	Glukose	Pyruvat	Laktat	Glutamat	Oxalazetat
mmol/l	8,4	2	2	2	1

R2	Glukose	Pyruvat	Laktat	Glutamat*	Oxalazetat	Ketoglutarat	Malat	Butyrat	Cystein	Glutathion	Carnitin
mmol/l	8,4	0,3-2	2	1,6	1	1	1	1	0,5	0,5	0,1

*Die Hälfte ist durch die Aminosäure-Mischung vorgegeben. Pyruvat, Glutamat, Butyrat als Natriumsalz; Laktat, Oxalazetat, Ketoglutarat und Malat als Säuren, die ihr Kation aus dem Na-Bikarbonat-Überschuss beziehen und so einen hohen CO₂-Druck des fertigen Dialysats aufbauen (s.a. Herstellung der Lösung).

Tabelle 4.3.: Rezepturen für die Zugabe von Aminosäuren.

Zugabe einer 10% Aminosäurelösung (Aminoplasmal AS10 von Braun AG, Melsungen, BRD), Endkonzentration 0,1% (1ml/ad 100ml Basislösung). Bei den frühen Experimenten waren nur 8 Aminosäuren in der Rezeptur (241), wie schon 1976 von DeMello und Maack verwendet (60), also noch vor der Publikation 1982 von Franklin Epstein, der das Aminosäurespektrum ausgeweitet hat (67).

Rezeptur 1 ist aus der Publikation von Bowman und Maack 1972 mit 6 Aminosäuren (34).

Rezeptur 2 ist aus der Publikation von DeMello und Maack 1972 mit 8 Aminosäuren, die wir auch genutzt haben (60, 240, 241).

Rezeptur 3 wurde von Franklin H. Epstein 1982 propagiert mit 20 Aminosäuren (67).

Rezeptur 4 haben wir modifiziert seit 1982 genutzt (233, 253). Geringe Mengen Zitrat und Azetat sind durch die Batch Präparation der Basis-Lösung am Genius-System bedingt, das wir erst seit 2007 genutzt haben, s. 4.1.3.: Herstellung der Lösung.

R1	Aminos. mmol/l									Met 0,5										Arg 1		Ala 2	Gly 2	Asp 3							Ser 2
R2	Aminos. mmol/l	Ile 1								Met 0,5										Arg 1		Ala 2	Gly 2	Asp 3					Pro 2	Ser 2	
R3	Aminos. mmol/l	Ile 0,3	Leu 0,4	Lys 1	Met 0,33	Phe 0,32	Thr 0,24	Trp 0,07	Val 0,33	Arg 0,5	His 0,24	Ala 2	Gly 2,3	Asp 0,2	Glu 0,5	Pro 0,31	Ser 1	Tyr 0,2	Cys 0,5	Gln 2	Asn 0,2										
R4	Aminos. mmol/l	Ile 0,38	Leu 0,68	Lys 0,67	Met 0,3	Phe 0,28	Thr 0,35	Trp 0,08	Val 0,53	Arg 0,66	His 0,2	Ala 1,18	Gly 1,6	Asp 0,42	Glu 0,49	Pro 0,48	Ser 0,22	Tyr 0,02													
	weitere Substrate	Zitrat 0,05	Azetat 0,66	*																											

*Die Herstellung von Basiselektrolytlösung mit dem Geniusystem haben wir erstmals 2007 genutzt, erst dadurch kam es zum Eintrag von Zitrat und Azetat.

Die Vorläufersubstanzen für Glutathion sind Glutamat, Cystein und Glycin die offenbar verhindern, dass es zum schnellen Verlust an reduziertem Glutathion kommt. Dennoch hat erst die Zugabe des vollen Spektrums der physiologischen Aminosäuren eine Verbesserung der Funktionsparameter gebracht (67), allerdings bei reduziertem Filtrat.

Ein besonderer Hinweis: Die Rezeptur, die wir sehr erfolgreich eingesetzt haben in den Jahren 1975-1982/85 bestand aus einer BSA-Albumincharge von Reheis/Armour in USA, sterilem Wasser aus der Kliniksapotheke, sterilen Salzkonzentraten, wie sie im Intensivpflegebereich verwendet werden, einer Aminosäuremischung aus 8 Aminosäuren, wie sie von der Arbeitsgruppe um Thomas Maack verwendet wurde (60), einer Substratmischung

aus Glukose, Oxalessigsäure, Pyruvat, Laktat und Glutamat, wie wir es schon in Berlin genutzt hatten (247) und formal einer aus der Zugabe errechneten Calciumkonzentration von 1,25mmol/l im Dialysat (s. unten). Alle Komponenten, die bei der Präparation der Lösungen eingesetzt wurden wie Pipetten und Glasgefäße waren zuvor heißsterilisiert worden. Das Schlauchsystem für die Perfusionsapparatur war mit Äthylenoxyd sterilisiert und in Tüten eingeschweißt, die Metall- und Glaskomponenten heißsterilisiert. Diese Konsequenz hat sich damals ausgezahlt und war essentiell v.a. für die Stabilität der Präparation für die Mikropunktionsexperimente (172, 173, 175, 235, 240, 242, 256, 257, 281-283).

Zusammensetzung der Perfusionsmedien in der „besten Periode“

A. Dialysat zur Herstellung der Albuminstammlösung (BSA-Trockensubstanz wurde im Dialysat gelöst, und dann dagegen dialysiert, am Ende 10% Albuminstammlösung in 100ml Aliquots)

Na	140 mmol/l	Cl	123 mmol/l
K	5 mmol/l	HCO ₃	25 mmol/l
Ca	1,25 mmol/l	HPO ₄	0,72 mmol/l
Mg	0,6 mmol/l	Neomycin -sulfat	10 mg/l

B. Lösungen zur Perfusion & Dialyse des Perfusats (Endkonzentration)

Perfusat (100-250ml)

Dialysat (2000-5000ml)

Na	140 mmol/l	140 mmol/l
K	5 mmol/l	5 mmol/l
Ca	2,5* mmol/l	1,25* mmol/l
Mg	1 mmol/l	0,6 mmol/l
Cl	104 mmol/l	104 mmol/l
HCO ₃	25 mmol/l	25 mmol/l
HPO ₄	0,72 mmol/l	0,72 mmol/l
Harnstoff	6 mmol/l	6 mmol/l
Glukose	8,3 mmol/l	8,3 mmol/l
Na-Oxalazetat	1 mmol/l	1 mmol/l
Na-Pyruvat	2 mmol/l	2 mmol/l
Na-L-Laktat	2 mmol/l	2 mmol/l
Na-Glutamat	2 mmol/l	2 mmol/l
Methionin	0,5 mmol/l	0,5 mmol/l
Alanin	2 mmol/l	2 mmol/l
Serin	2 mmol/l	2 mmol/l
Glycin	2 mmol/l	2 mmol/l
Arginin	1 mmol/l	1 mmol/l
Prolin	2 mmol/l	2 mmol/l
Isoleucin	1 mmol/l	1 mmol/l
Asparaginsäure	3 mmol/l	3 mmol/l

*Die freie Ca-Konzentration im Dialysat war konstant, im Perfusat lag die Gesamtcalciumkonzentration bei höheren Albuminkonzentrationen höher, bei niedrigerem Albuminanteil entsprechend niedriger bis auf 1,25mmol/l bei albuminfreiem Perfusat. Die gemessene Konzentration an ionisiertem Calcium (Ca^{++}) lag um 0,2-0,3mmol/l niedriger als von der Zugabe errechnet. Wie man im Kapitel 9 über Meßmethoden sehen kann, ist die Beziehung zwischen Albumin und Calcium unter der Bedingung einer permanenten Dialyse zur Regeneration des Perfusats anders als erwartet, s. Abb. 9.1.1. Die theoretisch errechnete Calcium-Konzentration ist zudem niedriger wenn man sie im Dialysat mit der ionenselektiven Elektrode bei pH 7,4 misst, wie wir es zuletzt 2014 gemessen haben (Radiometer ABL 505). Albumin wurde in Konzentrationen von 2,5 bis 7g/dl eingesetzt, bei der Präparation der „nichtfiltrierenden Niere“ von 10g/dl. Differenzen der Na-Konzentration zwischen Perfusat und Dialysat sind von der Albuminkonzentration abhängig (proteinfreier Verteilungsraum).

4.1.3. Herstellung der Perfusions- und Dialysatlösung

Die Lösungen haben wir früher aus sterilem Aqua dest. und vorbereiteten Stamm-lösungen oder sterilen Konzentrat-Ampullen (klinische Zubereitungen) zusammen pipettiert. Kritisch ist dabei die Zugabe von Phosphat bei noch nicht mit CO_2 begaster Lösung, dies sollte langsam unter Rühren und als letzte Substanz bereits bei Endverdünnung der Lösung zugegeben werden, Opaleszenz bedeutet Ausfall von Calciumphosphat-Kristallen.

Bei Ansatz größerer Mengen (5-10 Liter), wie sie beim single-pass Modus oder Rezirkulation mit Regeneration durch Dialyse notwendig sind bevorzugen wir folgendes Vorgehen. Wenn die benachbarte Klinik über ein Genius-Dialysesystem (Fresenius Medical Care) verfügt, machen wir einen Lösungsansatz von z.B. 90 Litern und füllen durch Einblasen steril filtrierter Pressluft (Kleinkompressor, Silikonadapter) Aliquots in 5 und 10Liter Glasbehältern ab, die gasdicht verschlossen werden. Die Behälter wurden zuvor mit jeweils 50 bzw. 100mg Neomycin aus frisch angesetzter Neomycin-Stammlösung vorgefüllt (1g pro 10ml Aqua dest.). Danach werden die Glasbehälter bei 4-6°C kühl gelagert. Die Trockensalzkomponenten sind z.B. DS135/35 (135mmol Na, 35mmol HCO_3) und Flüssigkomponente HC42 (4mmol KCl, 1,25mmol CaCl_2 , 0,5mmol MgCl_2). Bei der Präparation der Lösung wird aus der NaHCO_3 Komponente über Säurezusatz (geringe Mengen HCl; Zitronensäure; Essigsäure) so viel CO_2 freigesetzt, dass der pH-Wert unter 7,0 liegt. Unter diesen Bedingungen kann die jetzt noch phosphatfreie Lösung über Wochen und Monate stabil gehalten werden. Am Tag der Verwendung wird diese Basislösung weiter mit den Substraten (z.T. als Na-Salz) Milchsäure, Äpfelsäure, Oxalessigsäure und α -Ketoglutar säure angesäuert (pCO_2 Anstieg) und mit den weiteren Zusätzen wie zusätzlich Magnesiumchlorid (aufgefüllt von 0,5 auf 0,8mmol/l), etwas mehr Kalium z.B. als Kaliumlaktat (1mmol/l), von 4mmol/l Ausgangswert auf insgesamt 5mmol/l angehoben und Glukose (von 5,5 auf 8,4mmol/l), Aminosäuren und gegebenenfalls mit AVP/dDAVP komplettiert und erst zuletzt wird Phosphat am Ende langsam zugegeben, dann wird die fertige Lösung mit filtrierter Pressluft (2 Bar) sterilfiltriert. Selbst dann ist der CO_2 -Druck noch immer erhöht und muss im Rahmen der Äquibrierung auf 40mmHg abgesenkt werden. Wir begasen mit einer Gasmischpumpe (Gigamax, Fa. Wösthoff Messtechnik GmbH, Bochum) initial mit reinem O_2 , ab pCO_2 40mmHg mit einer Mischung aus 95% O_2 und 5% CO_2 , mitunter auch 94 und 6% (bewährt hat sich eine zwischengeschaltete Kammer um geringe Mineralölrückstände der Gaspumpe sicher abzuscheiden). Unter diesen Vorgaben liegt das gemessene HCO_3 im

Bereich von 25-27mmol/l (von 35mmol reduziert durch Substratzusätze, als Na-Salz oder als Säure). Für die Sterilfiltration verwenden wir filtrierte Pressluft reduziert auf 2Bar, einen 10Liter Druckbehälter (Fa. Sartorius, Göttingen), ein Membranfilter mit 142 mm Durchmesser (0,2 µm Zelluloseazetatmembran) mit und ohne 2 Liter Aufsatz. Für die Single-pass Perfusion reicht das Standardfilter ohne Aufsatz. Für die Variante Rezirkulation mit Dialyse wird der 2 Liter Kopfaufsatz eingesetzt, zuerst wird das Dialysat aus dem 10 Liter Druckbehälter über den Aufsatz filtriert. Danach wird der dann entleerte 2 Liter Aufsatz mit dem albuminhaltigen Perfusat befüllt und direkt an die Druckquelle angeschlossen (s. Abb. 4.3.2.). Dieses Vorgehen ergibt sich aus einem Restvolumen des 10 Liter Druckbehälters, in dem ca. 200 ml Füllvolumen bauartbedingt zurückbleiben, ein Volumen, das für das Albuminperfusat inadäquat groß wäre (s.a. Abb. 4.3.1., 4.3.2.). Der verbliebene Dialysatrest von 200 ml kann verworfen oder per Trichter über den 2 Liter Aufsatz eingefüllt und nachfiltriert werden, bevor im dritten Schritt Albuminlösung filtriert wird.

4.1.4. Albuminstammlösung

Für Perfusionen mit Albumin als Kolloid im Rezirkulationsmodus oder im Modus 3 (Rezirkulation mit Regeneration des Perfusats durch Dialyse) wird eine 10% Albuminstammlösung in Dialysat (wie oben) angesetzt, also z.B. 1 kg Albuminpulver – BSA (bovines Serumalbumin) – gelöst auf 10 Liter Dialysat. Diese Albuminlösung wird danach volumenkonstant gegen ein Dialysat von 10 Litern im Kühlraum dialysiert mit einem „low flux“ Kapillardialysator über 6-8h mit Dialysatwechsel nach 2-4h. Damit will man erreichen, dass an Albumin gebundene Substanzen abgetrennt und dementsprechend verdünnt werden, was zu einer besseren Standardisierung beiträgt. Autoren wie Bowman, Maack und Bekersky wollen diese Substanzen erhalten und verzichten z.T. bewusst auf diese Aufreinigung (22, 32, 154, 155). Am Ende werden Mengen von 100 ml abgefüllt und bei -20°C eingefroren gelagert. Bei Untersuchungen zum Fettsäuremetabolismus war es notwendig Albumin auch zu entfetten indem Aktivkohle dazu eingesetzt wurde (55). Für den Modus 2, Rezirkulation wird am Versuchstag ein Aliquot Verdünnungslösung mit allen Zusatzkomponenten wie Substrate, Aminosäuren etc. hergestellt und mit dem Albuminstamm auf Endverdünnung gemischt und sterilfiltriert. Für den Modus 3 (Rezirkulation mit Regeneration des Perfusats durch Dialyse) genügt die Mischung mit Dialysat auf Endverdünnung und die Äquilibration im Dialysatmodus für den Versuch. Bei einem Volumenverhältnis Perfusat/Dialysat von 1:20 kann man die Verdünnung der Substrate vernachlässigen ($\Delta 5\%$) oder sie bei Herstellung des definitiven Dialysats miteinrechnen. In der Anfangsphase haben wir Albuminlösung in Cellophan (Cuprophan®)-Schläuche gefüllt und in einem großen Becherglas dialysiert mit Magnetrüherbetrieb.

4.1.5. Andere Kolloidzusätze

Im single-pass Modus sind aus Kostengründen verschiedene Kolloide außer Albumin (hohe Kosten) eingesetzt worden wie Gelatinederivate (Haemaccel[®], Gelifundol[®]), Dextrane, Hydroxyäthylstärke und Pluronic F108 und Ficoll 70. Diese Kolloide ermöglichen eine Begasung der Lösung über eine Glasfritte, was z.B. mit Albumin wegen der immensen Schaumbildung nicht möglich wäre. Smyth hat unverzagt einen Dialysator zur Begasung seiner Albuminlösung verwendet (270), (über Verluste durch Ultrafiltration war nichts zu

lesen). Bei vergleichbarem kolloid-osmotischem Druck hat eine Perfusionslösung mit Albumin die geringste Viskosität (163), erzielt demnach die höchsten Perfusionsraten bei vergleichbarem Perfusionsdruck und damit auch ein höheres Angebot an verfügbarem Sauerstoff. Dadurch ist die GFR bei vergleichbarem COP höher als bei anderen Kolloiden.

Tabelle 4.4.: Übersicht über gebräuchliche Kolloide, die neben Albumin (BSA) in der IPRK Präparation verwendet werden als alleiniges Kolloid oder in Kombination, wie bei Smyth BSA/Ficoll (268).

Brandname	Kurzname	chemisch	Hersteller
Haemacel®	Polygelin	Gelatine, vernetzt	Delta Select
Dextran	Polysaccharose		Pharmacia
Ficoll®, Histopaque®, Polysucrose	Copolymer	Sacharose-Epichlorhydrin-Copolymer	GE Healthcare
Haes-steril®	HAES	Hydroxy-Aethyl-Stärke	Fresenius Kabi
Pluronic F108	PEG-PPG-PEG	Polyaethylenglykol-Polypropylenglykol-Polyaethylenglykol	BASF, Sigma Wyandotte MI USA

Die künstlich hergestellten Kolloide haben kein so gut und scharf definiertes Molekulargewicht wie Albumin. Nieder- und mittelmolekulare Anteile z.B. von Gelatinepräparaten werden z.T. filtriert und durch Flüssigkeitsresorption in den Harnkanälchen distal bis zu einer deutlich erhöhten Viskosität eingedickt (verifiziert durch intratubuläre Druckmessungen, unveröffentlicht). Dies reduziert die GFR und dürfte Relevanz dann haben, wenn das Kolloid ausschließlich verwendet wird (247). Resorption von filtrierten Kolloiden führt im proximalen Tubulus zu Veränderungen mit Vakuolisierung (256), das gilt in begrenztem Umfang auch für Albumin (BSA), das am isolierten Organ um Faktor 10-20 vermehrt filtriert wird gegenüber den in vivo Verhältnissen (234, 235, 238, 256, 282, 283). Physiologen aus Nijmegen in Holland haben die fraktionelle Clearance von Pluronic F108 bestimmt in Abhängigkeit von der GFR und gezeigt, dass bei niedrigem Filtrat von 0,2ml/min der Siebkoeffizient bis auf 0,58 ansteigt und bei hohem Filtrat von 1ml/min immerhin noch bei 0,33 lag (41). Das entspricht einer erheblichen Menge filtrierten Kolloids. Durch Natrium- und Wasserresorption kann dadurch die Urinviskosität deutlich ansteigen und die Hydrodynamik im Harnkanälchensystem gestört werden. Ein Ergebnis ist dann das in der Regel niedrigere Filtrat (<0,5ml/min g Niere).

Bei reiner Rezirkulation ist das notwendige Füllvolumen des Systems von mehreren Parametern abhängig. Zum einen von der Bauart des eingesetzten Oxygenators, zum anderen von der Dauer der Vorperfusion bis die Rezirkulation geschlossen wird. Im Minimum liegt das Rezirkulationsvolumen bei ca. 40-80ml (18, 34), wenn z.B. ein Glasoxygenator verwendet wird. Zu bedenken ist, dass Arginin als NO-Quelle sehr rasch verbraucht wird und damit der Perfusionswiderstand zunimmt. Dieses Problem ist bei Rezirkulation mit höheren Volumina oder bei Einsatz hoher Albuminkonzentrationen (>7g%) geringer und bei Regeneration des Perfusats durch Dialyse zu umgehen. In jedem Fall ist eine Phase der Vorperfusion meist per Schwerkraft eingesetzt worden bevor der

Rezirkulationskreislauf geschlossen wurde (154, 155). Die von uns bei dem Modus 3 (Rezirkulation, Regeneration des Albuminperfusats durch Dialyse) eingesetzten Volumina sind primär 250ml Albuminperfusat (BSA 5g/dl) und 5000ml Dialysat. Die Menge des Albuminperfusats reduziert sich durch die initiale Perfusion im single pass Modus auf ca. 200ml bis der Rezirkulationskreislauf geschlossen ist (z.B. 6min à 8ml/min s. Methodik). Wir perfundieren initial mit der Pumpe flusskonstant mit ca. 8-10ml/min bis der Rezirkulations-Kreislauf etabliert ist.

Das Dialysat wird per Glasfritte begast (95%O₂/5%CO₂), der Dialysator dient gleichzeitig als Oxygenator zur Äquilibration des Perfusats (dialung). Das Verfahren wurde erstmals für die Perfusion der isolierten Rattenleber beschrieben (19); Abraham (2) wies daraufhin, dass Mayes & Felts dies 1966 parallel beschrieben haben (161). Als Dialysator sollten nur sogenannte low flux Dialysatoren verwendet werden. High flux Dialysatoren haben eine zu große Albuminpermeabilität. In vivo spielt dies bei Dialysepatienten keine große Rolle, da Vollblut zur Abdichtung führt für Moleküle in der Größenklasse von Albumin. In den ersten Jahren haben wir den von Hoeltzenbein entwickelten Kapillarplattendialysator von Travenol verwendet, später auch den Querstromdialysator Secon 101 aus Göttingen, in den letzten 6 Jahren den low-flux Polysulfon Hohlfaser Kapillar-Dialysator F4 von Fresenius Medical Care und nachdem auch dieser nicht mehr verfügbar war 2014 den Nachfolgetyp FX5. Der F4 Dialysator hatte ein Füllvolumen von 50ml bei 0,8m², der FX5 hat 54ml bei 1m² Oberfläche.

4.1.6. Semisynthetisches Perfusat mit Sauerstoffträgern

Will man Sauerstoffmangel vermeiden ist es notwendig bei der Nierenperfusion dem Perfusat Sauerstoffträger hinzuzufügen. Dass die Warmblütneriere so empfindlich ist gegen Sauerstoffmangel hängt mit der Gefäßarchitektur zusammen besonders im äußeren Mark, im Unterschied z.B. zu dem Herzpräparat von Langendorff, das selbst ohne Kolloidzusatz und Sauerstoffträger recht lange und funktionell gut überlebt (63). Im Bereich der Gefäßbündel des Nierenmarks kommt es systematisch zur Shunt diffusion von Soluten aber auch von Blutgasen zwischen absteigenden und aufsteigenden Vasa recta, was einerseits die osmotischen Gradienten zwischen Mark und Rinde erst ermöglicht, aber auch zu niedrigen O₂-Drucken im inneren Mark und zum CO₂-trapping führt, was lange bekannt war. Weniger bewusst und klar war, dass Shunt diffusion auch in der Nierenrinde eine große Rolle spielt v.a. zwischen der flächenmäßig größten Kontaktzone von Arteria und Vena interlobularis (181, 249-251). Nicht zuletzt ist es diesem Umstand zu verdanken, dass hier in der Nierenrinde im Rahmen der Evolution die Synthese von Erythropoietin angesiedelt wurde, zumal eine Reduktion von Sauerstoffdruck und Sauerstoffkapazität des Blutes hier in der Nierenrinde effizient gemessen werden kann (121, 122, 127, 132) quasi in einem Organ, dessen Stoffwechsel repräsentativ die Aktivität des Gesamtorganismus abbildet. Verschiedene Möglichkeiten sind evaluiert worden durch Einsatz von Sauerstoff-Trägern die Funktion der isolierten Warmblütneriere zu verbessern. Genannt seien:

- 4.1.1.1. **Perfluorocarbon-Präparate**, hoher Löslichkeitskoeffizient für Blutgase (78), Problem ist die Generierung homogener Teilchengrößen und die Emulgierung.
- 4.1.1.2. **Stromafreie vernetzte Hämoglobinpräparate**(15, 137, 141, 298, 299)
- 4.1.1.3. **Gewaschene bovine oder humane Erythrozyten** (138, 221, 253).



Abb. 4.1.1.: *Sagittalschnitt einer Rattenniere nach Perfusion mit per Ultraschall emulgiertem Perfluorocarbon als Perfusat.* Bei inhomogener Teilchengröße bilden die weiß markierten Strukturen den Gefäßbaum ab. Ein früher, frustraner Versuch die hohe O₂-Löslichkeit zu nutzen (Berlin 1973). Das Problem war eine rasche Widerstandszunahme mit Abfall der Perfusionsrate. Holger Franke hat eine Arbeit publiziert (78) mit einer Emulgiertechnik, die hohe Drucke einsetzt, was wohl zu homogeneren Teilchengrößen führt. Das Verfahren konnte sich dennoch nicht durchsetzen.

Die großen Hoffnungen, die auf emulgierten Perfluorokarbonkügelchen und auf Hämoglobin-Präparationen (15, 78, 137, 140, 141, 273, 298, 299) beruhten, haben sich bisher nicht erfüllt. Bleibt das Verfahren, gewaschene Warmblüter-Erythrozyten zu addieren. Es genügt, einen Anteil von 5 (-10)% Erythrozyten hinzuzugeben, wenn mit 95% O₂ und 5% CO₂ äquilibriert wird bedingt durch die hohen Perfusionsraten. Dieser Perfusatmodus wurde bereits von H. Schimassek für die isolierte Rattenleber eingeführt (221). An der isoliert perfundierten Rattenniere führt ein Zusatz von 5-10% gewaschenen bovinen- oder humanen Erythrozyten dazu, dass morphologisch nachweisbare O₂-Mangelschäden an P3 [S3]-Segmenten des proximalen Tubulus und Arealen der TAL-Segmente ausbleiben (253, 290), führt aber nicht zu der Funktionskonstanz, wie sie an der in vivo Niere zu beobachten ist.

Funktionskonstanz der IPRK ist ein kritischer Punkt. Bei Einsatz von 5g/dl Albumin (BSA) und einem COP unter 20mmHg erreicht man bei einem Perfusionsdruck von 100mmHg eine ähnlich hohe GFR wie in vivo von ca. 1ml/min·g Niere, die Funktionskonstanz – gemessen an der fraktionellen Na-Resorption – nimmt aber zeitabhängig kontinuierlich ab. Erhöht man die Albuminkonzentration auf 7g/dl – das entspricht dem postglomerulären Kapillarbett der in vivo Niere – ist die Funktionskonstanz in Bezug auf die fraktionelle Natriumresorption besser, allerdings bei halbiertem GFR. Damit lässt sich der Funktionsverlust scheinbar kaschieren (155). In diesem Befund enthalten ist eine unbeantwortete Frage, warum die isoliert perfundierte Niere nicht die Funktionskonstanz der in vivo Niere zeigt, trotz vermeintlich optimierter Bedingungen. Die in vivo Bedingungen sind eben weitaus komplexer und in jeglicher Hinsicht optimiert (Homöostase, Interaktionen mit anderen Organen, hochkomplexer Perfusat-"Cocktail", Blut als ein "ganz besonderer Saft", Goethe, Faust I, Studierzimmer II). Mit dem Modell der IPRK sucht man die Vereinfachung und das erkauft man sich mit einer veränderten und eingeschränkten Funktion.

Warum sollten Erythrozyten gewaschen werden?

Vollblut, das ungerinnbar gemacht wurde z.B. mit Heparin führt bei extrakorporaler Perfusion der Niere sofort zu einem extrem erhöhten Perfusionswiderstand (44, 97, 177, 179). Bei konstantem Druck kommt die Perfusion praktisch zum Stillstand. Der vasokonstriktorische Faktor ist im Plasma enthalten, er stammt wie Nizet meint aus den Erythrozyten und ist mit α -Blockern oder dem Calciumblocker Verapamil antagonisierbar. Verapamil hat es uns ermöglicht die Clearance von urämischen Mittelmolekülen aus Hämofiltrat von Dialysepatienten an der IPRK analysieren zu können. Das konstriktorische Prinzip ist eben auch in urämischem Hämofiltrat vorhanden, weil hier Blut mit Fremdoberflächen in Kontakt kommt (222, 223) und den Faktor offenbar freisetzt.

Deshalb bietet es sich an, das Perfusat halbsynthetisch zu komponieren aus gewaschenen Erythrozyten und einer Albumin-Krebs-Henseleit Lösung. Durch Abtrennen von buffy-coat und Blutplasma und drei - fünfmaligem Waschen der Erythrozyten ist das Phänomen der Vasokonstriktion zu vermeiden, d.h. wenn dies als semisynthetisches Perfusat mit Erythrozytenzusatz verwendet wird. Als Waschmedium nutzen wir das fertige Dialysat.

Rindererythrozyten gelten als recht stabil, sind aber nicht immer einfach frisch zu bekommen. Humane Erythrozyten lassen sich aber auch gut verwenden. Sie haben eine vergleichbare Größe von 7 - 8 μ m wie Rattenerothrozyten mit 7,4 μ m (199). Für einen Rezirkulationskreislauf von 200-250ml wird nur eine Ausgangsmenge von 50-100ml Vollblut benötigt (für 2 Experimente), das mit einer Heparinvorgabe von 5000 Einheiten abgenommen wird. Humanerythrozyten aus abgelaufenen Blutkonserven sind für die Leberperfusion (Rattenleber) mit gutem Erfolg verwendet worden, für die Nierenperfusion stört der nicht vermeidbare Anteil an Hämolyse (dass Hämolyse durch Tocopherol vermeidbar ist wurde in der Literatur beschrieben (164, 304)), wir selbst haben aber hierzu bisher keine positiven Erfahrungen und ob es für Konservenblut wirksam ist, dazu fehlen Untersuchungen. Dennoch sind Versuche mit Vollblut früher in großem Umfang an größeren Versuchstieren durchgeführt worden (177, 179, 229) unter Einsatz von z.B. α -Rezeptor-Blockern. 1987 hat Lieberthal in zwei Publikationen Rindererythrozyten eingesetzt, die in einem professionellen und sehr aufwendigen Verfahren unter sterilen Bedingungen gewaschen und aufbe-

reitet wurden. Die Ergebnisse dieser Arbeiten zeigen, dass sich der Aufwand gelohnt hat. Lieberthal konnte so zeigen, welche Bedeutung den Erythrozyten zukommt beim Aufbau von Konzentrationsgradienten zwischen Nierenrinde und Mark. Bei zellfreier Perfusion findet sich ein maximaler osmotischer Gradient U/P_{osmol} unter Antidiuretischem Hormon (AVP, ADH) von 1,2 und erst der zunehmende Anteil von Erythrozyten bis auf einen Hämatokrit von 45% kann den Quotienten auf ca. 3-4 anheben. Ein Quotient von 4 war nur unter Prostaglandin-Synthesehemmern erreichbar (138, 139). In vivo erreicht die Ratte in Antidiurese einen Faktor bis 10, entsprechend einer Osmolalität im Urin von 3000mosmol/l.

Präparation von Rindererythrozyten (nach Wilfred Lieberthal, (138, 139)).

Rinderblut wurde direkt von der Jugularvene lebender Kühe in sterile Beutel geleitet (wie von Blutbanken verwendet), die mit Na-Zitrat und Dextrose vorgefüllt waren (Fenwall Labs., Travenol). Die Erythrozyten wurden innerhalb von 3 Tagen verarbeitet mit einer sterilen Technik zum Entzug von Plasma, Leukozyten und Blutplättchen. Das Blut wurde mit 3.500g 10 min zentrifugiert. Der Plasmaüberstand wurde entfernt. Die verbliebenen Zellen wurden durch ein Filter zur Entfernung von Leukozyten und Blutplättchen hindurchgepresst (Pall Filter). Die Zellen wurden dann gewaschen in einem blood cell processor (IBM, model 2991) mit einer Lösung aus 0,9% NaCl, das 0,2% Dextrose (Glukose) und 40mg/dl anorganisches Phosphat mit einem pH 7.0 enthielt. Jede Charge von Erythrozyten wurde 5-mal mit jeweils 200ml dieser Lösung gewaschen. Danach wurden die Zellen in dieser Lösung in sterilen Beuteln resuspendiert und bei 4°C für maximal 2 Wochen aufbewahrt. Teste ergaben, dass 97,8% der Leukozyten und 97,6% der Plättchen entfernt wurden. Am Versuchstag wurde ein adäquates Volumen der Erythrozyten aus dem Beutel steril entnommen und noch einmal 3 mal gewaschen wiederum mit Entfernung des Überstands (buffy coat) und dann mit der Albuminlösung auf einen Hkt von bis zu 40-45% gebracht.

Meine Kritik: vor einer Kritik besteht zunächst eine Bewunderung für die Konsequenz und den Aufwand, der von Wilfred Lieberthal für die Präparation der Rindererythrozyten getrieben wurde. Den letzten Waschvorgang am Versuchstag hätte ich allerdings mit einer Krebs-Henseleit-Bikarbonatlösung gemacht. Die Erythrozyten sind durch die Vorbehandlung mit 0,9% NaCl Lösung mit Chlorid angereichert und an Bikarbonat verarmt (224). Beim Mischen mit der Krebs-Henseleit-Albuminlösung werden sie den Chlorid Überschuss gegen Bikarbonat aus der Resuspensionslösung austauschen, was voraussetzt, dass diese entsprechend mehr an NaHCO_3 enthält. Dies wäre allerdings kein Problem, wenn man unseren Modus 3 einer Rezirkulation mit Dialyse gegen ein großes Dialysatvolumen einsetzt. Das aufwendige Verfahren von Lieberthal ist dennoch nachahmenswert, setzt aber entsprechende Ressourcen voraus und die Möglichkeiten, die eine Blutbank bietet mit einem „blood cell processor“ auch für tierisches Rohmaterial.

Anmerkung

Dr. Jan Czogalla aus Zürich hat eine Möglichkeit gefunden, frisches und defibriertes Schafblut aus England zu beziehen. Details finden sich am Ende des Beitrags von Frank Schweda, Kapitel 14.

4.2. Antrieb der Perfusion, Druck- und Flussmessung

4.2.1. Hydrostatischer Druck

Es ist die einfachste Methode, zwischen Perfusionslösung und Organ den Höhenunterschied auszunutzen, oder im Fall einer single-pass Perfusion den Gasdruck als treibende Kraft einzusetzen, in dem das Gasgemisch über eine Wassersäule oder ein reguliertes Ventil abgeführt wird.

Im Rezirkulationsmodus muss mit Hilfe einer Pumpe (Schlauchpumpe) auf das Gefälle-Niveau hochgepumpt werden, ein Beispiel ist die Anordnung, die im Labor von H.A. Krebs von B.D. Ross und Nishihitsutsuji-Uwo eingesetzt wurde (176). Das temperierte Kabinett musste dazu in der Höhe vergrößert werden. Der Fluss wurde entweder mit injizierten Gasblasen in einem kalibrierten Glasrohr gemessen (s.a. Abb. 4.1.6.) oder per Rotameter, das sind Schwebekörper-Durchflussmesser die punktuell abgelesen werden (diese werden von verschiedenen Firmen in Deutschland und im Ausland angeboten).

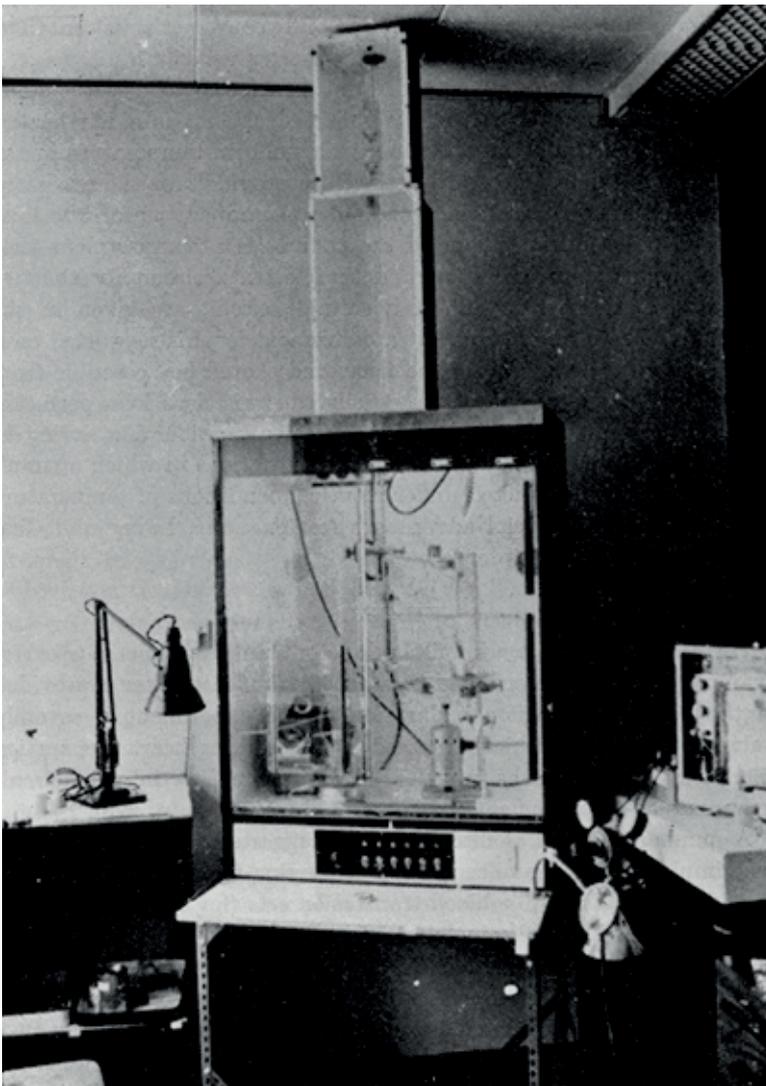


Abb. 4.1.2: Perfusionskabinett für die IPRK.

Die Aufnahme ist dem Buch von BD Ross (213) entnommen und zeigt das für die Nierenperfusion überhöhte Kabinett mit der hohen Position des Oxygenators, um einen ausreichenden hydrostatischen Druck aufzubauen. Bei Perfusion einer Rattenleber wird üblicherweise nur über die vena portae perfundiert mit deutlich niedrigerem Druck, da reicht die normale Höhe des Kabinetts. (copyright permission vom Autor).

4.2.2. Gasdruck

Im single-pass Modus ist dies ohne großen Aufwand realisierbar, dabei wird das Gasgemisch (95% O₂, 5% CO₂) für die Oxygenierung mit Überdruck per Glasfritte in einen geschlossenen Behälter (z.B. Woulffsche Flasche) geleitet und der Gasabstrom über ein z.B. 2 m hohes Glas-Steigrohr abgeführt, damit kann ein in Grenzen konstanter Perfusionsdruck aufgebaut werden, wobei der Perfusionsdruck etwas von der Flussrate abhängig ist, je nach Perfusionswiderstand der Perfusionskanüle, besonders wenn der Druck vor der Kanüle gemessen wird. Technisch ist dies mit einem fertigen Gasgemisch (Carbogen 95%O₂, 5% CO₂) in der Druckflasche mit einem Gasdruckminderer (am besten Doppelregulus) oder mit zwei Gasen und einer Gasmischpumpe einfach realisierbar (Abb. 4.1.3.). Das Gas sollte filtriert und angefeuchtet eingesetzt werden.

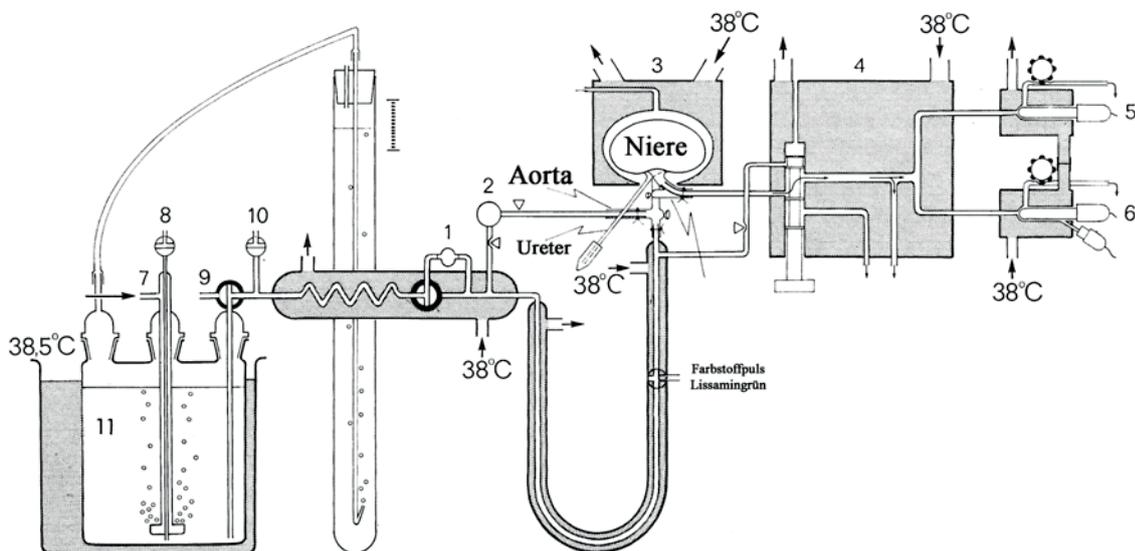


Abb. 4.1.3.: Schematischer Aufbau einer Perfusionsapparatur „single pass Modus“ (247). Schraffiert sind alle wasserbadtemperierten Teile. 1. Flussmesskopf elektromagnetisch, heutzutage auch auf Ultraschallbasis möglich (s.a. Kap. 9.2.), 2. Druckaufnehmer, 3. Nierenschale, 4. Umschaltblock, 5. O₂-Elektrode, 6. CO₂-Elektrode, 7. Gas-Einlass (angewärmt und angefeuchtet), 8. Probenentnahme, 9. Verbindung zu einer alternativen Perfusionslösung, 10. Luftfalle, 11. Vorratsbehälter, Woulffsche Flasche (Reservoir). In dieser Anordnung ist die Perfusionskanüle in die Arteria mesenterica eingebunden und die Druckmesskanüle in die distale Aorta. Die Flussrate wurde damals über einen elektromagnetischen Flussmesskopf registriert (Induktion einer Spannung durch Ionenstrom im Wechselstrom-Magnetfeld). Die Begasung wird über eine Wassersäule abgeführt und mit der Höhe der verdrängten Wassersäule der Perfusionsdruck aufgebaut.

Druckmessung: diese wurde früher mit Druckaufnehmern (Dehnungsmessstreifen) meist von Statham Instruments Inc. (damals sehr teuer, heute Gulton-Statham, Rochester, USA) durchgeführt, heute nutzen wir Einmaldruckaufnehmer, wie sie in der Intensivmedizin genutzt werden, integriert sind ein Vorverstärker und ein Auslösetaster für ein 100 Torr Kalibriersignal. Sie sind im Vergleich preisgünstig und robust und können unter Laborbedingungen über längere Zeit wiederverwendet werden.

4.2.3. Flussmessung, Roller-/Schlauchpumpe. Flusskonstante oder druckkonstante Perfusion

Mit einer Schlauchpumpe ist es möglich, in allen Varianten wie single-pass Perfusion, Rezirkulation und Rezirkulation mit Dialyse mehr Optionen zu realisieren. Die einfachste Methode, die flusskonstante Perfusion wurde genutzt, um über die Registrierung des Perfusionsdrucks den Effekt von vasoaktiven Substanzen zu untersuchen. Dabei wird auf die übrige physiologische Funktion des Organs kein Wert gelegt. Die druckkonstante Perfusion ist technisch aufwendiger, für das Organ aber angemessener. Im Idealfall wird der Perfusionsdruck unmittelbar vor der Niere gemessen entweder wie in Abb. 4.1.3 gezeigt mit Kanülierung der Art. mesenterica und Druckmessung über die distale Aorta (247) oder über die Innenkanüle einer doppelläufigen Perfusionskanüle, die in die distale Aorta bis unmittelbar vor Abgang der Nierenarterie eingebunden ist, s. Abb. 4.1.3., 4.1.4, und 4.3.7.-4.3.9. (243, 244, 247). Das Drucksignal kann entweder nur registriert werden oder es kann zusätzlich elektronisch zur druckkonstanten Steuerung der Pumpe eingesetzt werden (153, 241). Druckpulsationen der Schlauchpumpe können erwünscht sein (177) oder über einen Windkessel und/oder auch elektronisch geglättet werden (RC-Dämpfungsglieder); in älteren Publikationen findet man noch 2-Ventilpumpen wie bei Jacobj (109) oder auch bei Leon L. Miller (165), die systembedingt Druckpulse erzeugen. Ob pulsatile Perfusion von Vorteil ist oder nicht ist eine offene Diskussion.

Wenn die Pumpe ein analoges Generatorsignal der Drehzahl erzeugt (Tachogenerator), kann die Pumpenrevolution als Perfusionsrate über einen Kompensationsschreiber aufgezeichnet werden ebenso wie das Drucksignal (Zwischenverstärker). Die erste Apparatur haben wir nach der Entwicklung von Joachim Lutz in Würzburg (152a, 153) vom Apparatebau E. Jandke in Würzburg erworben und genutzt (241). Prinzipiell ist auch eine Analog-Digitalwandlung möglich und die Registrierung über einen Datensammler am PC. Wir bevorzugen eine analoge Aufzeichnung mit einem Mehrkanal-Kompensationsschreiber (Rikadenki, Tokyo, Japan; Linseis, Selb, Bayern). Voraussetzung für eine Flussregistrierung mit dem Analogsignal der Pumpe ist, dass zwischen Perfusionskanüle und Nierenarterie kein Leck besteht. Dies kann am venösen Abfluss evaluiert (ausgelitert) werden, zeigt sich aber auch dadurch, dass der kalkulierte Sauerstoffverbrauch inadäquat hoch errechnet wird. Die von uns weiterentwickelte Steuerungseinrichtung für die Rollerpumpe ist auf S69/70 abgebildet und wurde von meinem Mitarbeiter Jörg-Dieter Biela in eigener Werkstatt entwickelt. (s.a. Abb. 5.1.1.4, 5.1.1.5.). Die Abb. 4.1.4. zeigt die Modifikation der Apparatur mit Rollerpumpe und Feedbacksteuerung über das Signal des Druckaufnehmers für den druckkonstanten Betrieb. In diesem Modus ist es einfach, die Autoregulation der renalen Perfusion durch Drucksprünge von 20mmHg per Stufenschalter zu demonstrieren. Auch ein flusskonstanter Betrieb ist möglich mit analoger Registrierung von Fluss und Druck. Für die arterielle pO₂-Messung wird der Schieber im Ventilblock vorgeschoben und damit der Bypass geöffnet mit Begrenzung des Extraflusses durch eine Vorkonstriktion. Durch die Feedback-Regelung bleibt der Druck konstant und der Extrafluss wird registriert. Bei druckkonstantem Modus ist es nicht ganz trivial zu erreichen, dass es nicht zu einem Überschwingen kommt. Elektronik und Hydraulik müssen miteinander harmonisieren, insbesondere kleine Luftblasen in der harten Druckschlauchleitung zum Druckaufnehmer müssen vermieden werden und das in-line Filter muss gut entlüftet sein. Zudem kann die

Größe des Windkessels kritisch sein. Mit Ausklemmen des Windkessels kann man Pulsationen mit einer Amplitude von 20mmHg und mehr realisieren.

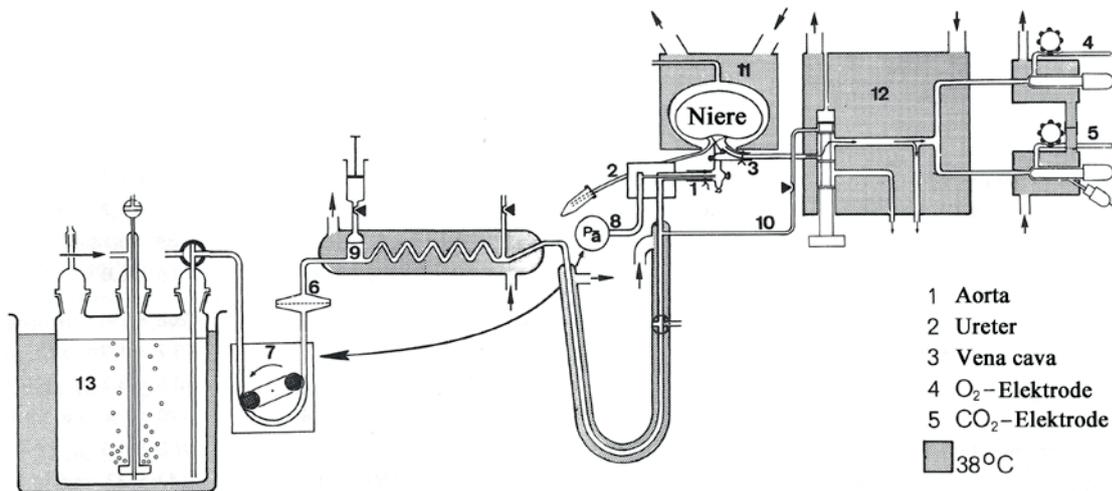


Abb. 4.1.4.: Schematischer Aufbau der Perfusionsapparatur mit Rollerpumpe. 1-5 siehe Bild. Doppelläufige Perfusionskanüle in der Aorta, Ureterkatheter, O₂ und CO₂-Elektrode. 6. inline Filter (8µm), 7. Servo-Rollerpumpe, gesteuert vom Rückkopplungs-Signal des 8. Druckaufnehmers, der mit der Innenkanüle der doppelläufigen Perfusionskanüle verbunden ist, 9. Windkessel, 10. Bypass für die arterielle Gasdruckmessung (pO₂, pCO₂), 11. Nierenschale, 12. Ventilblock und 13. Vorratsbehälter (2 oder 5 Liter). Der Fluss wurde über das Signal des Tachogenerators der Perfusionspumpe per Vorverstärker registriert und mit einem Mehrkanal-Kompensations-Schreiber kontinuierlich aufgezeichnet (Rikadenki, Tokyo, Japan; Linseis, Selb, Bayern).

4.2.4. Andere Techniken der Flussmessung

Neben dem Rotameter, das nur visuell ablesbar ist sind elektromagnetische Flussmessung und Flussmessung auf Ultraschallbasis realisierbar, Letzteres neuerdings auch bei zellfreien Medien mit der Ultraschall-Laufzeitmethode (Breitband Ultraschall (ultrasound volume flow measurements), Transonic T106 flowmeter mit kannülrierender Flußsonde SN22, Transonics, Ithaca, NY, USA). Damit kann man den Fluss auch kontinuierlich registrieren wie mit der Technik, bei der das Signal vom Tachogenerator der Perfusionspumpe abgegriffen wird. Wird dieses auch zur Regelung für eine druckkonstante Perfusion genutzt, ist ein Vorverstärker notwendig.

4.3. Temperierung

4.3.1. Lufttemperiertes Kabinett mit hochschiebbarer Tür

Bei der Leberperfusion (Ratte) hat sich bei überwiegend biochemischen und pharmakologischen Fragestellungen diese Form der Temperierung weitgehend durchgesetzt (165, 221).

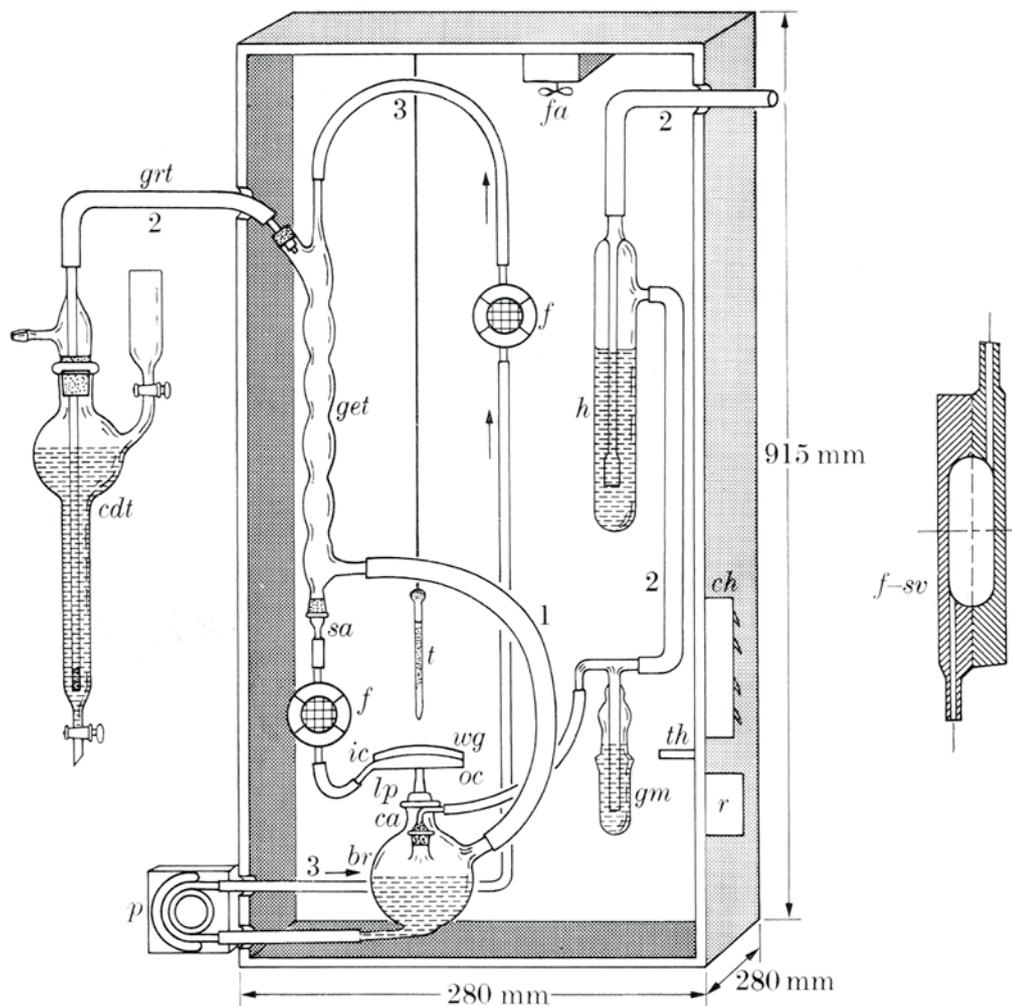
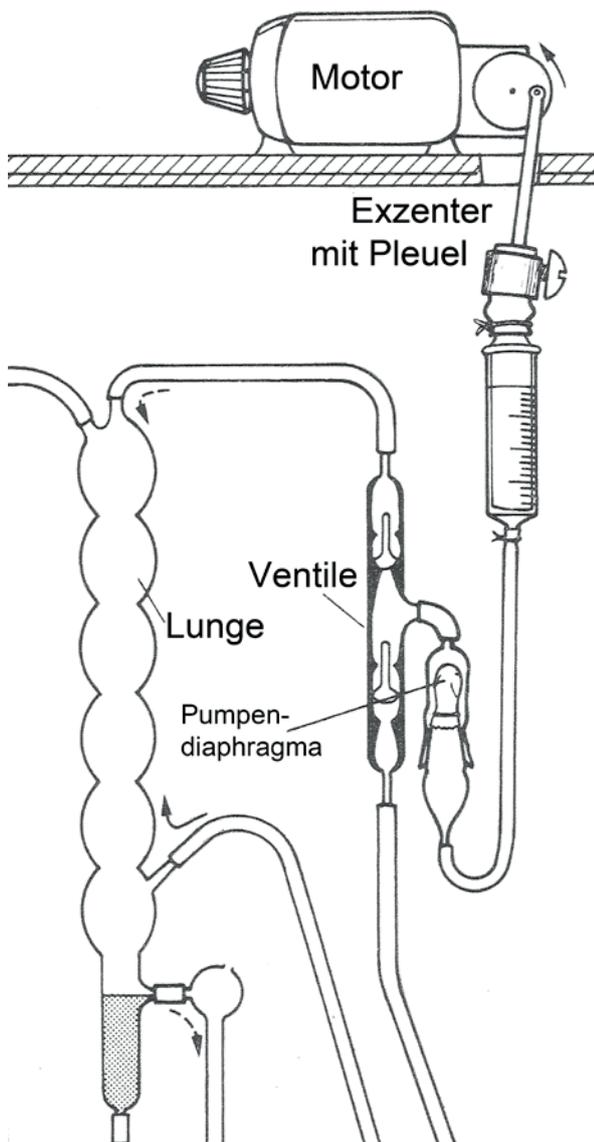


Abb. 4.1.5.: Perfusionsapparatur von Metalloglass Inc. adaptiert nach Miller für die Rattenleber (165). Innerhalb des Kabinetts ist ein Ventilator (fa) installiert, die Temperatur wird durch einen Thermostaten (th) geregelt über elektrische Heizspiralen (ch) in den Gehäusewänden. Ein wichtiges Detail sind 2 eingebaute Filter im Kreislauf (Detailbild in Seitenansicht rechts (f-sv)). Die Filtermembran war weiße Seide mit 100-150 Maschen/Inch (2,54cm). Die übrige Beschriftung bedeutet: 1. Überlauf mit Gaszufuhr zum Glasoxygenator (get), 2. Gaszufuhr mit Fritte zur Anfeuchtung (h), Gasdruckmessung (gm), 3. Perfusatzulauf von der Pumpe (p) durch das Filter (f) zum Oxygenator (get). Das Organ liegt auf einem Uhrglas (wg), zu- und abführende Kanülen (ic, oc), das abfließende Gas kann durch eine CO₂-Falle (cdt, Kalilauge) geführt werden. Im Original war die Rollerpumpe durch eine Zwei-Ventilpumpe ersetzt, die durch rhythmische Volumenverschiebung durch einen durch Motor betriebenen Exzenter aktiviert wurde (s.a. Detailbild unten).

Da die Rattenleber in der Regel nur über die vena portae perfundiert wird, genügt der niedrige hydrostatische Druck. Das von Miller konzipierte System für die Rattenleberperfusion und die Erstpublikation über die Plasmaeiweiß-Produktion war methodisch ein Schrittmacher (165), das an die Nierenperfusion angepasste System der Oxforder Arbeitsgruppe um Brian D. Ross mit dem Hochbau zur Aufnahme des Glasoxygenators (s. Abb. 4.1.2.) war auch für Stoffwechselstudien genutzt worden (176). Die verwendete Glaskanüle ist im Detail abgebildet s. unten Abb. 4.3.5. und 4.3.6., die dazugehörige Apparatur ist schematisch dargestellt ohne Kabinett, Abb. 4.1.6. Ein Ventilator mit durch Thermostat geregelter Heizung ist eingebaut. Nachteil des mit einer Frontscheibe verschließbaren Kabinetts ist es, dass zu jeder Intervention die Tür geöffnet werden muss. Ein Beispiel ist eine Abb. aus der Arbeit von Miller (165). Die Abb. wurde aber als Modifikation von Metalloglass übernommen wegen der besseren Bildqualität im Vergleich zur historischen Originalpublikation, in dieser war an Stelle der Rollerpumpe eine sogenannte Bluemle Pumpe (2 Ventile, dazwischen eine komprimierbare Kammer) eingesetzt, eine Verfahren, das Jacoby im Jahre 1890 bereits beschrieben hatte (109).



Detailbild zur Abb. 4.1.5: In der Originalarbeit von Miller eingesetzte Zwei-Ventil-Pumpe mit Exzenter Scheibe, Pleuel und angepasster Spritze zur Volumenverschiebung, die über ein Diaphragma mit der Ventilkammer verbunden war. Im Original wird Blut über ein Filter aus dem Reservoir angesaugt, später wurde das Filter sicher aus der Position vor der Pumpe in die Position nach der Pumpe gebracht.

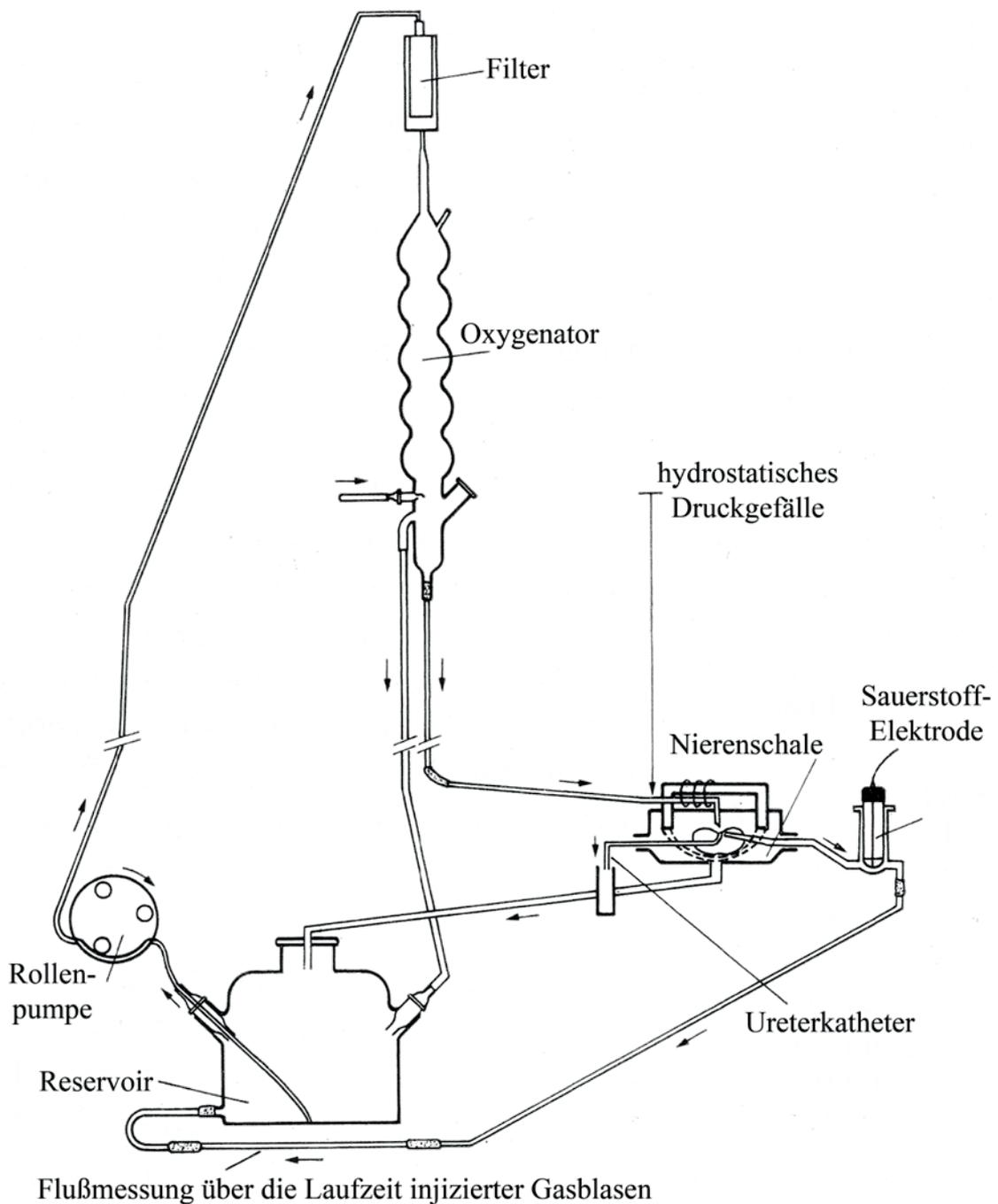


Abb. 4.1.6.: Schematischer Aufbau der Perfusionsapparatur der Arbeitsgruppe in Oxford, modifiziert. Die Niere war an der Glaskanüle (Abb. 4.3.5.) aufgehängt. Die venöse Flussmessung erfolgte über die Laufzeit einer injizierten Gasblase in einem horizontal liegenden, kalibrierten Glasrohr. Der venöse Abfluss ist via Sauerstoffelektrode zur Flussmessung geführt. Zur besseren Oxygenierung des Perfusats war die Pumprate im Oxygenatorkreislauf wesentlich höher als im Organkreislauf. Modifiziert nach Brian D. Ross (213), copyright permission vom Autor.

4.3.2. Wasserbadtemperierung

Bei der Nierenperfusion hat sich für uns diese Form der Temperierung bewährt, da für physiologische Experimente wie Clearanceuntersuchungen und Mikropunktion ein offener Zugang zum Organ essentiell ist. Dies gilt für alle 4 Modalitäten von der single pass bis zur Rezirkulationstechnik. Bei der single-pass Perfusion setzen wir das Vorratsgefäß für das Perfusat in eine Wanne mit Einhängethermostat, der das Bad durch eine Pumpe umwälzt; ein Aliquot des Umlaufvolumens kann auch zur Vortemperierung des Äquilibriumsgases genutzt werden. Kleinere Umlaufthermostate bedienen die übrige zum Nierenpräparat führende Strecke. Hier sind die Leitungsrohre- bzw. Schläuche zur Niere gemeint sowie bei Rezirkulations-Systemen der ummantelte Oxygenator und/oder das Reservoir, das wasserbadummantelt ist. Das Organ selbst wird von uns schon in situ in eine Nierenschale positioniert die aus Edelstahl besteht (früher Kupfer vernickelt) und über einen Wasserbadanschluss temperiert wird. (s. Kapitel 5, Abb.: 5.1.2.0, 5.1.2.1.). Für uns hat sich folgende Praxis bewährt: die Wasserumlaufthermostate sind mit Polypropylen-Kupplungen aus der Drucklufttechnik angeschlossen (Colder Products Company, St.Paul, MN. USA, Niederlassung EU: Grossostheim, BRD; Carl Nolte Technik, Greven, BRD). Diese gibt es ohne und mit Rückschlagventil, das sich beim Zusammenstecken jeweils beidseits öffnet. Über ein Gegenstück lassen sich die Schläuche auch gut spülen und jeweils demontieren. Desinfizierende Badzusätze sind zu empfehlen.

4.4. Begasung

4.4.1. Glasfrittenbegasung

Die Begasung der Perfusionslösung über eine gesinterte Glasfritte ist die einfachste Methode beim single pass Modus. Um Verdunstungsverluste zu vermeiden sollte das Gas vorbefeuchtet sein. Wir führen das trockene Gasgemisch über ein Luftfilter (0,2µm, Midisart 2000, Sartorius Stedim, Göttingen) in eine geschlossene, temperierte Wasserflasche mit Glasfritte, das angefeuchtete Gas wird dann noch einmal über eine temperierte Glasschlange leicht nachgetrocknet, damit kein Kondenswasser in das Perfusat (bzw. Dialysat) übertritt. Aus dem Perfusatbehälter strömt das Gas entweder offen heraus (wenn eine Perfusionspumpe genutzt wird) oder es wird über eine Wassersäule zum Aufbau des Perfusionsdrucks abgeführt (Perfusion mit Gasdruck ohne Pumpe, s. Abb. 4.1.3) oder diese Technik wird genutzt um höhere Gasdrucke im Perfusat zu erzeugen (betrifft v.a. pO_2). Wir nutzen eine Gasmischpumpe, initial 100% O_2 zum Senken des pCO_2 , dann 95% O_2 und 5% CO_2 – gegebenenfalls auch 94/6%. Direkt hinter der Gasmischpumpe wird in einem „Transfusionsfilter“ abgefangen, was an kleinen Mineralölpartikeln über die Mischpumpe abgegeben werden könnte, damit dies nicht ins Dialysat bzw. Perfusat eingetragen wird. Perfusat mit Albumin als Kolloid kann wegen der Schaumbildung nur indirekt begast werden über einen Oxygenator oder Dialysator. Schaum kann zur Denaturierung des Albumins führen. Bis ca. 1990 haben wir in Hannover den Füllstand des venösen Effluats kapazitiv abgetastet und über ein Schlauchventil nahezu schaumfrei ins tiefer positionierte Reservoir zurückgeführt. Zur Vereinfachung wurde es zuletzt über einen weitlumigen Silikonschlauch zurückgeführt, was möglicherweise einen Rückschritt darstellt. Eine Analyse dieses Problems ist geplant.

4.4.2. Glasoxygenatoren in der Rezirkulationstechnik

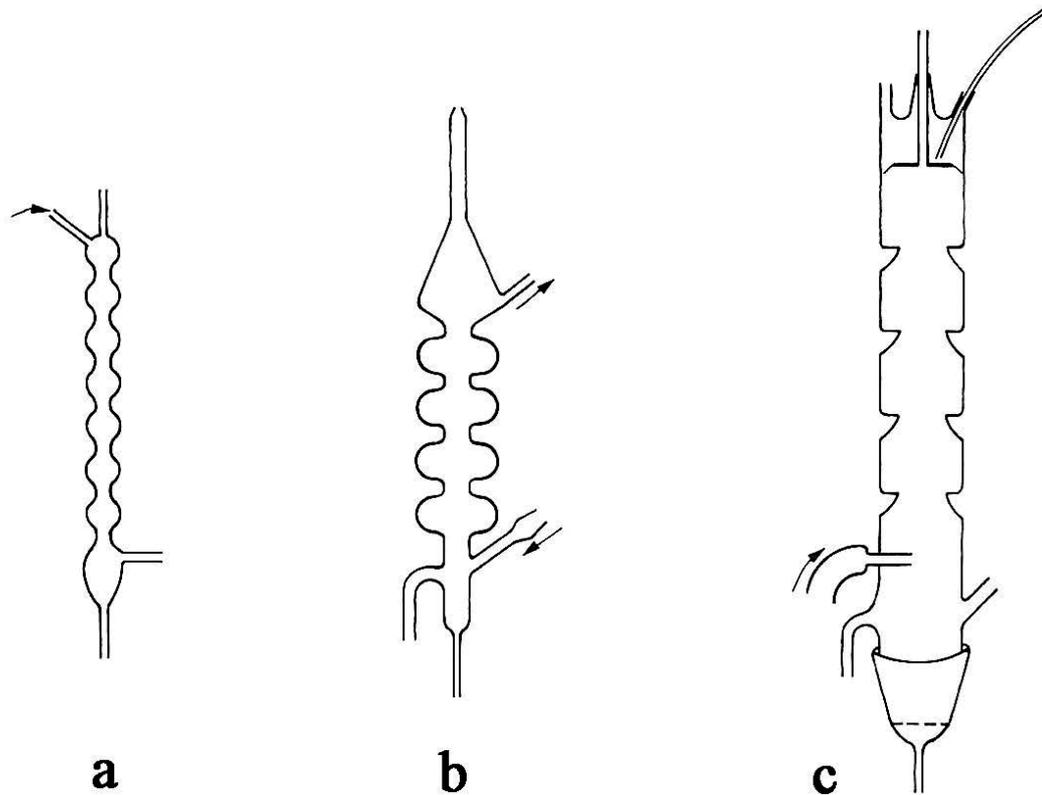


Abb. 4.2.1.: Typen von Glasoxygenatoren nach Ross (213). Typ a ist der von L.L. Miller (165) eingesetzte Oxygenator, s.a. Abb. 4.1.5. Der Typ b von Hems ist mit genauer Be-
 maßung in Abb. 4.2.2. wiedergegeben. Typ c ist mit einer rotierenden Schleuderscheibe versehen (72), wie es auch Nizet in modifizierter Form bei der Perfusion der Hundeni-
 erie verwendet hat (177). Mit etwas mehr Aufwand kann der Glasoxygenator auch ummantelt und mit Wasserbad temperiert werden (s. Abb. 4.2.3.), wie es v.a. die Arbeitsgruppen um
 Bowman und Maack verwendet haben. Bei Rezirkulationssystemen mit kleinem Volumen enthält der Oxygenator selbst das Reservoir für das Perfusat (s.a. Abb.: 5.2.1.). Copyright
 permission vom Autor.

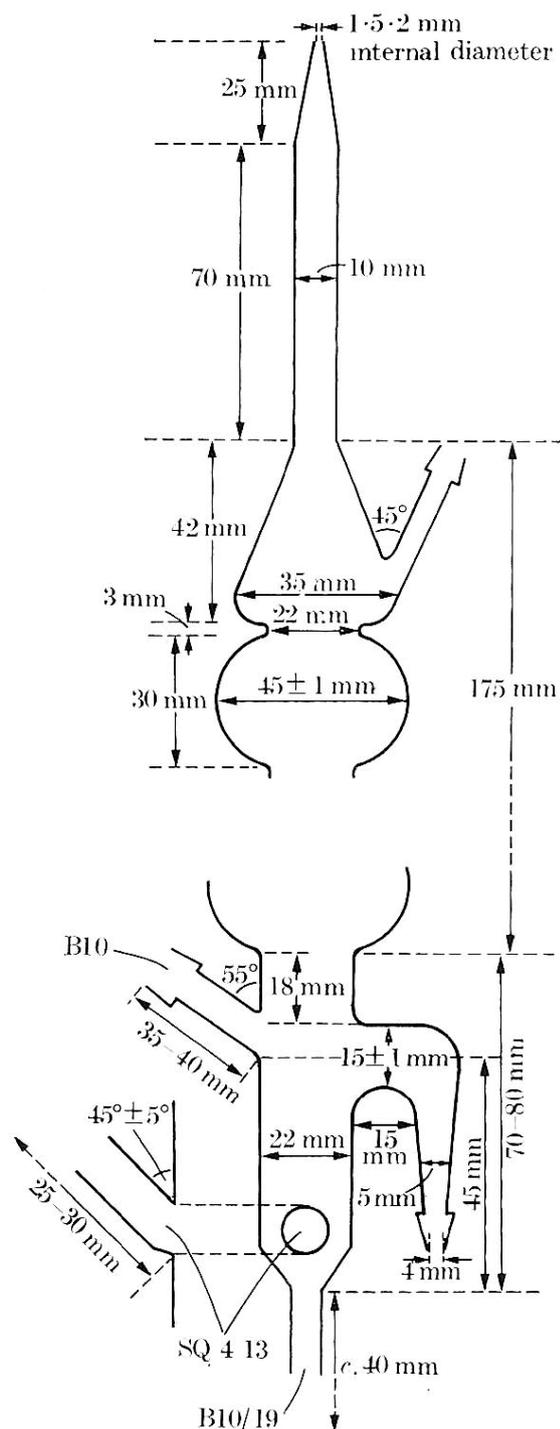


Abb. 4.2.2.: Konstruktive Details des „Hems“ Oxygenators.

Eine Besonderheit ist der obere Einflussbereich für das Perfusat, der so gestaltet ist, dass die flüssige Filmschichtdicke in zwei Schritten ausgedünnt wird und dadurch die ganze Zirkumferenz benetzt. Der Oxygenator hat 4-5 Birnen (99, 213). Die angegebenen Maße sind Außenmaße, Wandstärke 2mm. Das Ausgangsglasrohr ist aus schwerem Borosilikatglas mit 22mm Außen- und 18mm Innendurchmesser. Der untere Teil ist speziell in der Weise ausgestaltet, dass Schaumbildung vermieden wird. Die Abb. ist dem Buch von BD Ross (213) entnommen. Copyright permission vom Autor.

Die folgenden Abb zeigen einen von uns konzipierten und genutzten Glasoxygenator mit Ummantelung zur Wasserbad-Temperierung. Dieser Typ würde von der von Hems angegebenen Einströmtechnik profitieren, die er aber nicht hat. Andererseits sind die Anschlüsse für die Begasung Zu- und Ablauf innerhalb der Birnen nach unten gerichtet um Schaumbildung zu vermeiden. Die Ummantelung für eine Wasserbadtemperierung wurde nach Angaben von B.D. Ross zuerst von Staib beschrieben (213, 276).



Abb. 4.2.3.: Ummantelter Glasoxygenator. Die beiden Anschlüsse links unten sind Zu- und Ablauf für temperiertes Wasser. Vorn die beiden Gasanschlüsse, links Zu- und rechts Abstrom. Oben links ist der Perfusatzufluß, der Anschluss rechts oben dient der Entlüftung und der Nachhilfe zur Benetzung. Das Detailbild links zeigt das zuführende Glasrohr und den oberen Anschluss mit Kappe.

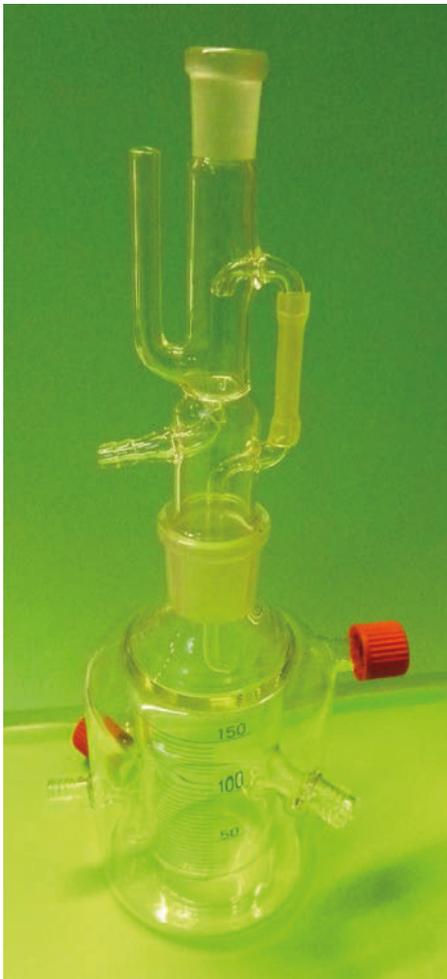


Abb. 4.2.4.: Glasoxygenator mit zugehörigem Reservoir, beide ummantelt für Wasserbad-Temperierung durch Umlaufthermostat, links unterbrochener Überlauf zum Ventileinbau für Überdruckeinspeisung. Rechts alternativer Übergang ohne Unterbrechung vom Oxygenator zum Reservoir (Design nach Schurek, unveröffentlicht).



Abb. 4.2.5.: Reservoir mit Übergangsteil zum Glasoxygenator. Das Reservoir hat zwei mit Schraubkappen verschlossene Wasserbadanschlüsse. Links seitlich ohne Kappe der Anschluss zum Boden des Innengefäßes, rechts ohne Kappe der Anschluss für das Effluat vom Organ, sollte besser höher angesetzt sein, wie in Abb. 5.3.2.

4.4.3. Membranoxygenator in der Rezirkulationstechnik

Aus der Literatur sind verschiedene Typen von Membranoxygenatoren bekannt. Als die Industrie noch keine Membranoxygenatoren angeboten hatte, wurden verschiedene im Labor entwickelte einfache Prototypen als Schlauchoxygenator, Flachmembranoxygenator oder als Kapillaroxygenator beschrieben. Hier sind nur 4 Varianten gezeigt, die beiden letzteren 4.2.7 und 4.2.8 kennen wir aus eigener Erfahrung.

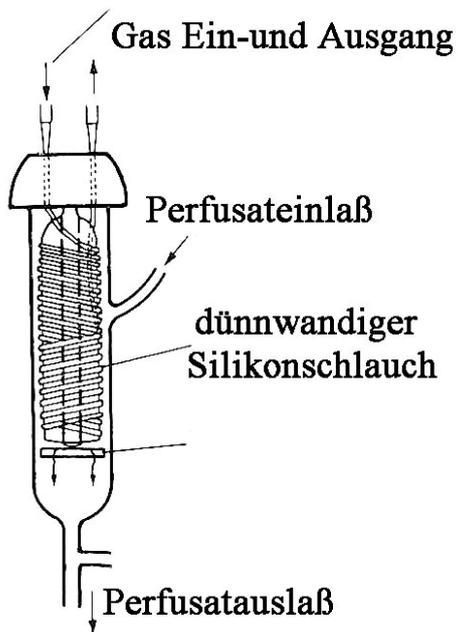
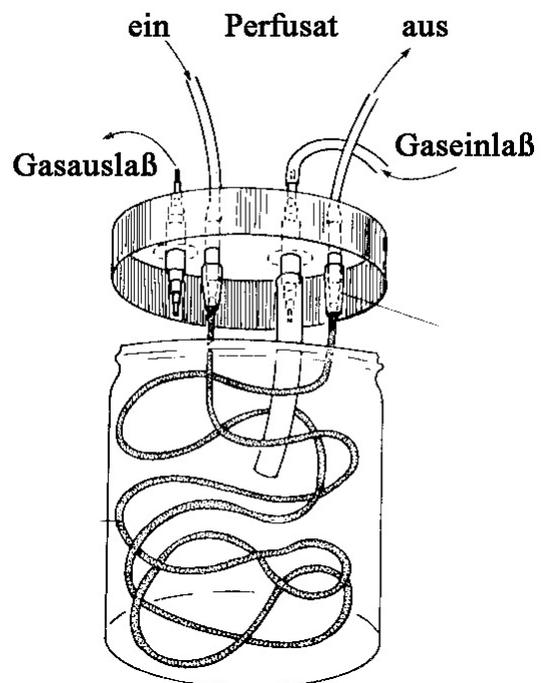


Abb. 4.2.6.: Der Silikonschlauch-Oxygenator nach Folkman (75) führt das Gas im Schlauch (der um einen Glaszylinder gewickelt ist) und das Medium wird außen entlang geführt. Unten eingebaut ist eine Glasfritte als Filter. Der dünnwandige Silikonschlauch ist nicht sehr reißfest und hat eine druckinduzierte Volumenveränderung. Die Diffusionskapazität ist limitiert auf kleine Flussraten. Modifiziert nach Folkman.

Abb. 4.2.7.: Der Silikoschlauch-Oxygenator nach Hamilton (91).

Das Perfusat wird über einem 5m langen Silikonschlauch durchgeleitet der einen Innendurchmesser von 1,47mm hat bei 0,25mm Wandstärke. Der Schlauch wird als Einmalmaterial in ein Probengefäß mit ca. 500ml Volumen als Schlange locker eingelegt und im Durchführungsdeckel an passende Anschlüsse montiert. Gaseinlaß und Auslaß sind wie in der Abbildung zu sehen weit auseinander gelegt. Die verwendete Wandstärke des Schlauches ist ein Kompromiss, weniger Wandstärke wäre ein zu hohes Knickrisiko. In Effektivitätstests wurde eine 12g schwere Rattenleber mit gewaschenen Ratten-Erythrozyten und Flussraten von 10ml/min perfundiert. Bei einem Hämatokrit von 22% war eine ausreichende Oxygenierung zu erreichen bei 1,5L Gasfluss/min. Optimal ist das kleine Füllvolumen des Silikoschlauches von 8-10ml. Der Oxygenator wurde mit nur einem Durchgang direkt zur Leber genutzt, was bei dem niedrigen Perfusionsdruck für die Pfortader kein Problem ist.



Für die Perfusion einer Mausniere wäre das Hamilton-System ausreichend, es müsste lediglich ein separater Oxygenatorkreislauf etabliert werden (wegen des höheren Perfusionsdrucks). Für die Perfusion einer Rattennierye sind höhere Flussraten notwendig (15-45ml/min) und ein höherer Umlauf im Oxygenatorkreislauf als die Niere Medium entnimmt. Zudem müssten u.U. andere Schlauchdimensionen eingesetzt werden. Vorteil des Systems ist sein unkomplizierter Aufbau, das Konzept als Einmalsystem, das Reinigungsprozeduren erspart und der Preis im Vergleich zu überdimensionierten Preisen käuflicher Systeme. Felts und

Whayne haben ein Jahr zuvor einen Schlauchoxygenator beschrieben (70), der mit 3 parallelen und wandstärkeren Schläuchen bestückt wurde (1,65 mm außen und 0,76 mm Innendurchmesser) und damit auch für arterielle Drücke geeignet ist, wie es im Perfusions-system von Mayes und Felts notwendig ist mit Anschluss von Leberarterie und Pfortader getrennt (161), s.a. (1, 2).

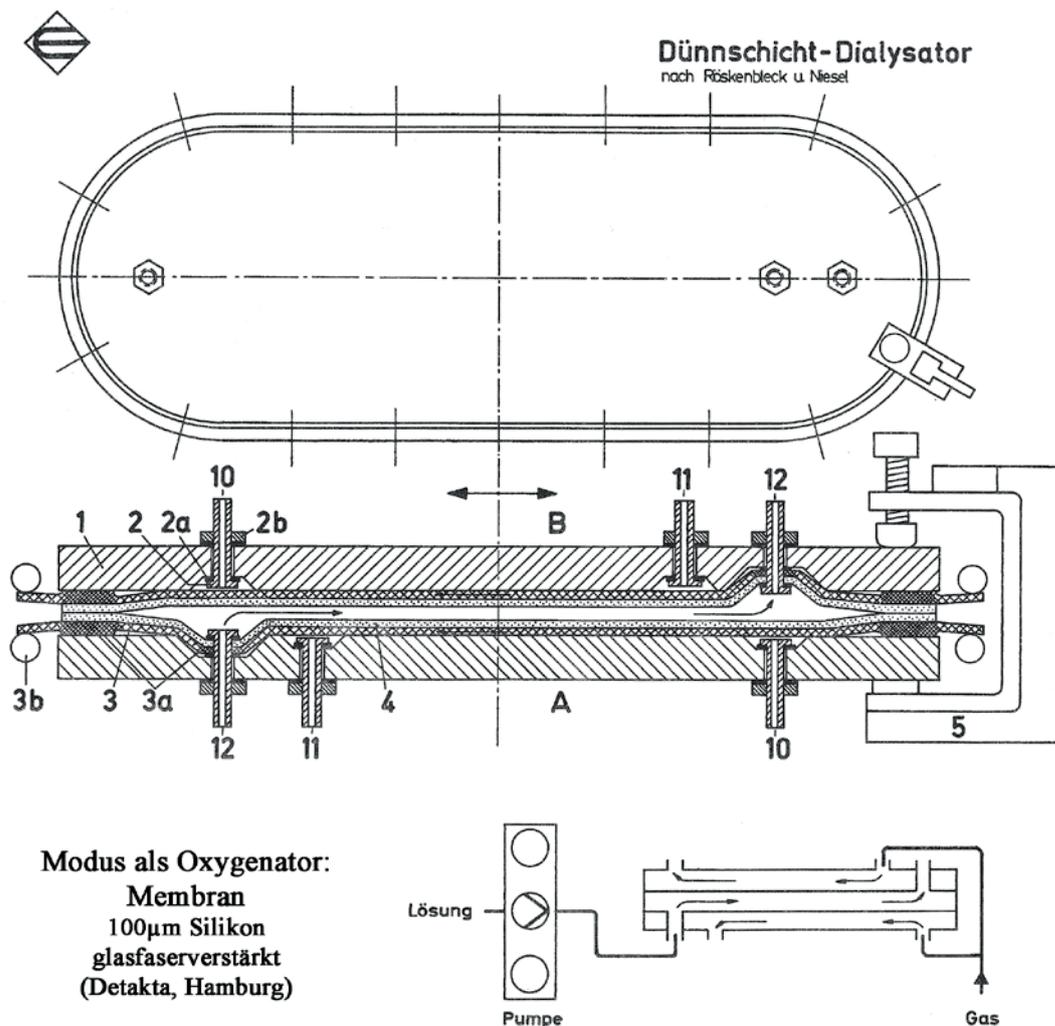


Abb. 4.2.8.: Der Membran-Oxygenator nach Röskenbleck & Niesel (210) ist an Stelle des Cuprophans (ursprünglich als Dialysator genutzt) mit einer durch Glasfasern verstärkten 100µm Silikonmembran bestückt. Die Membran wurde von der Fa. Detakta, Hamburg, bezogen, sie wird sonst als elektrische Isolation genutzt. Die Glasplatten wurden von 18 Schraubzwingen dicht aneinander gepresst. Schwierigkeiten an den Ein- und Auslasstutzen (Ausflussblock) haben zu einer alternativen Lösung geführt, s. Abb. 4.2.9. Die Variante Dünnschichtdialysator wurde einst von Eschweiler (Kiel) angeboten.

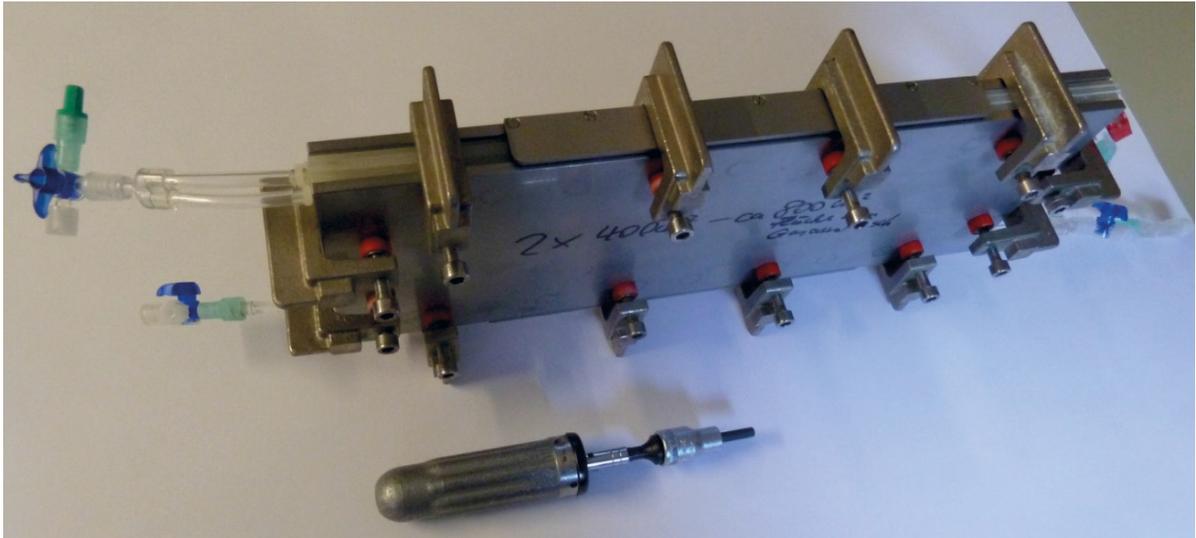


Abb. 4.2.9.: Membranoxygenator nach Röskenbleck, modifiziert nach Schurek (unveröffentlicht). Die gerillten Innenplatten stammen von einem RP6 Dialysator (historisch) der ehemaligen Fa. Rhone-Poulenc (Hospal), der Innenrahmen ist mit zwei Lagen einer mit Glasfasern verstärkten Silikonmembran (Detakta, Hamburg) bezogen, die den Perfusatinnenraum bilden. Von außen liegen die zur Mitte gerillten Endplatten auf und werden außen von Edelstahlplatten gehalten. Diese werden von Schraubzwingen zusammengepresst (Drehmomentschlüssel). Das Gas strömt zwischen Silikonmembran und gerillter Platte beidseits im Gegenstrom zum Perfusat. Die zum Gasaustausch wirksame Membranoberfläche liegt bei $2 \times 400 \text{ cm}^2$, das Füllvolumen mit Schlauchanschlüssen bei 10-20ml, dies kann bei dünnerem Dichtungsmaterial und Gegendruck noch verkleinert werden.

4.4.4. Kapillaroxygenator

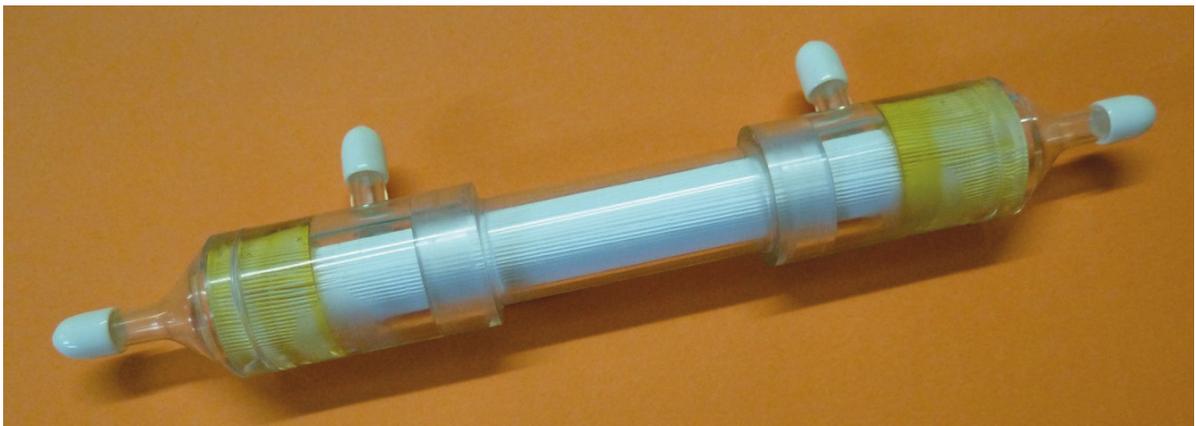


Abb. 4.3.0.: Kapillaroxygenator. Als Alternative zu dem relativ großen Plattendialysator hat uns länger zurückliegend die Fa. Enka in Wuppertal einen Oxygenator aus Testmodulen hergestellt, bestehend aus einem Bündel von Polypropylen-Kapillaren, die am Ende in Polyurethan eingebettet sind mit Anschlusskappen für das Perfusat und seitlichen Gaseinstrom- und Ausstromstutzen.

Nach dem ersten Einsatz hat der Versuch der Konservierung mit Formalin (für die Wiederverwendung) zur Zerstörung der Kapillaren geführt: es kam zu blasenartigen Ausstülpungen. Danach wurde nur mit 0,9% NaCl und Aqua dest. gespült, durchgeblasen und getrocknet. Eine Besonderheit ist die Durchlässigkeit auch für Wasserdampf, sodass nicht mit trockenen Gasen äquilibriert werden sollte. Das Modul hatte 570 Polypropylen-Hohlfasern, 280 μ m Lumen, 50 μ m Wandstärke, 10cm effektive Länge und 500cm² Oberfläche, Füllvolumen optimal mit 6,2ml mit Anschlusskappen. Die Leistung lag vergleichbar zum Membranoxygenator (Abb. 4.2.9).

4.4.5. Dialysator als „kidney lung“

Der zuerst von uns als kombiniert Oxygenator/Dialysator verwendete Dialysator war der von Josef Hoeltzenbein in Münster entwickelte Kapillarplattendialysator, der von Travenol produziert und vertrieben wurde (241). Dieser Dialysatortyp war ideal wegen des kleinen Füllvolumens (ca. 65ml), der nicht sehr hohen Ultrafiltration und einer Oberfläche von 0,92m² (Typ M1000). Die Laufstrecke für das Perfusat an der kapillaren Austauschfläche war nur 6 cm lang. Das reichte aus wegen der besseren Blutfilmgeometrie, s. Abb. 4.3.1. mit dem Vergleich Hohlfaser zu Kapillarfilm. Das Dialysat wurde im diagonalen Gegenstrom dazu verteilt. Heute nutzen wir den Polysulfon Lowflux Kapillardialysator F4HPS von FMC (Fresenius Medical Care, Bad Homburg) da kein Plattendialysator vergleichbarer Größe mehr marktgängig ist (51ml Füllvolumen, 0,8m² Oberfläche). Da auch dieser Typ nur noch begrenzt verfügbar war, haben wir zuletzt den FX5 eingesetzt (54ml Füllvolumen bei 1m² Oberfläche). Sogenannte highflux Dialysatoren sind wegen der größeren Permeabilität nicht geeignet, weil sie zum einen eine zu hohe Ultrafiltration aufweisen und zum anderen eine zu hohe Permeabilität für Albumin haben. Letzteres verschwindet unter Laborbedingungen, wenn mit Vollblut gearbeitet wird. D.h., dass der Dialysator erst mit dem Vollblutkontakt seine definitive Permeabilität etabliert (208), wohl indem größere Poren aus Material des Vollblutes abgedichtet werden, ein Phänomen, das mir auch vom glomerulären Filter der Niere bekannt ist (234, 235, 238-240, 256). Das bedeutet auch, dass nicht jeder Dialysatortyp geeignet ist und die Permeabilität für Albumin niedrig sein sollte. Den Polysulfondialysator F4HPS haben wir mehrfach verwendet, nach Perfusion intensiv gespült und mit

3% Formalinlösung konserviert, vor Wiederverwendung erneut intensiv gespült und ausgeblasen. Auch der FX5 lässt praktisch kein Albumin passieren. Er hat eine modifizierte Polysulfonmembran (Helixone®).

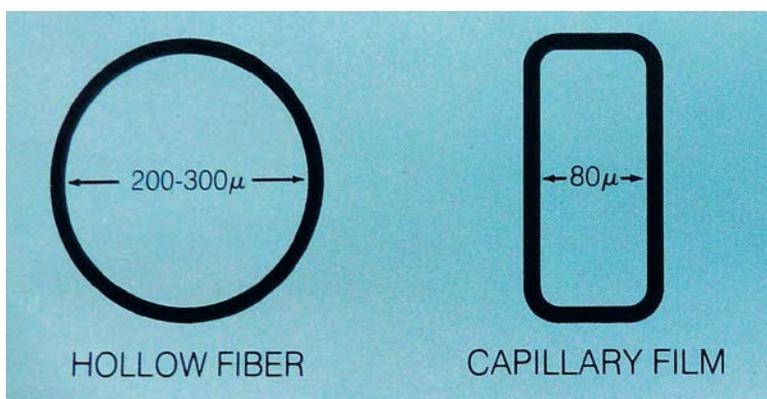


Abb.: 4.3.1.: Vergleich der Geometrie einer Hohlfaser gegenüber einem Kapillarfilm beim Höltzenbein-Dialysator.



Abb. 4.3.2.: Hoeltzenbein-Dialysator (HD™ Capillary Film Dialyzer).

Historisches Modell Typ 1000 in der von Travenol in Belgien produzierten und vertriebenen Version. Vorn seitlich die Blut- bzw. Perfusatzufuhr, auf der Rückseite seitlich oben der Blut- bzw. Perfusataustritt. Dialysatzufuhr und Dialysataustritt oben und unten über Hansen-Kupplungen. Der Dialysator hatte 0,92m² Oberfläche, 65ml Füllvolumen und einen relativ niedrigen Ultrafiltrationskoeffizienten. Den Dialysatfluss haben wir mit einer Zentrifugalpumpe (Kreiselpumpe Typ 1022 Eheim GmbH, Delzisau) in Gang gehalten mit relativ niedrigem Druck, s.a. Kapitel 5.3.

4.5. Filter

4.5.1. Filtration des Perfusionsmediums

Anzustreben ist eine Sterilfiltration der fertigen Perfusionslösung unmittelbar vor dem Einfüllen in die Perfusionsapparatur. Abb. 4.3.1. zeigt die von uns genutzte Anordnung.

Abb. 4.3.1.: Filtrations-Ensemble 1. Rechts der 10 Liter Edelstahl-Behälter, der mit filtrierter Druckluft beaufschlagt wird (2 Bar), Überleitung zum Filter, das über einen Silikon-Schlauch direkt zum Glas-(Perfusat)-Dialysat-behälter führt. Rechts davor der 2 Liter Filtrataufsatz (Füllöffnung oben), der alternativ eingesetzt wird, wenn auch Albuminlösung im 2. Schritt filtriert werden soll, dann mit Wechsel zum direkten Druckluftanschluß. Der große 10 Liter Behälter kann in dieser Anordnung im ersten Anlauf nicht restlos entleert werden, (Restmenge 200ml), während bei Filtration mit Filtrataufsatz nur minimale Reste im Filter zurückbleiben (Fa. Sartorius, Göttingen).



Abb. 4.3.2.: Filtrations-Ensemble 2.

Filtrataufsatz montiert für den ersten Schritt der Filtration von 5 oder 10 Liter Dialysat. Im zweiten Schritt kann das im 10 Liter Behälter zurückgebliebene Restvolumen per Trichter in den Filtrataufsatz gefüllt werden, damit kann auch dieses Restvolumen genutzt werden. Im dritten Schritt wird der Pressluftanschluss direkt an den Filtrataufsatz seitlich angeschlossen, die Perfusionslösung mit Albumin oder anderen Kolloiden eingefüllt und in ein steriles Glasgefäß filtriert.

Nach Albuminfiltration muss der Auslaßbereich mit Hahn besonders gründlich gereinigt werden: Belagrückstände von getrocknetem Albumin können Probleme machen (Position hinter dem Filter!).

4.5.2. In-line Filtration

Während der Nierenperfusion hat sich die in-line Filtration speziell beim Rezirkulationsmodus bewährt (165, 216). Präparativ kann es bei der Isolierung der Niere zur Ablösung kleiner Partikel kommen, die dann über die Rückführung des Effluats in das arterielle Gefäßbett der Niere geraten und dann Kapillaren blockieren. Erfahrungsgemäß ist die GFR bei dem Einsatz von in-line Filtern stabiler als ohne Filter im Rezirkulationsmodus. Dabei wird bei zellfreiem Perfusat eine Porengröße zwischen 8 und 14 μm gewählt. Konkret verwenden wir ein Filter mit einem Durchmesser von 42mm, das Filtergehäuse ist von Sartorius AG Göttingen. Beim Einsatz von gewaschenen Erythrozyten wird das Filter herausgenommen, in einen Bypass gelegt oder nur mit einem Polyestergeritter belegt (Leon L. Miller hatte weiße Seide mit einer Maschendichte von 100-150/2,54cm (1 Zoll) eingesetzt (165) bei Blut als Perfusat). Bei der Sterilisation der Filter gibt es Beschränkungen v.a. bei Cellulose Nitrat. Celluloseacetatfilter können auch bei 132°C mit trockener Hitze sterilisiert werden (Trockenschrank), nicht dagegen das Cellulosenitrat*, auch nicht das Polyestergeritter. Zoltan Endre hat in Oxford zwei verschiedene Filter bei Erythrozytenzusatz benutzt von Pall und einen Transfusionsfilter von Fenwall (20-40 μm) (66). Wenn bei reiner Rezirkulation und zellfreiem Perfusat Urin ins Perfusat zurückgegeben wird, was sich bei kleinen Perfusionsvolumina anbietet, läuft man Gefahr Zelldebrie ins Perfusat zu verschleppen. Nach ca. 30 min tauchen die ersten Zelltrümmer im Urinsediment auf (das sind Folgen des relativen Sauerstoffmangels, s.a. erste Abb. 2.1.) die in der Lage sind, Kapillaren zu verschließen und zu einem Flussabfall und einer Reduktion der glomerulären Filtrationsrate (GFR) zu führen.

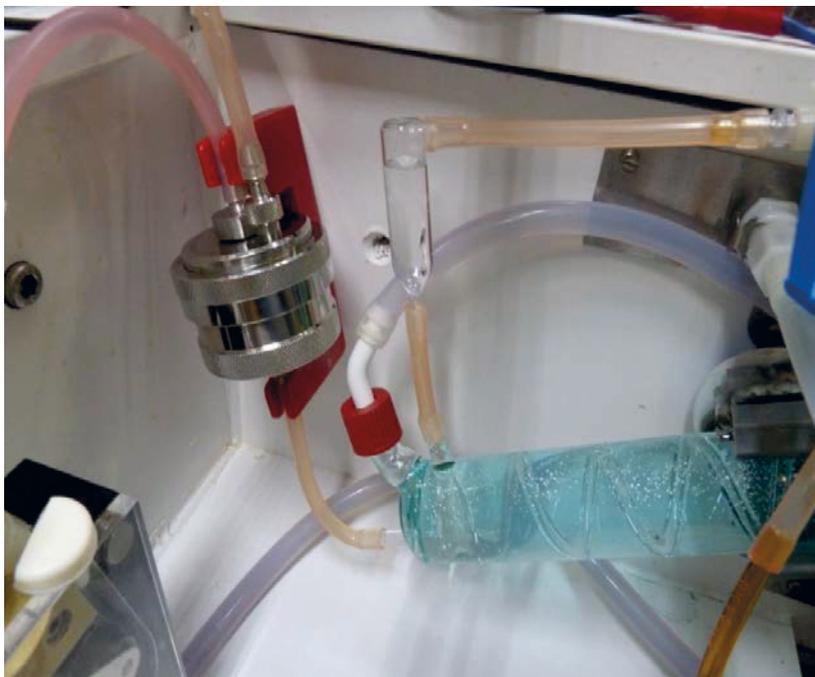


Abb. 4.3.3.: In-line Filter (42mm Durchmesser, Porengröße 8 μm , Zellulosenitrat, Sartorius AG, Göttingen), zwischen Perfusionspumpe und Temperierschlange mit Windkessel und Luftblasenfänger. Vorn am Filter ist ein zuschraubbarer Entlüftungsanschluß zu sehen. Zum Entlüften der unteren Kammer wird das Filter in der Vorbereitung gedreht.

*Vorsicht bei der Sterilisation von Cellulose Nitrat: setzt man sich über die Herstellervorgaben hinweg und verwendet z.B. 132°C trockene Hitze, verändert sich die Porengröße und das Filter ist nach kurzer Zeit dicht.

Pegg hat darauf hingewiesen, dass erst mit dem Einsatz von „0,2µm Filtern“ eine ausreichende Stabilität des Perfusionsflusses bei isolierten Kaninchennieren zu erreichen war! (Sterilitätsproblem?). Zudem ist eine Rückinfusion von Urin mit dem Risiko behaftet, weil im Urin enthaltene Partikel wie tubuläre Zellaggregate etc. ins renale Kapillarnetz eingeschleppt werden und zur Widerstandserhöhung beitragen (187-191). Eigene Beobachtungen zeigen (207), dass bei zellfreier Perfusion ca. 30min nach Perfusionsbeginn Zelldetritus im Urinsediment erscheint, was bei Erythrozytenzusatz ausbleibt s.a.: (253), dort sind die morphologischen Schäden bei zellfreier Perfusion an S₃ (P₃) proximalen Tubulussegmenten und TAL-Segmenten beschrieben. Eine zusätzliche Methode, um bei reiner Rezirkulation und druckkonstanter Perfusion die Flussrate stabil zu halten ist die Zugabe von Verapamil, einem Kalzium-Kanal-Blocker (94). Damit nimmt man in Kauf, dass die Autoregulation der Perfusionsrate komplett aufgehoben wird (s. Abb. 10.2.1.).

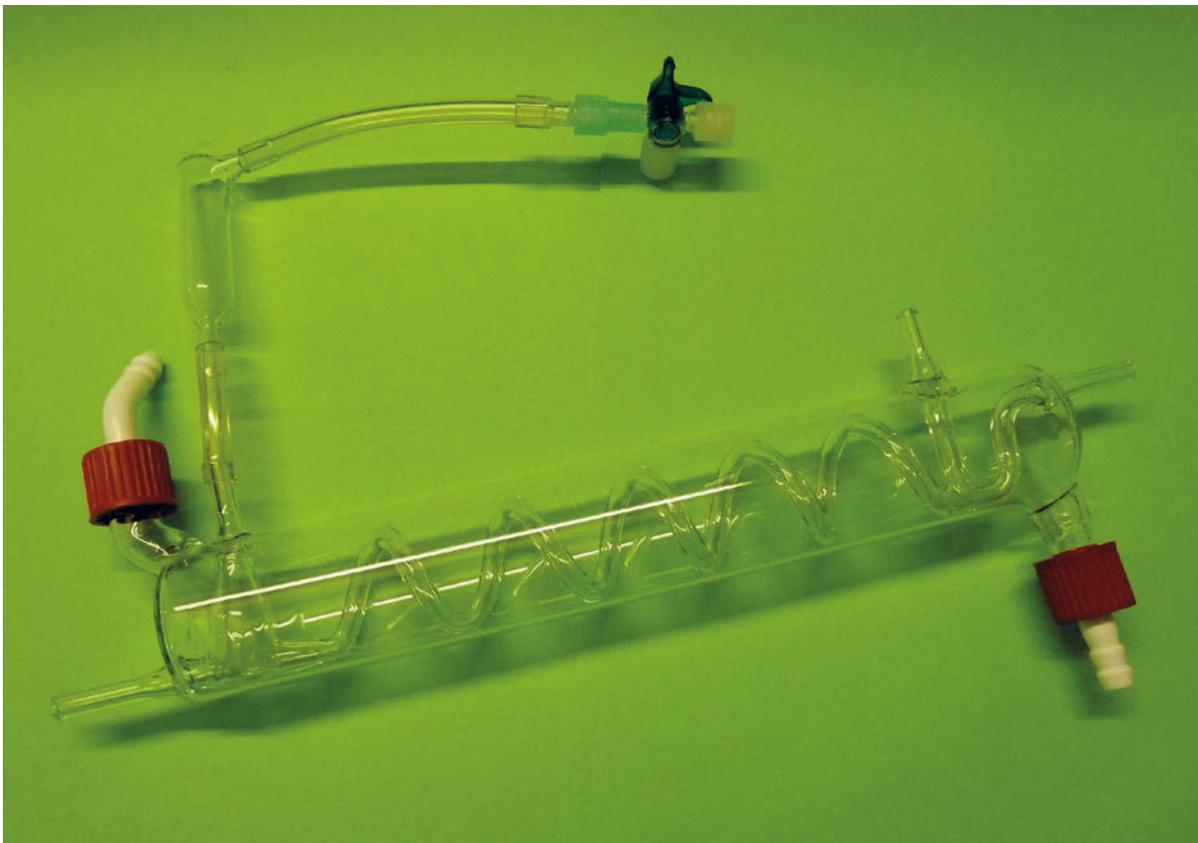


Abb. 4.3.4.: *Temperierte Glasschlange mit Windkessel als Blasenfänger* und Rückführungsanschluss rechts. Perfusatstrom von links nach rechts. Links ist eine Erweiterung, der als zusätzliches Teil eine Expansionskammer als zusätzlicher Windkessel aufgesetzt werden kann (s.a. Abb. 4.3.3.). Rechts ist ein T-Abgang, der vor Perfusionsbeginn der Rückführung des Mediums in das Vorratsgefäß dient, damit keine länger stehenden Säulen entstehen. Abmessungen: Länge insgesamt: 295mm, Glasrohr aussen 38mm, Glasrohr für die innere Glasrohrschlange aussen 6mm, innen 2,5mm. Schraubanschlüsse Glasgewinde Norm GL 14.

4.6. Kanülierung

4.6.1. Arterieller Zugang zur Niere, Perfusionskanülen

Originaltechnik von Weiss (modifiziert) (295) zur Kanülierung der rechten Nierenarterie via art. mesenterica (die auf der Originalskizze fehlt). Der Weg zur Einbindung der arteriellen Kanüle in die Nierenarterie geht über die Intubation der Mesenterialarterie, die meist vis a vis der Nierenarterie entspringt. Die Vena cava wurde über eine Kanüle mit seitlichen Perforationen von caudal intubiert, nach cranial wurde ligiert.

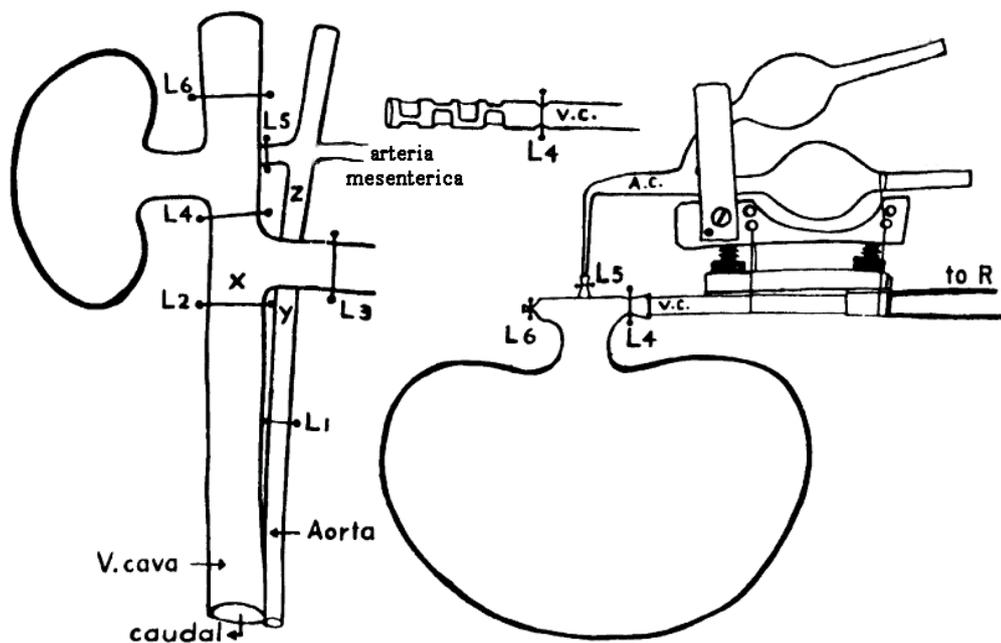


Abb. 4.3.5.: Modifizierte Originalskizze der Kanülierungstechnik von Weiss (295) mit schematischem Operationssitus. Die Druckmessung erfolgte vor der engsten Stelle der Kanüle. Die Vorlage zur Abb. ist der Originalpublikation von Weiss entnommen, die Arteria mesenterica, über die kanüliert worden ist, fehlte aber in der Originalversion (Copyright permission APS).

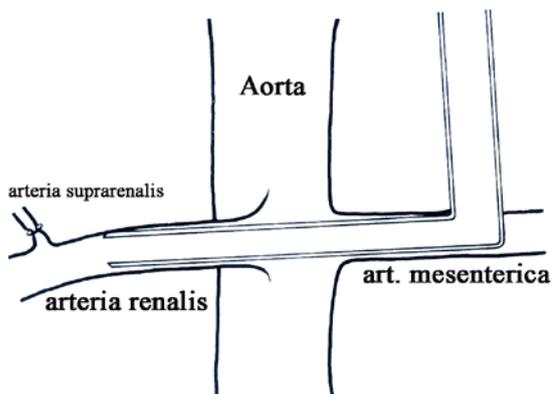


Abb. 4.3.6.: Kanülierungstechnik mit einer Glaskanüle via Art. mesenterica zur rechten Nierenarterie. Voraussetzung ist die gegenüberliegende Position beider Gefäße (176), die nicht immer ideal gegeben ist. Die Abb. ist modifiziert und dem Handbuch von Brian D. Ross entnommen (213). Die Glaskanüle ist aus einem Glasrohr mit 3,5mm Außen- und 2,8mm Innendurchmesser, ausgezogen auf im Spitzenbereich 1,3mm/1mm. Bei im Schnitt 350-400g schweren Tieren ist die Arteria mesenterica damit zu intubieren. Copyright permission vom Autor.

Um den effektiven Perfusionsdruck zu erfassen, haben wir die Technik 1971 modifiziert: Perfusion über die Arteria mesenterica, Druckmessung über die distale Aorta (241, 246). Später wurde diese Anordnung auch für eine druckkonstante Perfusion genutzt mit Feedback-Regelung der Perfusionspumpe. Daraus wurde später die doppelläufige Kanüle entwickelt (s. Abb. 4.3.8.), mit der die distale Aorta intubiert wurde (243, 244). In Unkenntnis der 1975 und 1976 beschriebenen Technik haben Loutzenhiser et al. (150) 6 Jahre später auf die Fehlerquellen hingewiesen, die mit der indirekten Druckmessung vor der Kanülenstenose verbunden sind.

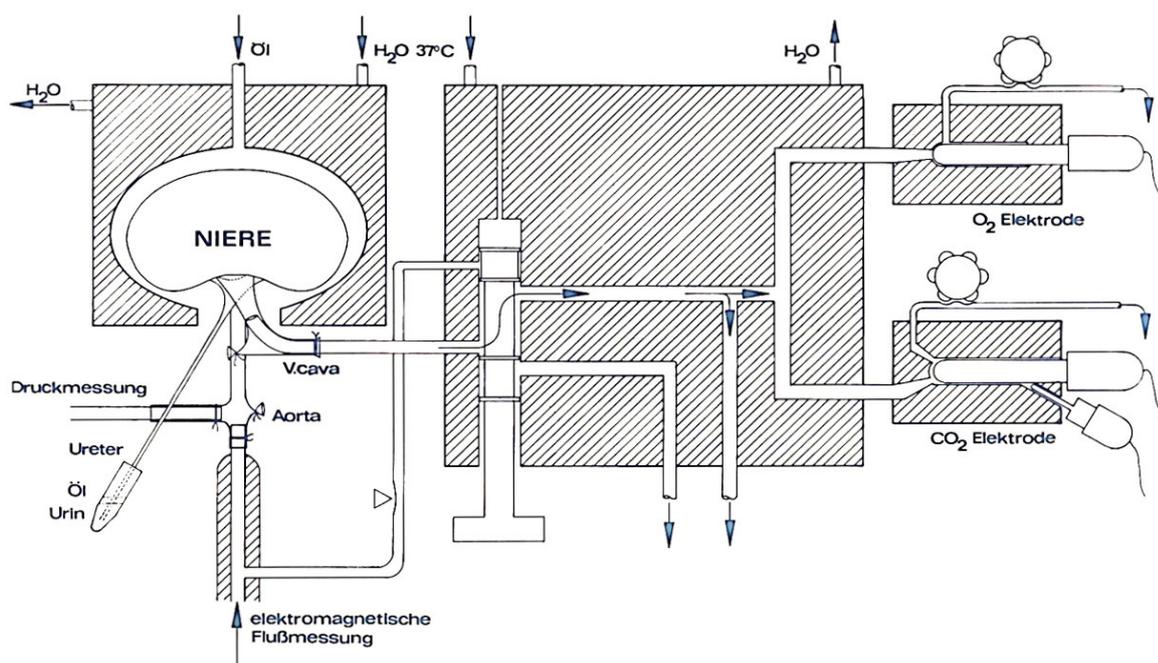


Abb. 4.3.7.: Originaltechnik von Schurek 1969-1974 (246, 247). Die Perfusionskanüle ist in der Art. mesenterica positioniert, die Druckmesskanüle in der Aorta. Die Venenkanüle ist auf den Block rechts montiert und wird in die Vena cava inferior von kranial eingeführt und eingebunden. Durch Verschieben des Kolbens im rechten Block wird der vorkonstringierte arterielle Bypass für die Gaselektroden geöffnet und der venöse Kanal von der Gasmessung weg umgeleitet. Der Weg zu den Gaselektroden hat immer eine offene Seite um Druckschwankungen an den membranbezogenen Elektroden zu vermeiden. **Dieser Ventilblock wurde nur im single-pass Modus eingesetzt.** Weitere Entwicklung zur aktuellen Standardtechnik einer doppelläufigen Kanüle via Aorta von distal (243, 244). Voraussetzung ist die Unterbindung der Art. suprarenalis und kleiner Seitenäste der Aorta zwischen Kanüle und Nierenarterie. Ölzulauf nur im Zusammenhang mit Mikropunktionen, Ölbedeckung der Urintöpfchen nur bei sehr geringen Urinmengen (selten). Zuletzt verwendete Systeme mit Ventilblock s. Abbildungen 8.1.2.2. – 8.1.2.4.

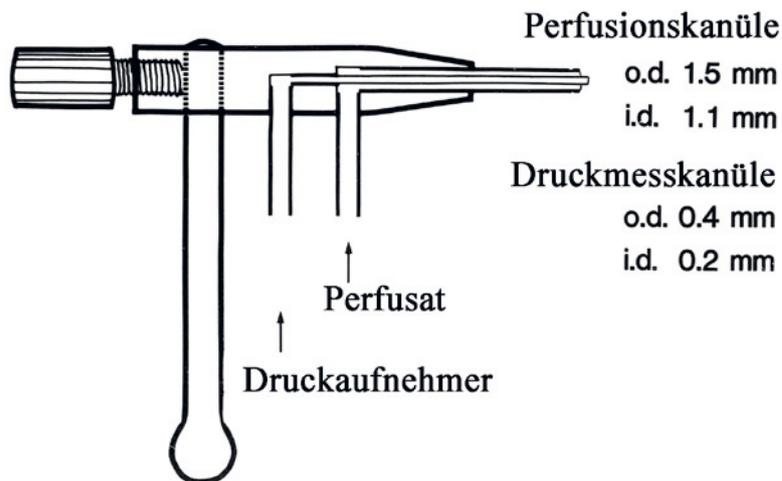


Abb. 4.3.8.: Standardkanüle für die Aortenposition seit 1974.

Die doppelläufige Kanüle hat an der Außenkanüle vorn eine umlaufende Rille zur Fixierung des Einbindefadens. Der Kugelstift ist in einer magnetischen Mulde beweglich eingepasst, um die Kanülierung zu erleichtern (243, 244).

Erstbeschreibung 1975.

o.d. Aussendurchmesser,
i.d. Innendurchmesser.

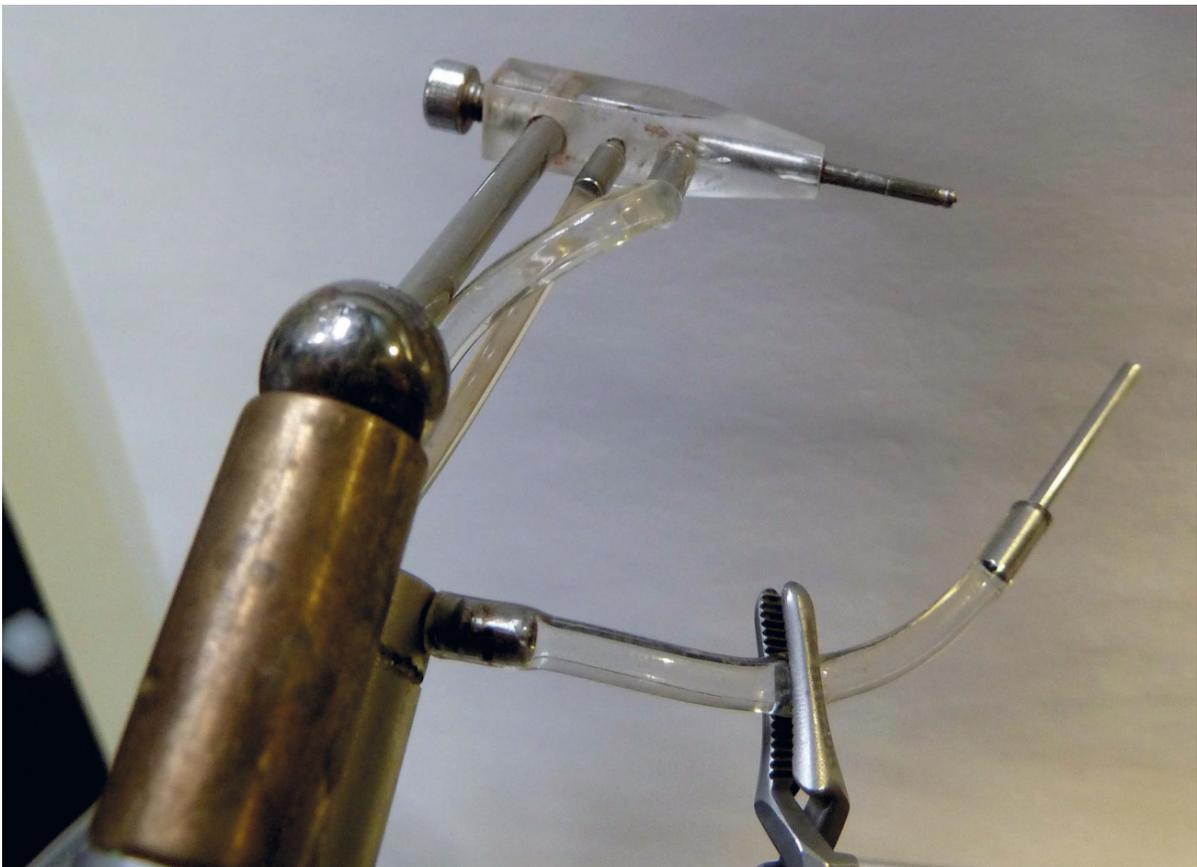


Abb. 4.3.9.a: praktische Ausführung der aortalen Perfusionskanüle, beweglich über einen FE-Magnet-Kugelgelenk. Die Kugel wird magnetisch in einer Pfanne gehalten, (IBS Magnet, Berlin). Der linke Anschluss verbindet die Innenkanüle mit dem Druckaufnehmer. Mit der Krokodilklemme ist der "arterielle" Bypass abgeklemmt, der für die arterielle pO_2 -Messung geöffnet wird. Die gering vorstehende Innenkanüle dient als „Pionier“ bei der Intubation der Aorta. Die Edelstahlkanülen sind in den Acrylglasblock eingeklebt („Plexiglas“).

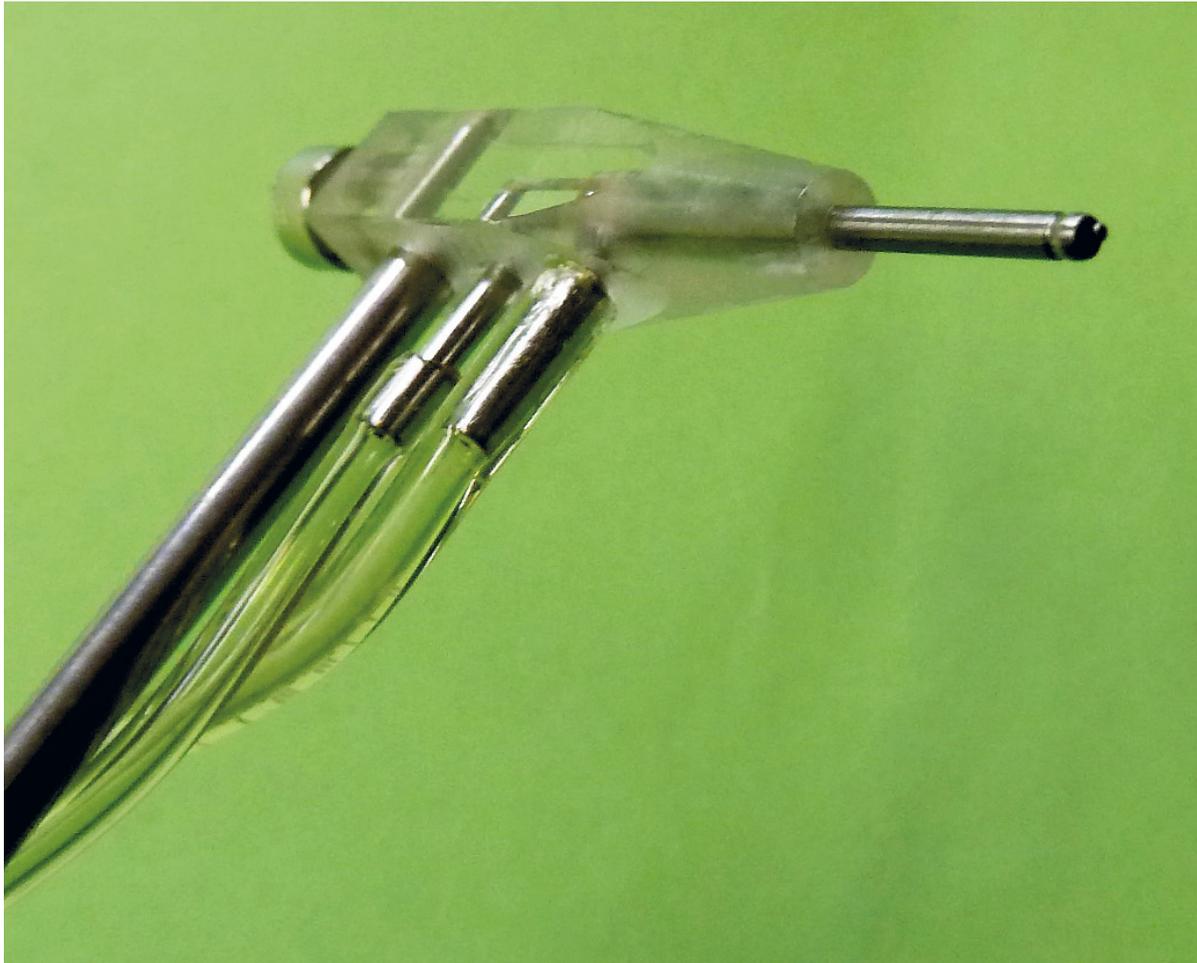


Abb. 4.3.9.b: Detailansicht mit der Innenkanüle. Die vorn leicht vorstehende Innenkanüle reicht bis ganz nach hinten zum abgewinkelten Anschluss an den Druckaufnehmer. Der Weg des Perfusats ist hinten zum Druckkanal hin abgedichtet.

4.6.2. Venöse Kanülierung

Die venöse Kanülierung wird von vielen Autoren kritisch gesehen und wird vermieden (154, 155). Für die Messung des Sauerstoffverbrauchs ist sie aber notwendig und bei unserem Procedere unproblematisch. Erst nachdem die Nierenperfusion etabliert ist, Perfluationsfluß und -druck kontinuierlich mit einem Kompensationsschreiber registriert werden ist die Intubation der mit einer Ligatur versehenen Vena cava einfach, indem die Venenkanüle in die Nähe der Venenöffnung geschwenkt wird und die Vene mit zwei feinen Pinzetten über die Kanüle gezogen wird, die Kanüle nachgeschwenkt und dann eingebunden werden kann. Zu diesem Zeitpunkt ist das distale Ende der Vena cava noch offen. Die distale Ligatur wird danach verschlossen (s.a. techn. Anhang). In jeder Phase kann an der kontinuierlichen Flussregistrierung abgelesen werden, ob eine Abflussbehinderung etc. entsteht. Abb. 4.3.7. zeigt den Modus, der bis ca. 1975 von uns genutzt wurde. Die später genutzte Technik wird in Abb. 8.1.1.5., 8.1.2.2., 8.1.2.3. und der letzte Modus in Abb. 8.1.2.4. gezeigt. Zudem findet sich ausführliches Bildmaterial im technischen Anhang.



Abb. 4.4.0.: Venenkanüle zum Einschwenken in die Vena cava. Die Venenkanüle kann um den T-Abgang gedreht und in die Vena cava von cranial eingeschwenkt werden bei offenem distalen Ende der Vena cava. Nach Einbinden der Kanüle wird das distale Ende der Vena cava verschlossen. Das Effluat fließt in den Trichter unterhalb der Nierenschale, rechts ist ein Lueranschluß für eine venöse Probenentnahme. Außendurchmesser der Kanüle 3,2mm. Der dünnere Teil des T-Abgangs nimmt den Tygonschlauch auf zur pO_2 Druckmessung.

4.6.3. Ureterkatheter

Entscheidend ist die richtige Wahl des Ureterkatheters. Cortell hat bereits 1972 in einer Arbeit darauf hingewiesen, dass der häufig bei Ratten verwendete, weil in den Ureter gut intubierbare PE10 Katheter mit z.B. 50-100mm Länge bei höheren Urinflüssen zu klein dimensioniert ist (57), im Übrigen auch besonders dann, wenn Kolloidanteile (Plasmaersatzstoffe) filtriert und eingedickt den Urin viskös machen. In zwei Arbeiten mit der IPRK wurde das Phänomen beschrieben, dass es bei niedrigem kolloidosmotischem Druck zu einem "erratic behavior" der GFR kommt, die eigentlich ansteigen sollte anstatt abzufallen wie dort beobachtet (33, 145). Bei Verwendung der "richtigen" Katheter ist die GFR umso höher, je niedriger der kolloid-osmotische Druck ist (240, 241) und wie man es nach Starling auch erwartet hätte (277). Bei Perfusion mit **kolloidfreien Medien** ist es aber auch erforderlich, die Nieren zu dekapsulieren, damit es durch die auch interstitielle Schwellung nicht zur Kompression im Gefäßbaum und den Tubuli kommt. Unter diesen Bedingungen liegt der proximale Tubulusdruck (P_{tub}) ohne Dekapsulierung bei ca. 50mmHg bei einer GFR von ca. 0,5ml/min·g Niere, mit Dekapsulierung P_{tub} ca. 30mmHg und GFR ca. 1,2-1,6ml/min·g Niere bei sonst vergleichbaren Bedingungen (u.a. effektiver arterieller Druck 90mmHg, s. Abb. 4.4.4.). Ein kritischer Punkt ist eine Einblutung in einen bereits kanülierten Ureter, insbesondere bei niedrigen Urinflüssen, zumal die Abflussbehinderung dabei erst spät deutlich werden kann. Bei einer kontinuierlichen Flussregistrierung zeichnet sich das früh ab. Die Spitze des Ureterkatheters sollte nicht bis ins Nierenbecken vorgeschoben werden, weil dies leicht zu einer Einblutung führt. Eine Möglichkeit Komplikationen zu reduzieren ist es, den Ureter mit luftblasenfrei vorgefülltem Katheter zu intubieren.

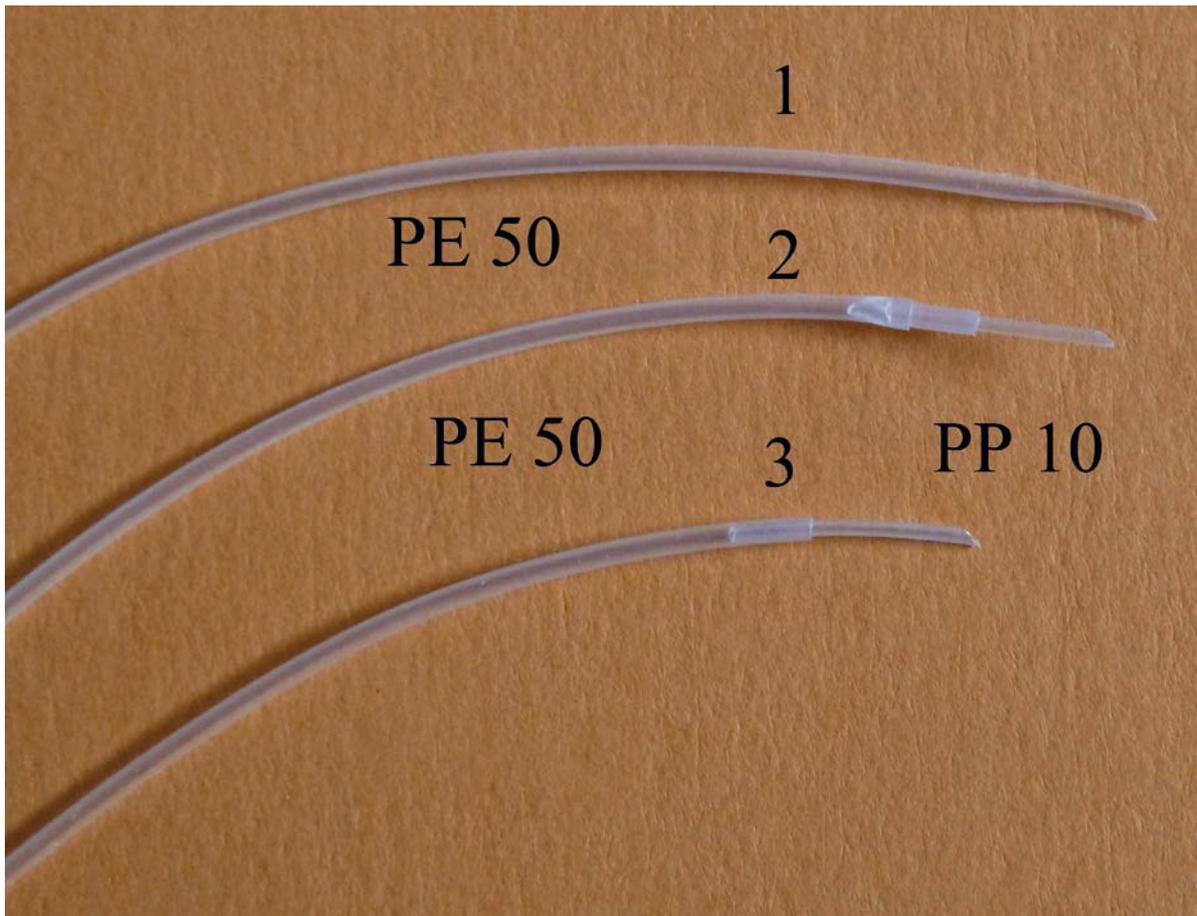


Abb. 4.4.1.: Frontteil des Ureterkatheters: 1. über Wärme ausgezogener PE50 Schlauch, der an der Spitze deutlich dünnwandiger ist und sich konisch verjüngt, 3. kombiniert aus PE50 (Polyethylen) und PP10 (Polypropylen) oder 2. mit Zwischenstück (1,15mm Außendurchmesser). Der Katheter wird vorn eingebunden und mit dem Abbindefaden des Ureters noch einmal gegengesichert. In den ersten Jahren haben wir auch kurze ausgezogene Glaskanülen genutzt, die mit PE50 verlängert wurden (s.a. Abb. 4.4.3.).

Intubiert man den Ureter im oberen Drittel mit einem „trockenen“ Katheter, sieht man nach der initialen Füllung der Spitze, wie sich die Urinfront mit jeder Ureterkontraktion vorschiebt. Dies hängt etwas ab vom Diuresezustand, den einige Autoren mit Mannit oder Furosemid stimulieren. Bei vorgefülltem Ureterkatheter sollte man den Eintrag einer Luftblase vermeiden.

Hydrodynamik im Nephron und kolloid-osmotischer Druck (COP)

Der kolloidosmotische Druck wurde damals nach der Formel v. Landis & Pappenheimer berechnet (133). Die Werte liegen etwas höher als später mit einer 20000 Dalton Membran gemessen (Osmomat 050, Fa. Gonotec, Berlin), s.a. Kap. 9.7, S 107. Empirische Formel nach Landis und Pappenheimer: $2,8c + 0,18c^2 + 0,0012c^3$, wobei c die Konzentration von Albumin in g/dl ist.

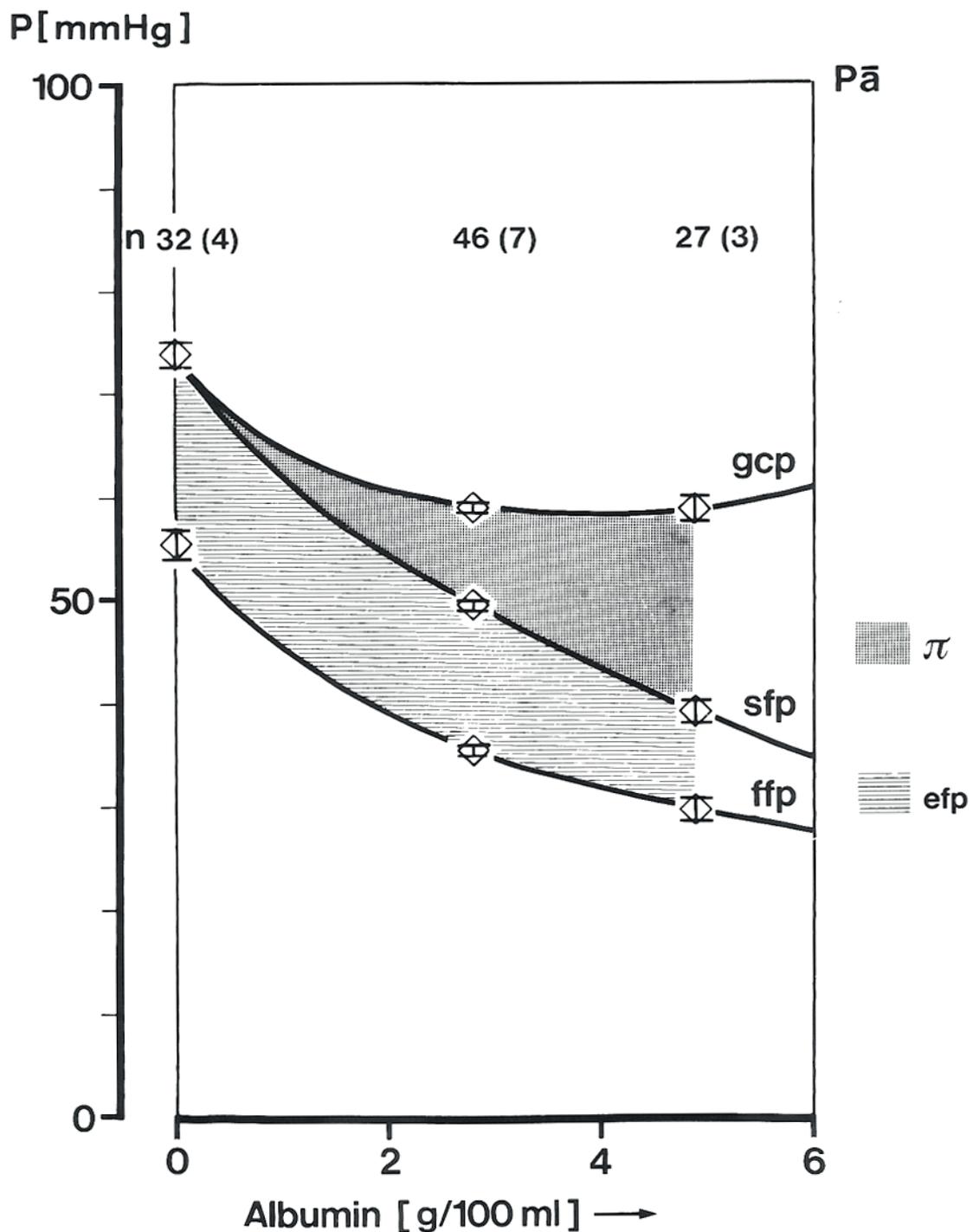


Abb. 4.4.2.: Druckverhältnisse im Glomerulus. Hydrodynamik oberflächlicher Nephrone in Abhängigkeit von der Albumin-Konzentration im Perfusat (aus 240). Freiflussdruck (ffp) und Stoppflussdruck (sfp) wurden im selben frühproximalen Tubulus gemessen (intakte Kapsel). Der glomeruläre Kapillardruck (gcp) wurde aus sfp und dem (COP) colloid-osmotischen Druck π errechnet ($MW \pm SEM$) (240). Die Messungen wurden mit der Landistechnik (133, 134) von Gerd Schwietzer (0g% BSA) (261) und mit der Berliner Messtechnik von Klaus Hinrich Neumann (BSA = >2g%) gemessen (147).

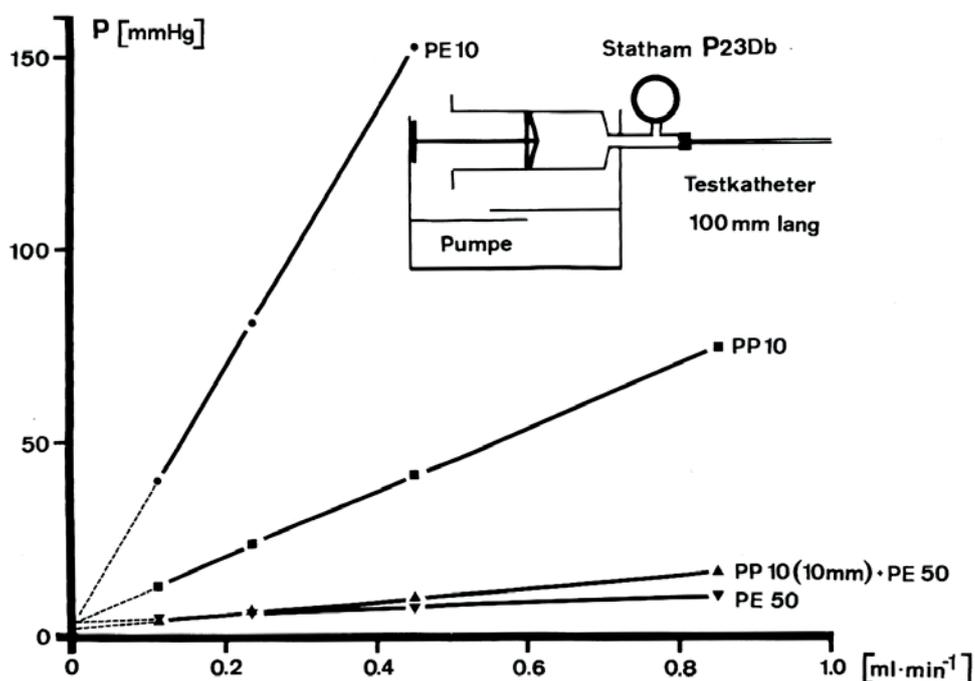


Abb. 4.4.3.: Charakteristik von Ureterkathetern: Übersicht über die Kathetercharakteristik, die mit 0,9% NaCl-Lösung systematisch experimentell ermittelt wurde (aus 240). Flussabhängiger Druckanstieg in verschiedenen am Ende offenen Plastikschläuchen, die als Ureter-Katheter verwendet werden als Maß des Durchflusswiderstands. Der PE10 war Ursache für "the erratic behavior of GFR" (33, 145), ein Artefakt, s. Text oben.

Als Standard Katheter wurde die Kombination PP10 kurz/PE50 länger oder PE20 kurz/PE50 länger oder eine Glasspitze + PE50 (gleiches Druckprofil) verwendet. Der dünne PP10 Katheter in der Spitze war kürzer als 10mm. (PP = Polypropylen, PE = Polyethylen). Die Abbildung ist der Habilitationsarbeit von 1981 entnommen (240, 241). Der PE10 Schlauch ist ein Zoll Maß, das 0,011'' Innenlumen und 0,024'' Außenmaß hat, entsprechend 0,28mm innen und 0,61mm außen. PE50 hat die Zollmaße 0,023'' und 0,038'', das sind 0,58mm innen und 0,97mm Außendurchmesser. Man kann den PE50 Schlauch auch thermisch auf PE10 Maß ausziehen und hat dann einen optimalen Ureterkatheter. Noch besser ist eine thermisch gerundete Glasspitze mit PE50 Anschluss.

Bedeutung der Nierenkapsel für die Perfusion mit kolloidfreiem Perfusat.

Im single pass Modus sollte man bei kolloidfreiem Perfusat die Nierenkapsel vor Beginn der Perfusion auf der Ventralseite abziehen und die Niere damit dekapsulieren. Das gelingt am besten mit feinen Uhrmacherpinzetten, die man dazu nutzt seit- und hiluswärts die Kapsel vorsichtig anzuheben und aufzuschlitzen. Sie lässt sich dann in der Regel vom Einriss aus relativ leicht abheben. Bei der Rattenniere gibt es keine nennenswerten Gefäßverbindungen zur Kapsel wie sie z.B. bei Katzennieren bekannt sind als venöse Drainagen über die Kapsel. Die Abb. 4.4.4. zeigt den Unterschied einer Situation mit und ohne Kapsel auf die

GFR und den hydrostatischen Druck im proximalen Tubulus (bislang unveröffentlicht). Voraussetzung für das hohe Filtrat ist ein freier Urinabfluss bzw. ein ausreichend weitlumiger Ureterkatheter. In zwei Arbeiten, in denen ein PE10 Schlauch als Ureterkatheter verwendet worden ist wurde eine niedrige GFR beschrieben und als „erratic behavior of GFR“ bezeichnet (33, 145), was der Starlingschen Vorstellung entgegenstand (277) und sich als Artefakt erwiesen hat (240, 241)*. Die Mikropunktionsdaten wurden mit der Landistechnik** und dem in Berlin entwickelten Druckmesssystem*** gemessen (134, 147).

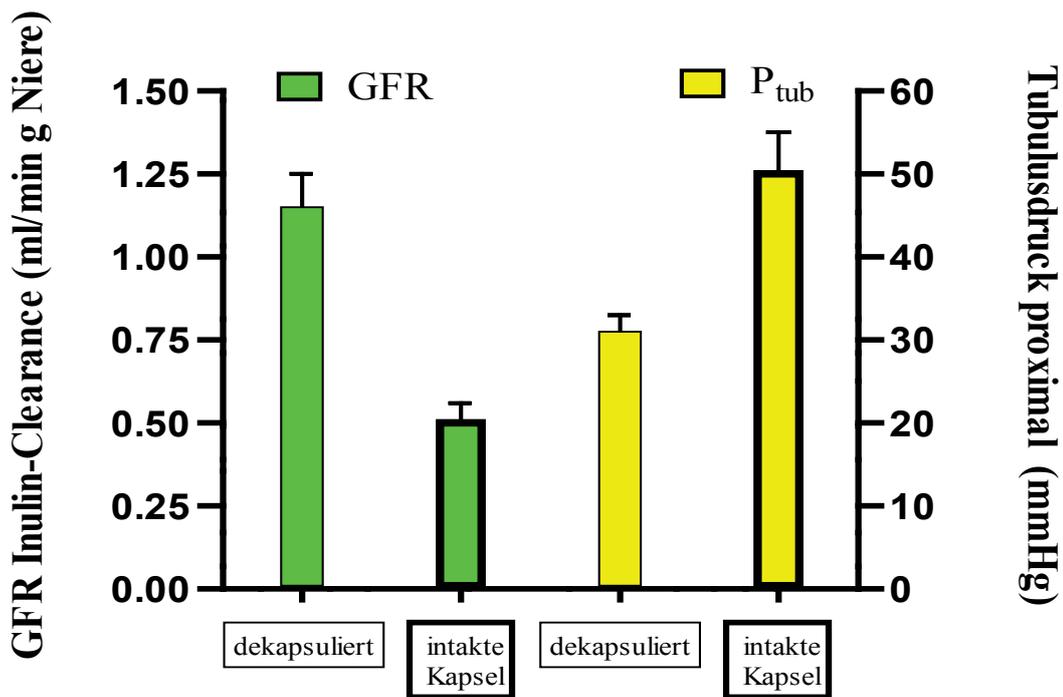


Abb. 4.4.4.: Isoliert perfundierte Niere, single-pass, kolloidfreies Perfusat. Die Bedeutung der Dekapsulierung bei kolloidfreiem Perfusat geht aus dieser Gegenüberstellung hervor. Der bei intakter Kapsel erhöhte tubuläre Druck limitiert die glomeruläre Filtration, löst man die Kapsel ab, fällt der P_{tub} und das Filtrat steigt. In der ersten Arbeit von 1981 (241) wurde bei kolloidfreiem Perfusat noch nicht systematisch dekapsuliert, dies ergab sich erst aus obigen Befunden und wurde seitdem so praktiziert mit dem Ergebnis, dass die Perfusionsrate initial deutlich höher war ebenso wie die GFR (unveröffentlichte Befunde). Bei kolloidfreiem Perfusat ist ein effektiver Perfusionsdruck von 90mmHg adäquat (mit Kolloid in der Regel 100mmHg).

* In vivo ist ein Ureter mit Peristaltik gegenüber dem PE10 Katheter ein Champion.

**Die Mikropunktions mit der Landistechnik wurden im Labor in Hannover von PD Dr. med. Gerd Schwietzer durchgeführt (unveröffentlicht, (235)), damals Assistent bei Prof. Karl-Heinz Gertz im Physiologischen Institut der Medizinischen Hochschule Hannover.

***Die Mikropunktions mit dem Berliner Druckmess-System (147) wurden von Prof. Dr. med. Klaus H. Neumann in unserem Labor in Hannover durchgeführt, s.a. Kapitel 13.0.

5. Material für die Perfusionsapparatur

5.1. Single pass System

Wir haben den Aufbau der Perfusionsapparatur so gestaltet, dass die verschiedenen Varianten wie single pass Modus, reine Rezirkulation und Rezirkulation mit Dialyse ohne große Umbauten realisiert werden können. Eine große Temperierwanne mit Einhänge-thermostat und Umlaufpumpe, in der sowohl der 5 Liter große Dialysatbehälter wie auch die Einrichtung zur Gasbefeuchtung Platz haben. Erlenmeyerkolben 500ml mit Schliff für den Einsatz einer Glasfritte zur Gasbefeuchtung, vorgeschaltet eine Gastemperierschlange. Zusätzlich eine temperierte Glasschlange zur leichten Nachtrocknung (vermeidet Eintritt von Kondenswasser ins Medium). Ein Glas-Steigrohr 3-4cm Durchmesser, 200cm hoch für das abfließende Gas gegebenenfalls zur Erhöhung der Gaspartialdrucke, einstellbar über die Eintauchtiefe eines Rohres (Schlauches) in eine Wassersäule, auch als hydrostatischer Druck-Antrieb für die single pass Perfusion verwendbar. Eine übliche Gasmischung von 95%O₂ und 5%CO₂ führt nicht zu dem theoretischen pO₂ von z.B. 760mmHg, -47mmHg Wasserdampfdruck = 713mmHg, davon 95% = 677mmHg, sondern zu Drucken von 450-600mmHg, je nach aktuellen Bedingungen, da über Schläuche einiges an Sauerstoff abdiffundiert auch in Abhängigkeit von den jeweiligen Perfusions-Flussraten.



Abb. 5.1.1.0.: Einrichtung zur Temperierung und Gasbefeuchtung. In den Erlenmeyerkolben gefüllt mit Aqua dest. taucht die Fritte ein, die das über die Glasschlange temperierte Gas befeuchtet. Damit kein Kondenswasser in das Medium eingespült wird durchläuft das angefeuchtete und angewärmte Gas noch eine zweite temperierte Spirale, bevor es in das Dialysat eingeleitet wird bzw. in den Membranoxygenator.

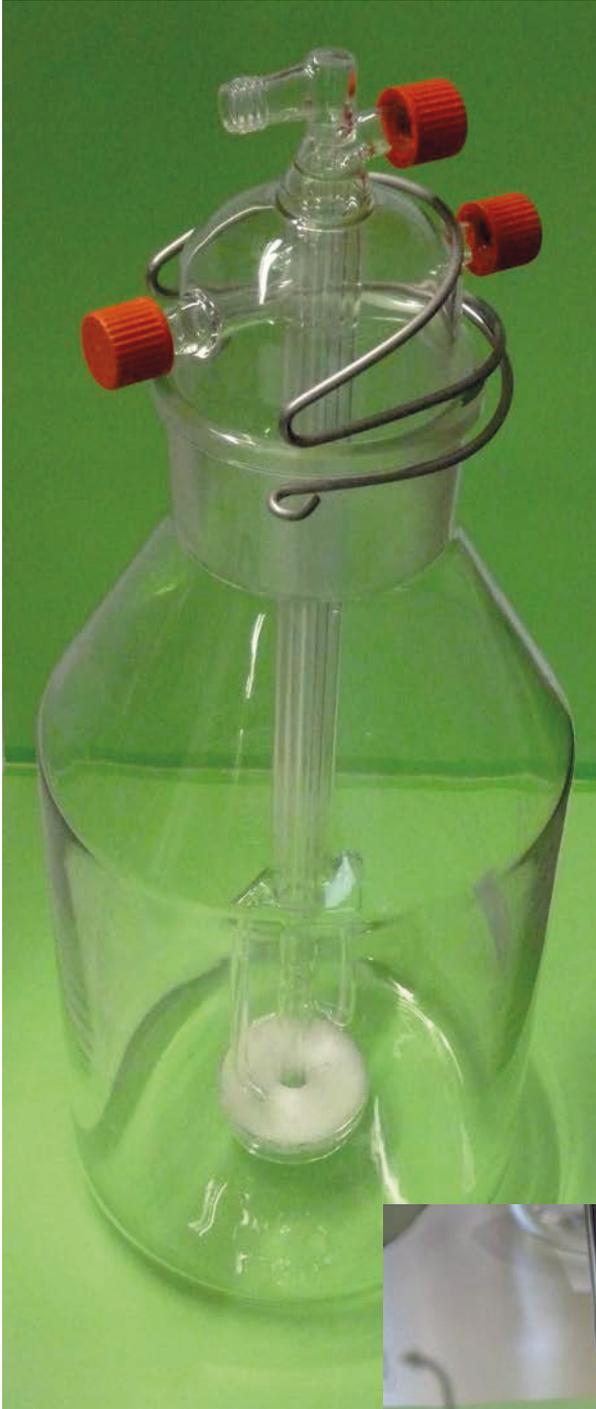


Abb. 5.1.1.1.: 5 Liter Weithalsflasche mit Schliffgröße NS85/55, Spezialeinsatz mit 4 Anschlüssen.

Dreifacheintauchrohr: schmales zentrales Rohr mit Öffnung knapp über dem Flaschenboden (oberster Anschluss links – ohne Einschraub-Nippel), über dem zentralen Rohr das nächst weitere Gaseinleitungsrohr, das unten in einer nach oben gerichteten Tellerglasfritte mündet (oberer Anschluss rechts), darüber das dritte weite Glasrohr, das unten zwei seitliche Abgänge zur Rückführung des Mediums hat – unterer Anschluss links – und ein weiterer Anschluss als Entlüftungsabgang oben am Dom rechts. Die Glasröhren, die über der Glasfritte abgewinkelt sind führen zu einer Durchmischung und Rotation des Mediums. Die kann auch mit einem Magnetrührer forciert werden, der noch zwischen Glasboden und Glasfritte passen sollte. Das System ist für single-pass Modus als Quelle wie auch für den Rezirkulationsmodus mit Dialyse als Dialysatbehälter geeignet (Glaswerkstatt MH-Hannover, Modifikation Münster).

Unten Detailansicht der „Rotationsdüsen“ für das rezirkulierende Dialysat, unmittelbar über der Tellerfritte positioniert.



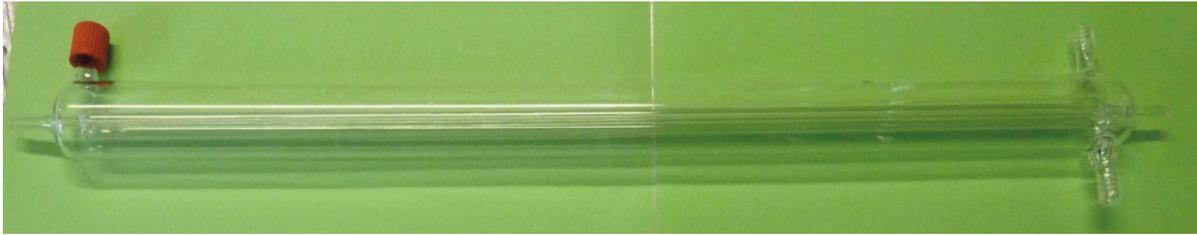


Abb. 5.1.1.2.: *Temperiertes Überleitungsrohr zur Rezirkulationspumpe* versus Perfusionspumpe, Zu- und Ablauf für den Umlaufthermostaten sind rechts im Bild, links Entlüftungsstutzen. Ein zusätzliches mittleres Glasrohr ermöglicht Zu- und Ablauf für den Umlaufthermostaten auf einer Seite, rechts. Länge über Alles: 725mm, Glasrohr aussen 38mm, inneres Glasrohr aussen 6mm, innen 2,5mm.

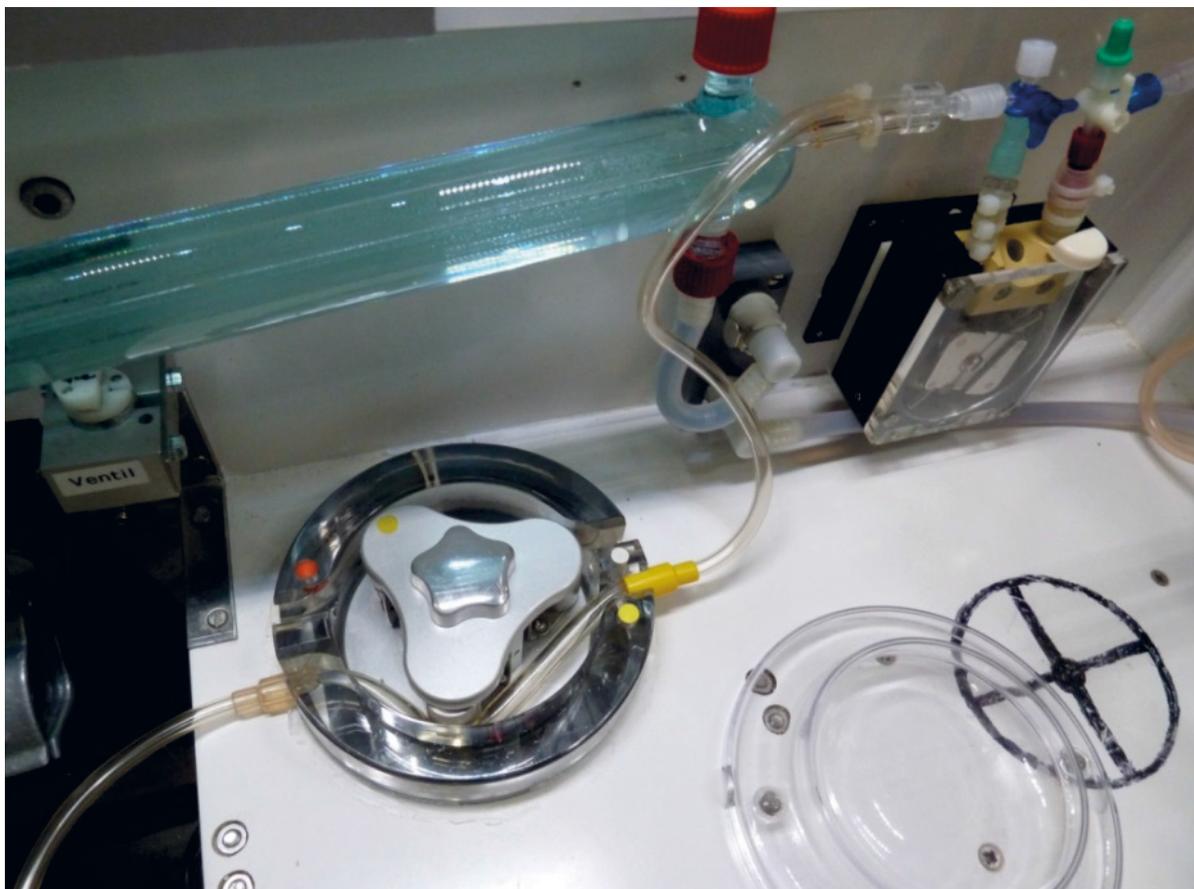


Abb. 5.1.1.3.: *Rezirkulationspumpe*. Optional wie hier auch im single-pass Modus nutzbar, reduziert stagnierende Flüssigkeitssäulen mit zusätzlichem Rühreffekt im Reservoir. Rechts im Bild die das Organ versorgende Perfusionspumpe mit Tachogenerator, Analogausgang zur Registrierung der Flussrate mit einem Kompensationsschreiber. Da das Tachosignal auch zur Feedback-Regelung genutzt wird ist ein Zwischenverstärker zur Aufbereitung des Tachosignals für den Schreiber notwendig. Die Rezirkulationspumpe wird im Modus 3 (Dialysator) mit zwei Pumpschläuchen betrieben, einer für das Dialysat, ein weiterer für das Perfusat. Die Flussraten können über die Wahl der Schlauchlumina different eingestellt werden (gleiche Schlauchwandstärke).

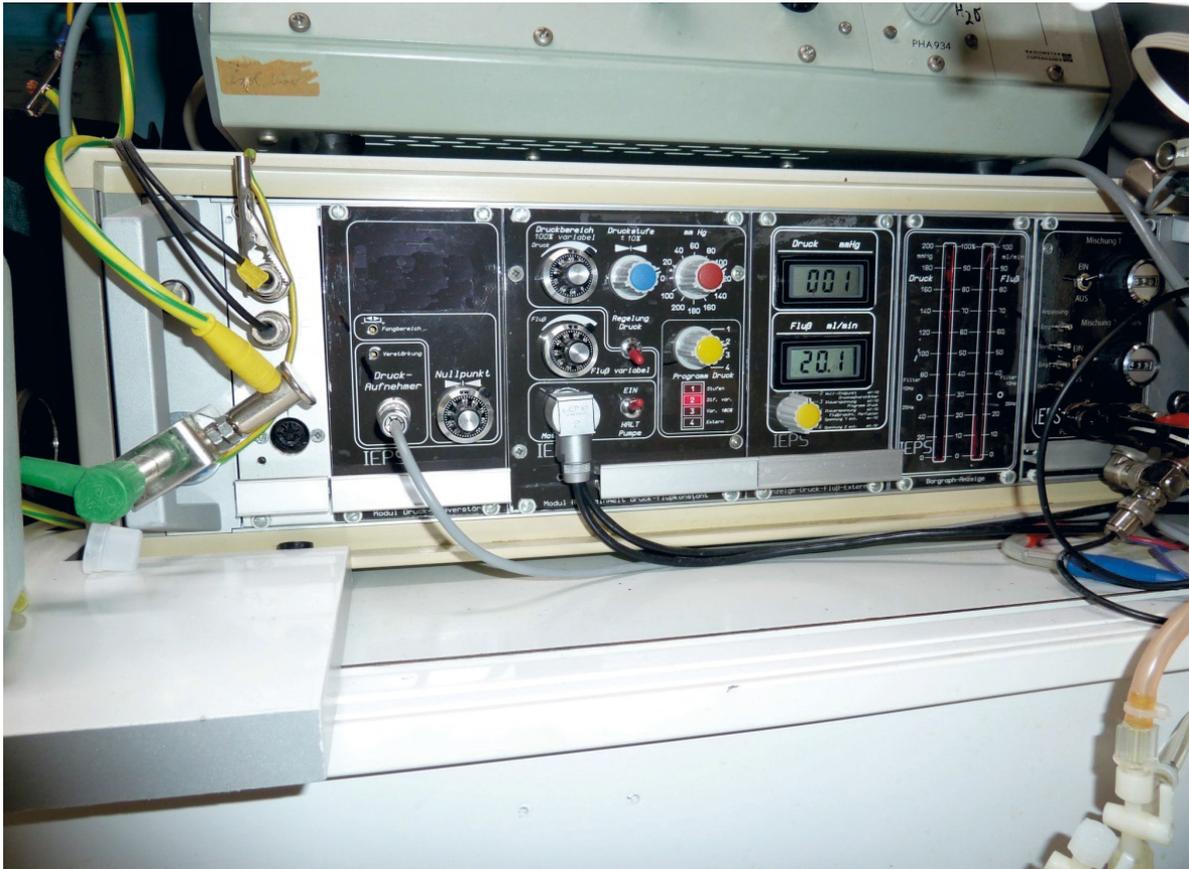


Abb. 5.1.1.4.: Steuerungseinheit für die Perfusionspumpe für fluss- oder druckkonstanten Modus. Der linke Einschub gibt Analogsignale von Druck und Fluss an den Kompensationschreiber, der nach rechts folgende Einschub dient der 0-Justage des Druckaufnehmers. Der 3. Einschub ist die Verbindung zur Rollerpumpe. Das Generatorsignal der Rollerpumpe wird genutzt für die Regelung der Druckkonstanz und für das Analogsignal der Flussrate für den Kompensationsschreiber. Hier kann der Druck in Druckstufen von 20mmHg oder kontinuierlich verändert werden oder auch ein flusskonstanter Perfusionsmodus vorgegeben werden. Die folgenden 2 Einschübe sind Anzeigeeinstrumente für Fluss und Druck. Der erste Einschub hat die Digitalanzeige für Druck und Fluss, der zweite Einschub hat Anzeigen als LED-Leuchtbalken ungedämpft, sodass Pulsatilität deutlich erkennbar und die Amplitude ablesbar wird. Bei flusskonstantem Betrieb und voll genutztem Windkessel sind Pulsationen stark unterdrückt, bei ausgeklemmtem Windkessel erreicht die Amplitude ca. 20-30mmHg. Die Pulsationsfrequenz hängt von der Dimension des Pumpenschlauchs ab.

Flußproportionale Zuinfusion vasoaktiver Hormone oder Pharmaka

Joachim Lutz in Würzburg hatte ein System entwickelt, mit dem das Tachosignal der Perfusionspumpe per Zwischenverstärker genutzt werden konnte, um eine Zuinfusionspumpe flußproportional anzusteuern (152b). Wird ein vasoaktiver Stoff zuinfundiert und die Flußrate geht zurück, so wird die Zuinfusion der Substanz in der gleichen Proportion reduziert, d.h. die Endkonzentration bleibt gleich und ein steady state wird leicht erreicht. Wir haben das System in unsere Steuerungseinheit implementiert (s. Abb. 5.1.1.5).

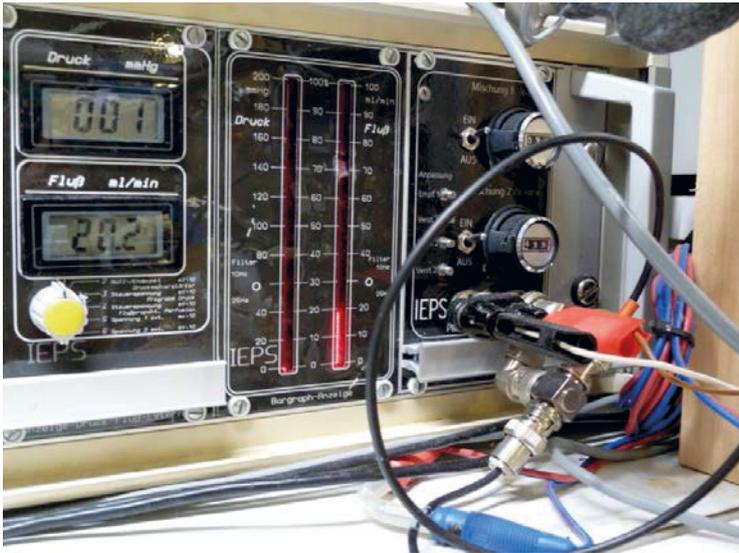


Abb. 5.1.1.5.: Detailbild zu oben. Der rechte Einschub enthält zwei Steuerungseinheiten um Infusionspumpen proportional zur Perfusionsrate anzusteuern, z.B. bei Zuinfusion vasoaktiver Hormone. Damit erreicht man eine konstante Endkonzentration im druckkonstanten Betrieb bei sich ändernder Flussrate. Dies wurde u.a. in Kooperation mit A. Kurtz eingesetzt und bei den Untersuchungen mit H.Thole über Angiotensin II Effekte (129, 286).

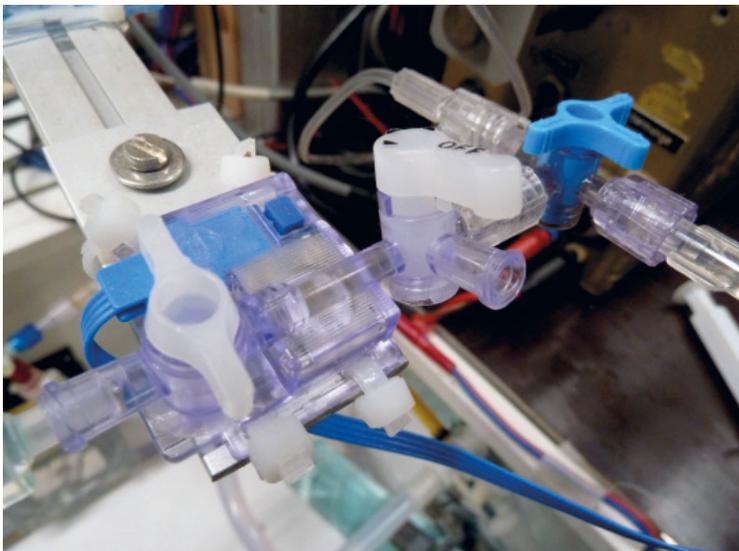


Abb. 5.1.1.6.: Druckaufnehmer mit Vorverstärker und tastbarem Kalibriersignal*.

Dieses Einmalsystem aus dem intensivmedizinischen Bereich ist auch zum Dauergebrauch im experimentellen Aufbau gut geeignet.

*das kleine blaue Rechteck ist die Kalibriertaste für 100mmHg.

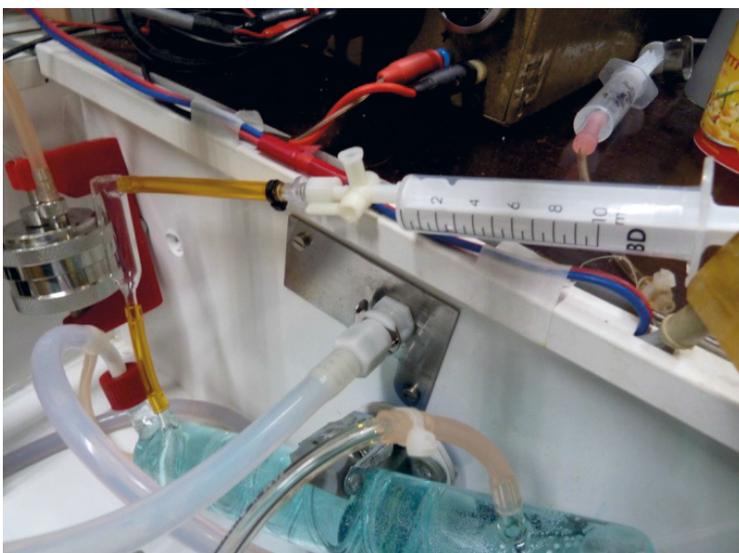


Abb. 5.1.1.7.: In-line Filter (s.a. Abb 5.1.1.9, Membranen mit 8-12 μ m Porengrösse), für den single-pass Modus optional, für den Rezirkulations-Modus essentiell, inadäquat bei Einsatz von gewaschenen Erythrozyten. Endre beschreibt dafür die Nutzung von Pall/Fenwall (20-40 μ m) Transfusionsfiltern (66) bei Einsatz von Erythrozyten. Miller hatte zur Perfusion der isolierten Leber weiße Seide mit einer Maschendichte von 100-150/2,54cm (Zoll) benutzt (165).

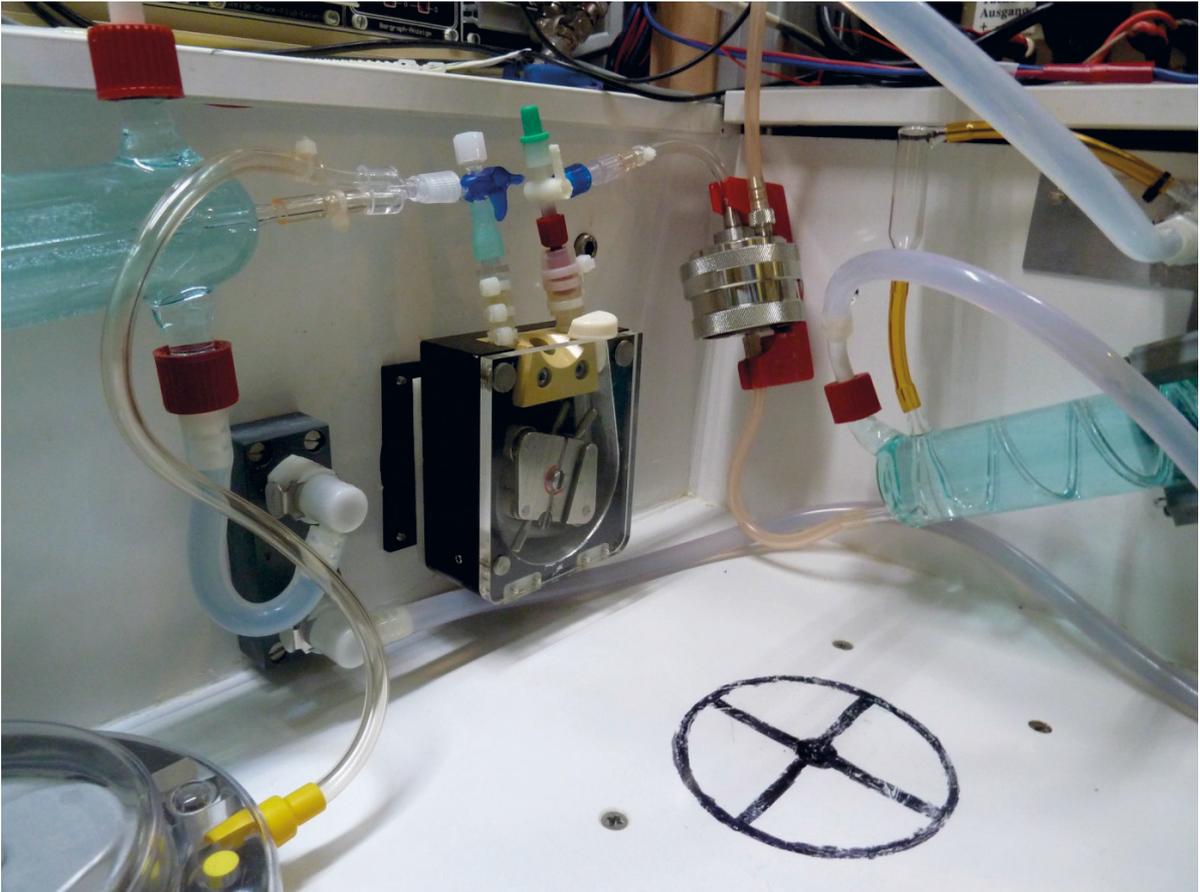


Abb. 5.1.1.8.: Über Eck Aufbau der Komponenten unterhalb des Niveaus des Perfusions-tisches (rechts). Unter dem markierten Kreuz ist ein Magnetrührer aufgehängt; bei Rezirku-lation steht hier der temperierte Perfusatbehälter mit Magnetrührstab. Die Wasserumlauf-thermostate sind mit Polypropylen-Kupplungen aus der Drucklufttechnik angeschlossen (Colder Products Company, St. Paul, MN. USA, Niederlassung EU: Grossostheim, BRD; Carl Nolte Technik, Greven, BRD). Diese gibt es ohne und mit Rückschlagventil, das sich beim Zusammenstecken jeweils beidseits öffnet.

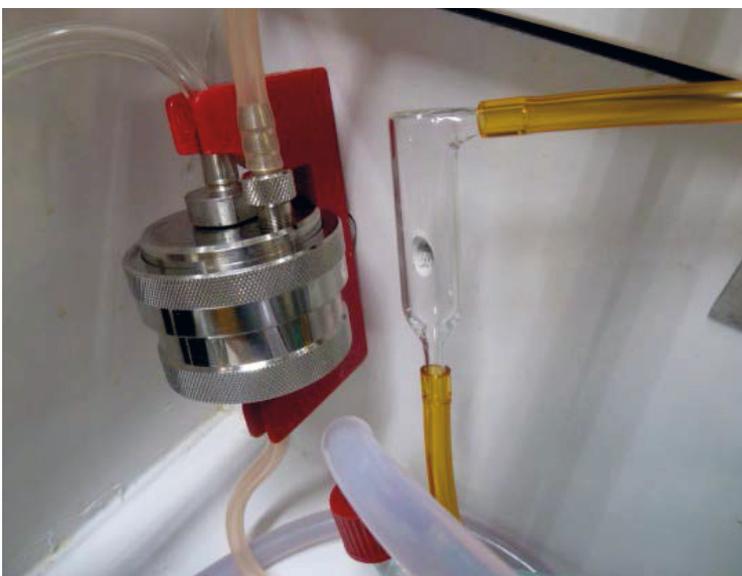


Abb. 5.1.1.9.: Windkesselaufsatz. Das Luftpolster kann in der Höhe variiert oder ganz ausgeklemmt werden, um z.B. eine Pulsatilität von Fluss und Druck zu erreichen. Links inline Filter mit Entlüftung-stutzen (Fa. Sartorius, Göttingen, BRD).

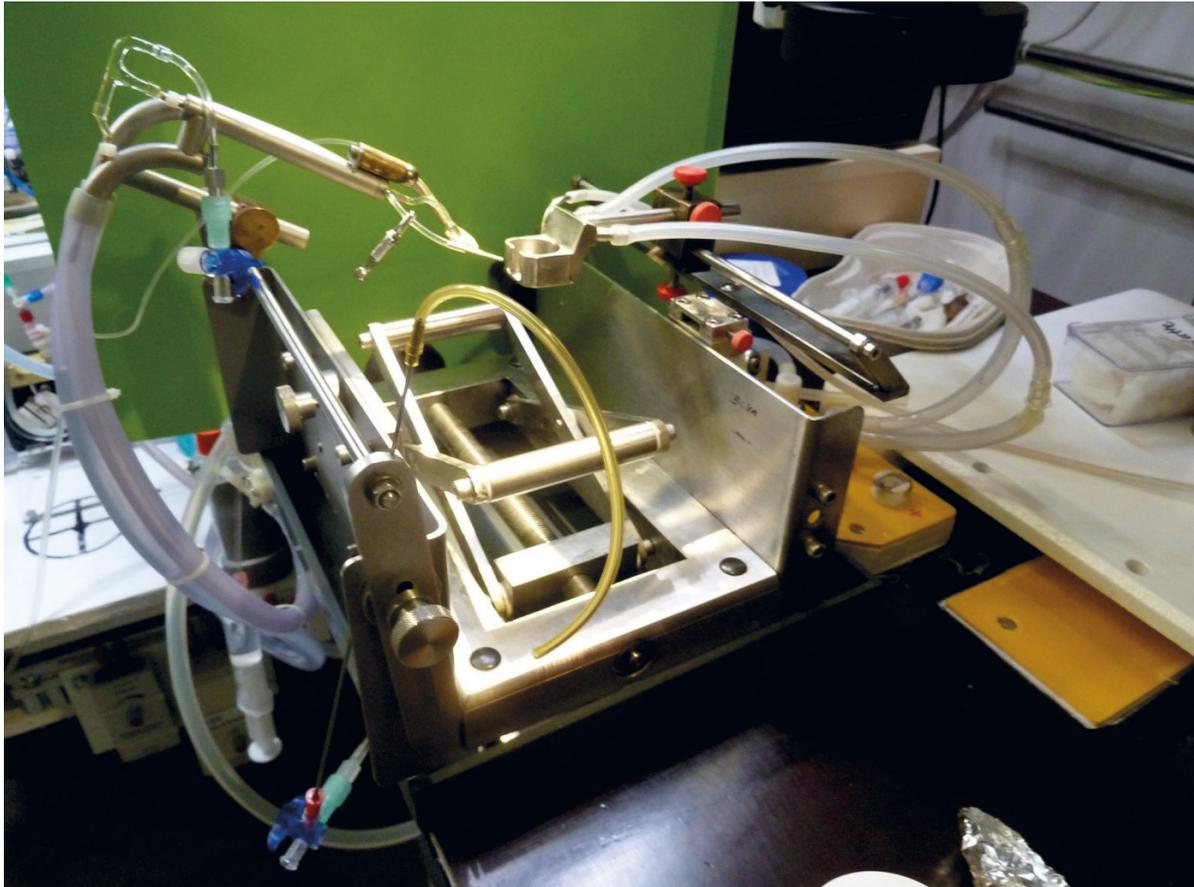


Abb. 5.1.2.0.: Perfusionstisch, schwere Ausführung für Mikropunktionsversuche, in einer Auffangwanne mit Montagebügel für die Nierenschale, davor und darunter eine Einschuböffnung für den Sammeltrichter und gegenüber der Montagebügel für die Perfusionspistole. Mit dem Scherenlift wird nach Anschluss der Niere der OP-Tischeinsatz abgesenkt, die Restverbindungen zum Tier werden durchtrennt und der wasserbadtemperierte Tischeinsatz mit Tier seitlich rechts vorn herausgezogen.

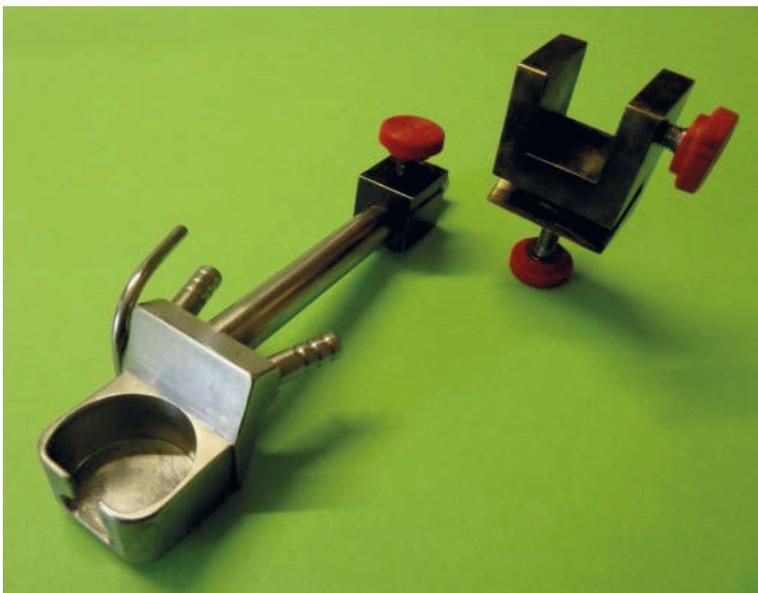


Abb. 5.1.2.1.: Mit Wasserbad temperierte Nierenschale aus Edelstahl mit zweigeteilter Halterung zum Einlegen von oben. So kann man das Organ in situ frei von oben hiluszentriert in die Nierenschale hinein „einstülpen“, s.a. techn. Details & Abmessungen der Nierenschale Abb. 15.1.7 im Anhang.

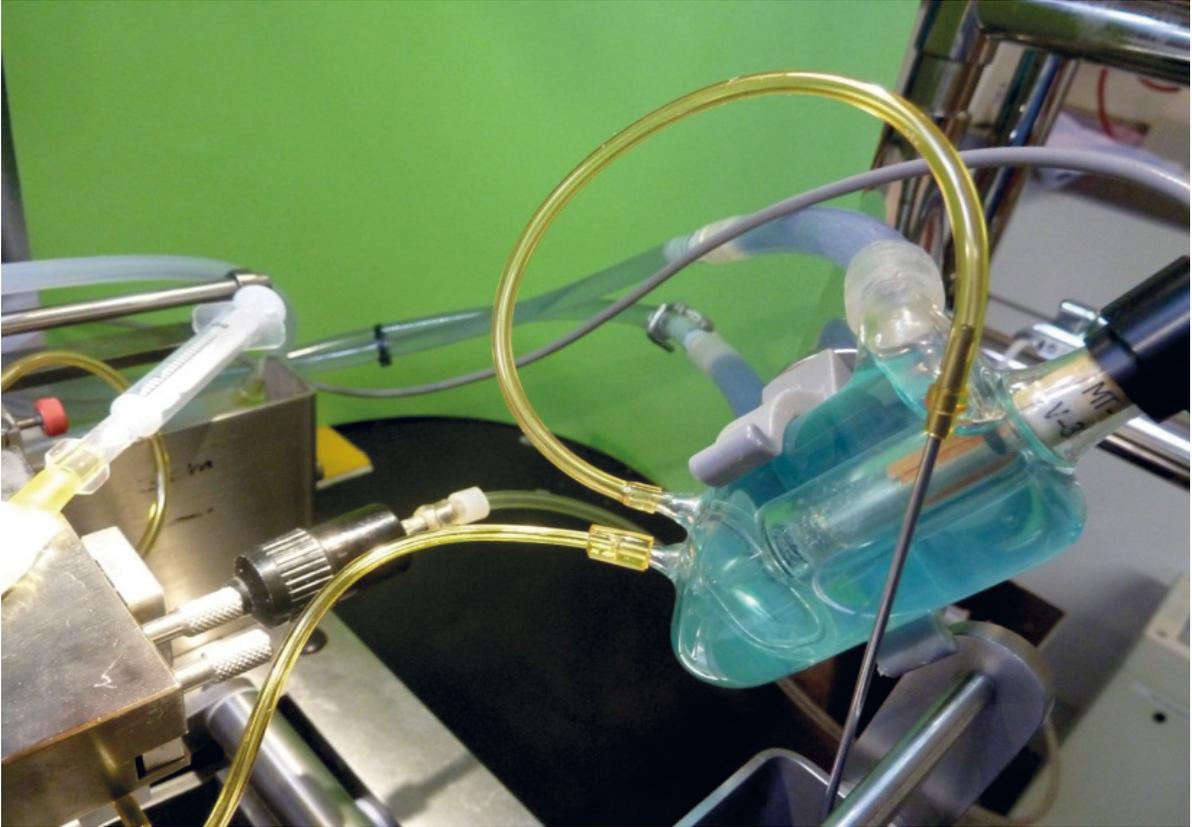


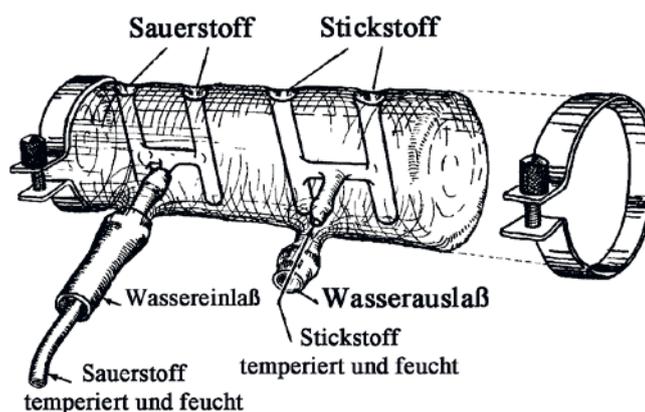
Abb.5.1.2.2.: *Temperierte Messzelle für die Sauerstoffmakroelektrode.* Das Messliquot wird mit einer kleinen Rollerpumpe mit einer Rate von 3-4ml/min durch die Messzelle gezogen, in single-pass Modus verworfen, bei Rezirkulation zurückgeführt. Der Anschluss vor der Messzelle ist atmosphärisch offen. Bei arterieller Messung wird der Ventilbalken elektro-pneumatisch bewegt und öffnet den arteriellen Bypass (vorkonstringiert). Bei druckkonstanter Regelung nimmt die Flussrate um den entsprechenden Betrag im Bypass zu. Für Mikropunktionsbedingungen wurde die O₂-Messzelle nach hinten umgelagert, die elektro-pneumatische Umschaltung erlaubte einen erschütterungsfreien Wechsel von venöser zu kurzen Phasen einer arteriellen Messung auch während der Mikropunktion (s.a. techn. Anhang, O₂-Elektrode Typ MT-1-AC, Eschweiler, Kiel).



Abb. 5.1.2.3.: *Kleine Rollerpumpe,* die das Messliquot zur O₂-Elektrode transportiert (ca. 3-4ml/min).

Vorrichtung zur Kalibrierung der Sauerstoffmakroelektrode

Abb. 5.1.2.4.: Kalibrierung der O₂-Elektrode. Oben rechts die Originalzeichnung der verwendeten Mischkammer für die Blutgasäquilibrierung aus einem alten Astrup pH-Meter, sie wurde zur Kalibrierung der O₂-Elektrode genutzt. Die doppelwandigen Glaszylinder zum Aufsättigen von O₂ und N₂ sind links bunt und schematisch dargestellt. Die mit einem Umlaufthermostaten temperierten Kammern sind in Serie miteinander verbunden, entlüftet werden die Zylinder über die Anschlüsse rechts oben. Die in der Gasblasenspirale (Karussell) aufgesättigten Gase werden zu der oben abgebildeten Mischkammer geleitet und von dort über ein Vierwegeventil zur O₂-Elektrode. Die Aufsättigung der Gase ist optimal gelöst, indem das trockene kühle Gas von unten in die Zylinder einströmt, im unteren kleinen Dom aufsteigt, umgelenkt wird und aus dem unten angebrachten Loch in die wässrige Phase in Form von kleinen Luftblasen austritt, die sich an die Wasseroberfläche emporwinden, aus dem Wasser austreten und dann über den inneren eines doppelläufigen Verbindungsschlauches in die



Mischkammer gelangen, warm und aufgesättigt. Der Außenschlauch führt das temperierte Wasser. Der Nachbau dieser von Poul B. Astrup in Kopenhagen konzipierten Glasteile ist eine Herausforderung für jeden Glasbläser. Eine Nullkalibrierung der O₂-Elektrode kann auch mit einer Thiosulfatlösung erreicht werden (sogenanntes Fixiersalz Na₂S₂O₃).

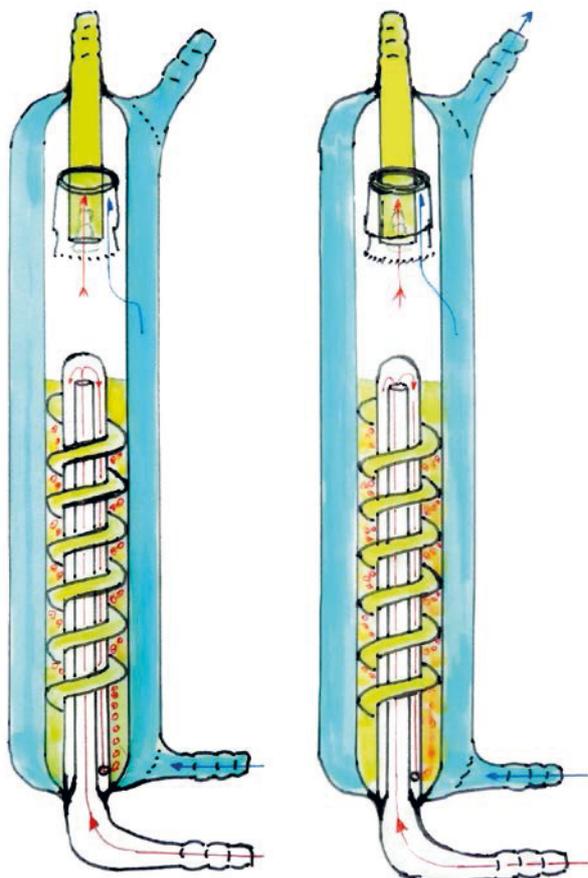




Abb. 5.1.2.5.: Effluatreservoir mit Zulaufschlauch. Links ist die Perfusionspumpe, das in-line Filter und die Glasschlinge abgebildet, darüber im Goldtton die proportional steuerbare Zuinfusionspumpe, links unten Steuerungsmodul für den Einmischmagnetrührer und die Schlauchpumpe für die pO_2 -Messung.

5.2. Rezirkulations-System

Die unterschiedlichen Systeme sind den Anforderungen angepasst. So ist das vom Maack favorisierte System für Hormonstudien gut einsetzbar, aber in der Version der Abb. 5.2.1. nicht für gut kontrollierbare Bedingungen – wie für Mikropunktionsstudien notwendig – geeignet. Für Mikropunktionsstudien musste entsprechend modifiziert werden (60).

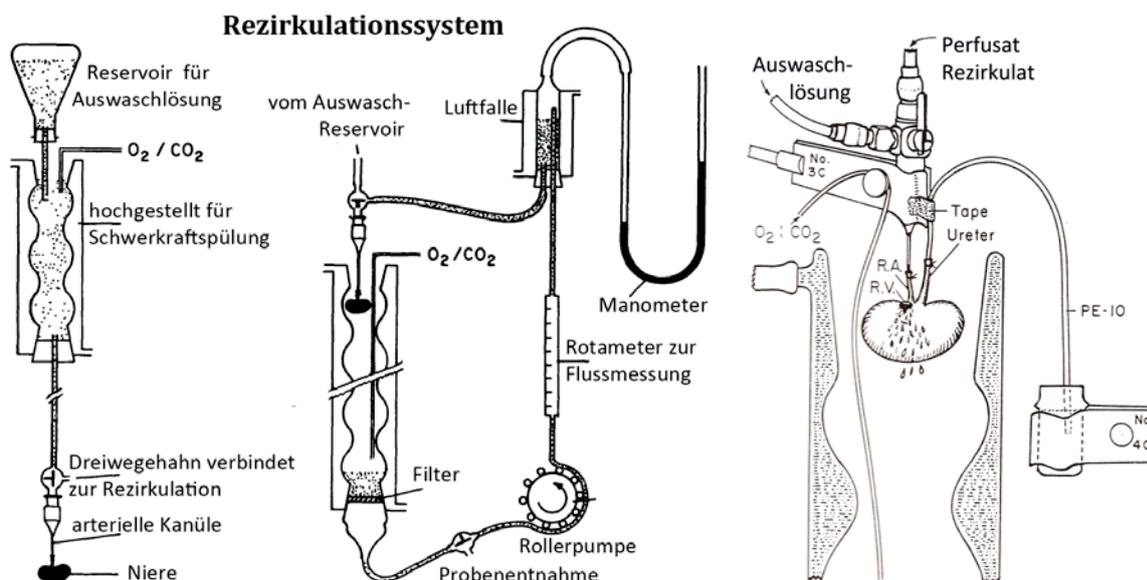


Abb. 5.2.1.: Rezirkulationssystem von Maack und Bowman. Das von Thomas Maack bevorzugte, weil nach seiner Meinung sehr einfache System einer IPRK, das in einer Arbeit von 1972 (34) ausführlich beschrieben wurde und an dem in einem Review später auch das Pro und Contra gut und sehr ausführlich erörtert wurde (154, 155) (Copyright permission APS). Das Detailbild rechts ist modifiziert worden und einer späteren Arbeit von R. Bowman entnommen (32).

Maack beschreibt, dass sein System von einem geübten Experimentator nach einer – wie er meint – 10 minütigen Präparation an der "wash out" Flasche angeschlossen ist. Nach dem Auswaschen wird die Rezirkulation geschlossen und die Niere hängend in den wasserbadtemperierten Oxygenator platziert. Druck und Flussrate werden visuell registriert und protokolliert. Proben können per Dreiwegehahn vor und hinter der Niere entnommen werden. Oxygenator und Reservoir bilden eine Einheit. Die originale Rezirkulationsapparatur der Arbeitsgruppe in Oxford ist im Kapitel 4 beschrieben (Abb. 4.1.6.) und hat ein gesondertes Reservoir.

Die von uns selbst genutzte Apparatur ist schematisch dargestellt. Gegenüber dem single-pass System ist ein Reservoir für das Rezirkulat, das über einem Magnetrührer gestellt wird notwendig. Die folgende Abb. 5.2.2. gibt die von uns zuletzt benutzte Variante wieder, die wasserbadummantelt ist bei einem Perfusatfüllvolumen von 150-200ml. Für den Fall, dass Erythrozyten mit einem Volumenanteil von 5-10% eingesetzt werden, muss mit einem Magnetrührer eine Entmischung verhindert werden. Das Perfusat wird mit Hilfe der Rezirkulationspumpe mit einer Flussrate von z.B. 100 ml/min (bis 200ml/min bei zellfreiem Medium) durch den Membranoxygenator gepumpt und das Aliquot für das Nierenpräparat

(20-40ml/min) wird von der eigentlichen Perfusionspumpe abgezweigt und durch ein obligates Filter zur Niere gepumpt; bei zellfreiem Perfusat 8-12 μ m, sonst gröÙerporig z.B. Polyestergeritter oder weiÙe Seide wie bei Leon L. Miller oder auch ohne Filter.

Mit dieser Apparatur ist es möglich flusskonstant oder druckkonstant zu perfundieren. Mit Vorwahl des effektiven Perfusionsdrucks, der an der Spitze der doppelläufigen Aortenkanüle kontinuierlich gemessen und analog aufgezeichnet wird, kann auch der Fluss kontinuierlich aufgezeichnet werden als Analogsignal des Tachogenerators der Perfusionspumpe 5. Die Systemstabilität ist schlechter als in der Variante mit Regenerierung des Perfusats durch Dialyse (s. hierzu auch Tabelle 10.1., S 133).

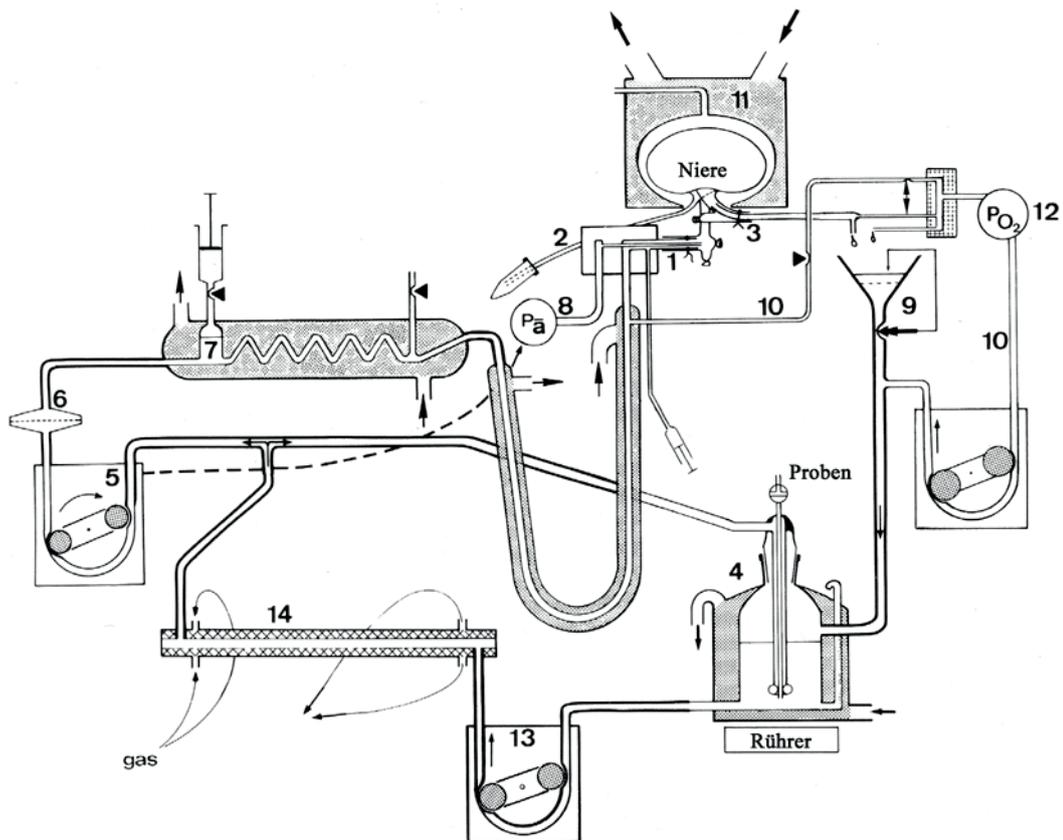


Abb. 5.2.2.: Schematisches Bild zum Aufbau der Rezirkulationseinheit (236). 1. Doppelläufige Perfusionskanüle, hier sogar mit einem dritten Anschluss (z.B. Lissamingrün-Injektion zur Bestimmung von tubulären Passagezeiten), 2. Ureterkatheter. 3. Venenkanüle, die durch die Vena cava bis in die Nierenvene hineinragt. 4. Rezirkulationsreservoir, Anschluss an einen Umlaufthermostaten. 5. Feedback gesteuerte Perfusionspumpe mit analogem Generatorsignal zur Aufzeichnung der Flussrate. 6. In-line Filter 8 μ m Porosität. 7. Windkessel, Volumen verstellbar. 8. Druckaufnehmer, heute „Einmalsystem“ mit integriertem Verstärker und Kalibriertaste (Intensivmedizin), früher Statham-Element. 9. Auffangtrichter mit ventilgesteuerter Effluatrückführung zur Schaumreduktion. 10. Ansaugleitung für die pO_2 -Elektrode, durch die alternativ der venöse pO_2 und punktuell über den arteriellen Bypass der arterielle pO_2 gemessen wird (einstellbar vorkonstringierte Bypassleitung). 11. Temperierte Nierenschale. 12. pO_2 -Elektrode im temperierten Glaskabinett. 13. Rezirkulationspumpe, Pumprate \gg als Pumpe 5. 14. Membranoxygenator (s. Abb. 4.2.8., 4.2.9.). Das System wurde 1980 publiziert (236, 258).

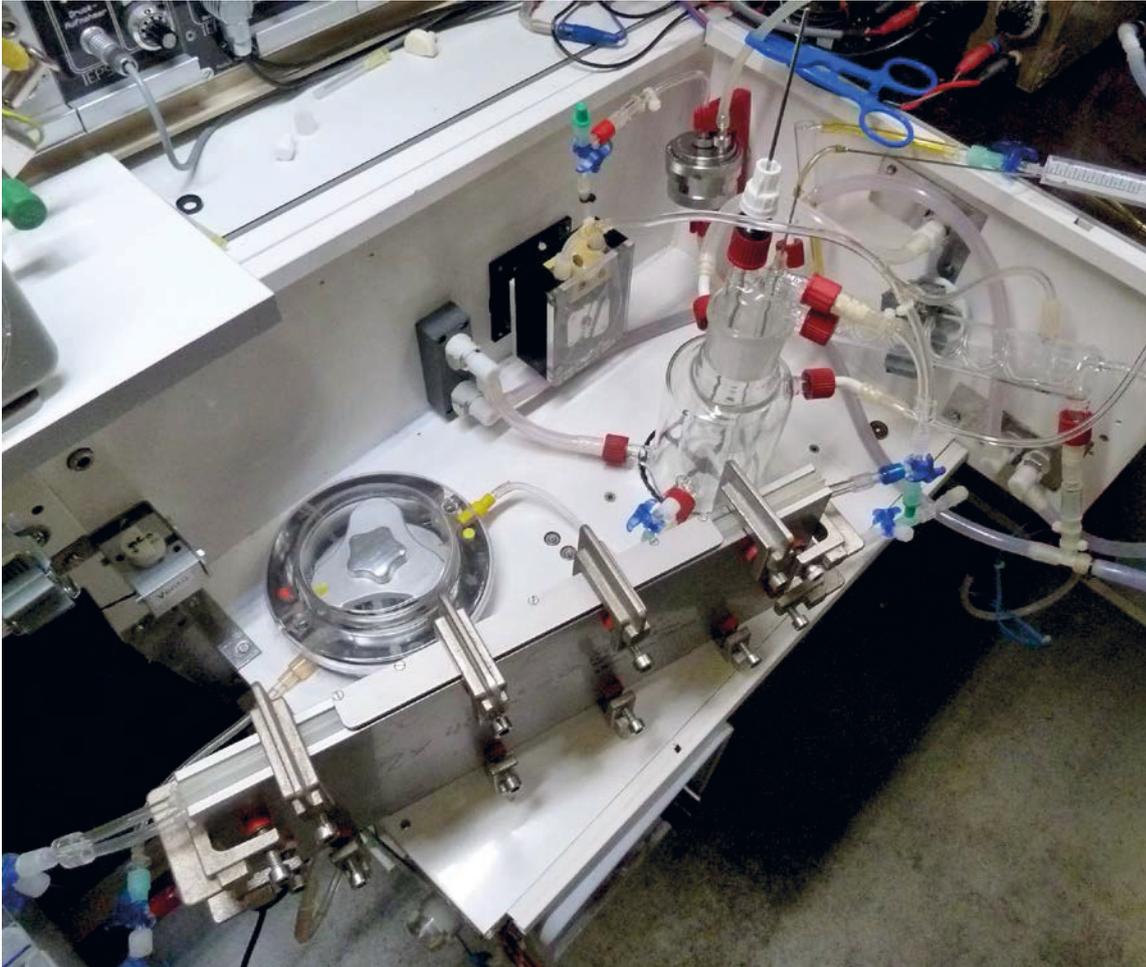


Abb. 5.2.3.: Konkretes Bild vom Aufbau der Rezirkulationseinheit mit Membranoxygenator. Vor dem Membranoxygenator ist die Rezirkulationspumpe positioniert, die den Oxygenator mit einem höheren Umlaufvolumen bedient. Die die Niere bedienende Perfusionspumpe entnimmt ein frisch äquilibriertes Aliquot. Der ummantelte Perfusatbehälter kann für den Modus 2 und auch 3 genutzt werden, mit verstellbarem Füllstandsmeßstab und Doppelglasrohr für die Rückführung des Rezirkulats, im zentralen Rohr wird das Aliquot für die Blutgasmessung zurückgeführt über ein eingestecktes Edelstahlröhrchen, das zudem Kontakt herstellt zum Perfusat für die elektronische Füllstandsregelung, die nur für die 3. Perfusionsvariante Rezirkulation mit Dialyse genutzt wird (s.a. folgende Abb. 5.3.2).

5.3. Rezirkulationsmodus mit Dialysator zur Begasung & Regeneration des Perfusats

In diesem Modus wird neben einem low-flux Dialysator (z.B. Polysulfon F4/FX5 von FMC) eine Regelung notwendig um die Ultrafiltration des Dialysators auszugleichen, wobei diese auch dazu genutzt werden kann, die Albuminkonzentration anzuheben oder mit Dialysat zu verdünnen. Die einfachste Methode ist eine im Reservoirtopf in der Höhe einstellbare Eintauchelektrode mit einer Gegenelektrode im Reservoir oder in der Ausleitung des Perfusats. Mit einem Schaltmodul wird ein Schlauchventil (normal closed) geöffnet, sobald der Perfusatspiegel unter die Eintauchelektrode absinkt. Damit strömt

Dialysat* ins Perfusat bis der Perfusat Spiegel die Elektrode wieder benetzt. Das gilt auch für potentiellen Schaum, der bei BSA zwar nicht komplett vermieden werden kann, aber die beste Vorbeugung ist es, den Dialysator „richtig zu füllen“, mit sehr niedrigen Flussraten bei abgeklemmter Perfusatseite zuerst von der Dialysatseite, dann in Gegenstromrichtung von der Perfusatseite, jeweils Ausfluss oben (d.h. einmal drehen zwischendurch). Abb. 5.3.1. gibt eine schematische Abbildung der Anordnung wieder.

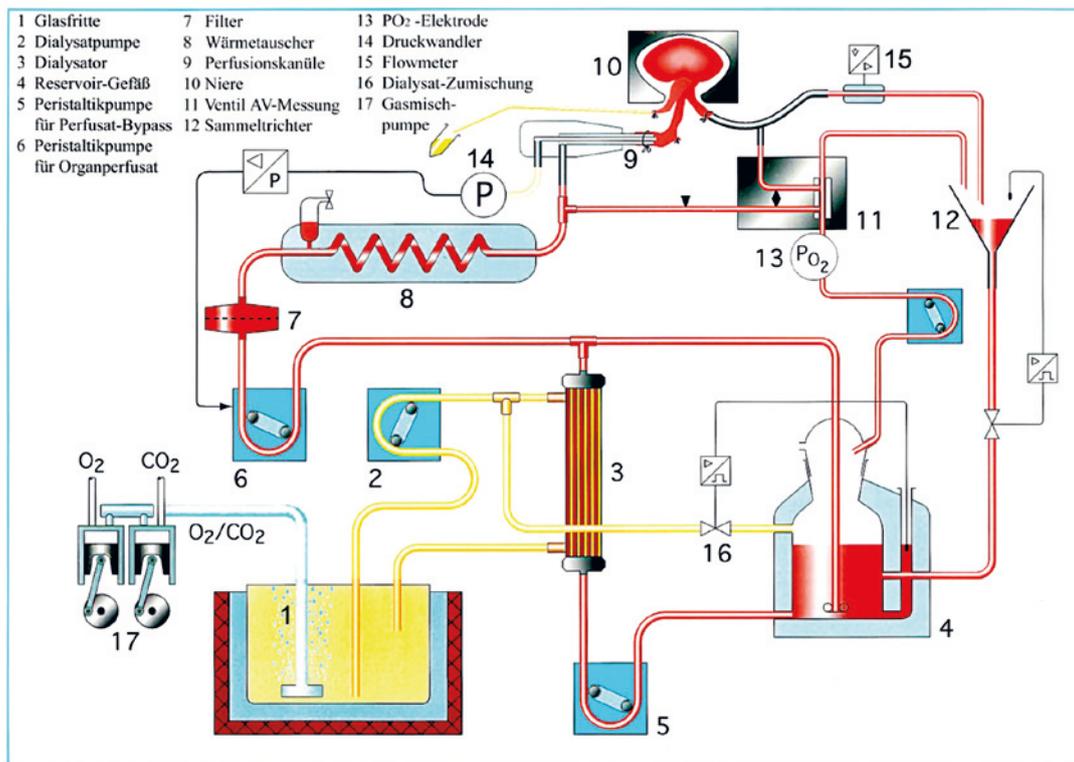


Abb. 5.3.1.: Rezirkulationsmodus mit Dialysator als Oxygenator und zur Regeneration des kolloidhaltigen Perfusats (v.a. BSA) schematisch. 1 Reservoir für Dialysat (5 Liter, s.a. Abb. 5.1.1.0.) Pumpenschlauch 2 und 5 können von einem Pumpenkopf betrieben werden. Elektronische Regeleinrichtung für Pumpe 6 über Analogsignal vom Druckaufnehmer 14, Nachführung von Dialysat über Schlauchventil 16 zum Ausgleich der Ultrafiltration (nicht dargestellt ist die Gegenelektrode im Reservoirtopf). Die Rückführung des Effluats über den Auffangtrichter 12 kann per Schwerkraft über einen weitlumigen Schlauch erfolgen. Besser ist es, das venöse Effluent ventilgesteuert zurückzuführen zur Schaumreduktion (vermeidet Denaturierung von Albumin), wie im Schema angedeutet, aber gegebenenfalls entbehrlich. Das System wurde 1978 zuerst publiziert (235, 236, 240, 241). Die obige Abbildung wurde von meinem Mitarbeiter Jörg-Dieter Biela erstellt (unveröffentlicht). An Stelle der Schlauchpumpe 2 wurde in den ersten Jahren eine Zentrifugalpumpe (Eheim Aquarienpumpe Typ 1022) zum Antrieb des Dialysats genutzt (Fluss ca. 360ml/min) mit leicht zu reinigendem und austauschbarem magnetisch gekoppeltem Rotor (241).

*Das Dialysat zum Volumenausgleich wird hinter der Pumpe und vor dem Dialysator entnommen im positiven Druckbereich, der auf dem Magnetschlauchventil [16] lasten muss, dazu muss gegebenenfalls direkt vor dem Dialysateingang eine Schlauchklemme zur Druckerhöhung gesetzt werden.



Abb. 5.3.2.: Doppelwand-Perfusatbehälter mit Rührmagnet, mit verstellbarem Füllstandsmeßstab und Doppelglasrohr für das Rezirkulat (Detail rechts), im zentralen Rohr wird das Aliquot für die Blutgasmessung zurückgeführt über ein eingestecktes Edeltahlröhrchen, das zudem Kontakt herstellt zum Perfusat für die elektronische Füllstandsregelung, die für die Perfusionsvariante Rezirkulation mit Dialyse genutzt wird (s.a. Abb. 5.2.3, dort ist das Röhrchen eingesteckt).

5.4. Reperfusion nach anatomischer Fixation

Das Verfahren ist durch Zufall entstanden, als bei der Fixierung aus dem Ureterkatheter Fixativ abgetropft ist. Die aufwendige Mikropunktion vor Augen und die erhaltenen Ladungsverhältnisse, die ja auch nach anatomischer Fixierung erhalten bleiben, entstand die Idee zu diesem experimentellen Modell. Die Fixierungs- und Reperfusionstechnik wurde ausführlich in drei Dissertationsarbeiten und mehreren Publikationen beschrieben (48-51, 74, 256, 305). Die folgenden Abb. zeigen den Aufbau zur Fixierung, zur Lagerung der fixierten Nieren samt Perfusionskanüle, Ureterkatheter und Druckmessleitung sowie die Anordnung zur normothermen Reperfusion.

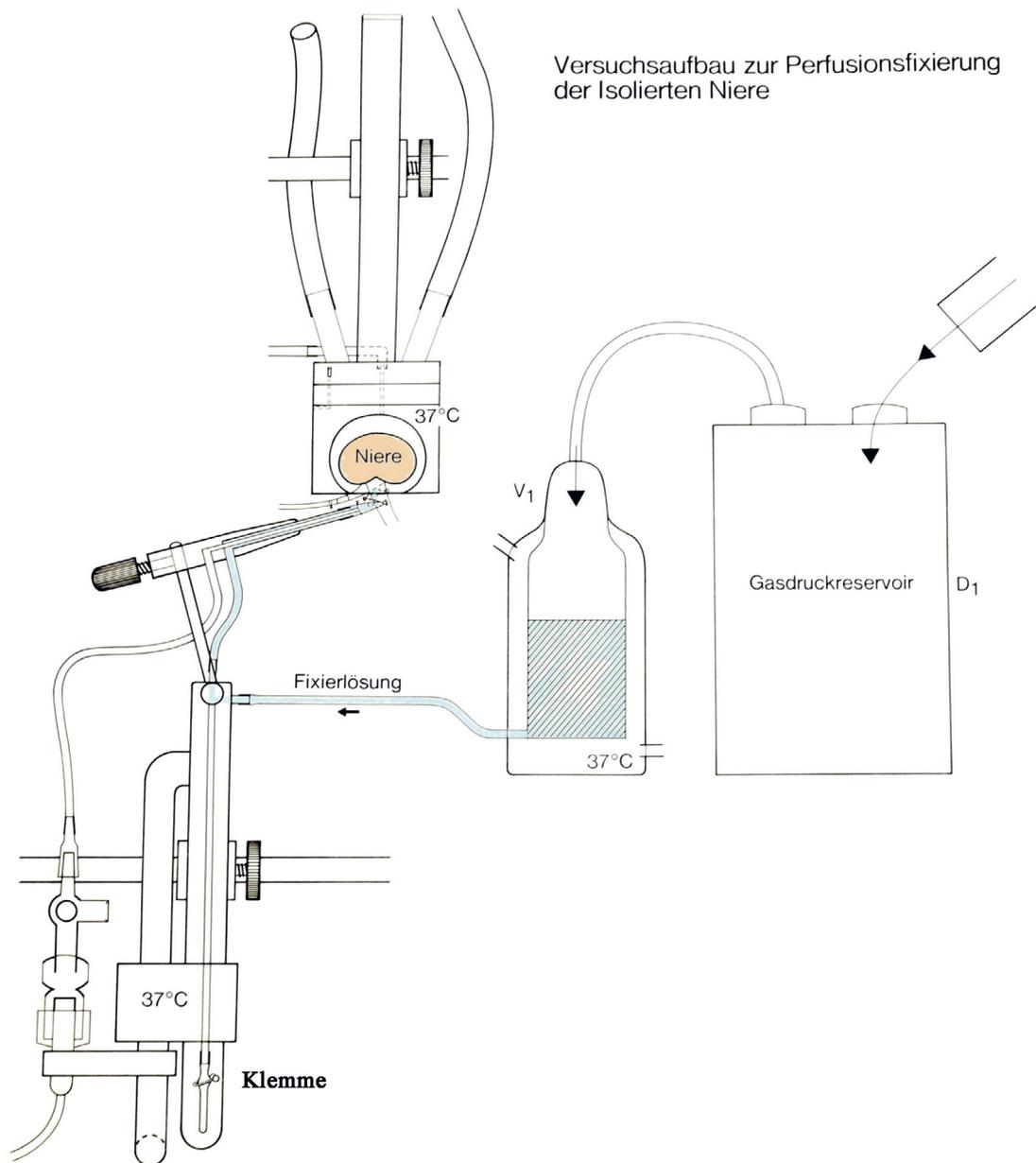


Abb. 5.4.1.: Ensemble zur Perfusionsfixierung. Die anatomische Fixierung kann über den arteriellen Bypass nach Ausklemmen der Perfusatzufuhr erfolgen. Bewährt hat sich zur Fixierung ein Perfusionsdruck von 150 Torr (mmHg), eine 1,25 % monomere Glutaraldehydlösung (Ampullen unter Edelgas-Schutzatmosphäre), phosphatgepuffert mit Kolloidzusatz (z.B. HAES 6g%, 0,9%NaCl) wenn eine Reperfusion geplant ist. Zudem ist ein Zusatz von Verapamil kurz vor Fixierungsbeginn wichtig für ausreichend hohe Filtrationsraten. Das System wurde Mitte der achtziger Jahre entwickelt, aber erst 1990 und in der Folge publiziert (48, 51, 74, 305). Mehr Details im Kapitel 10.4.

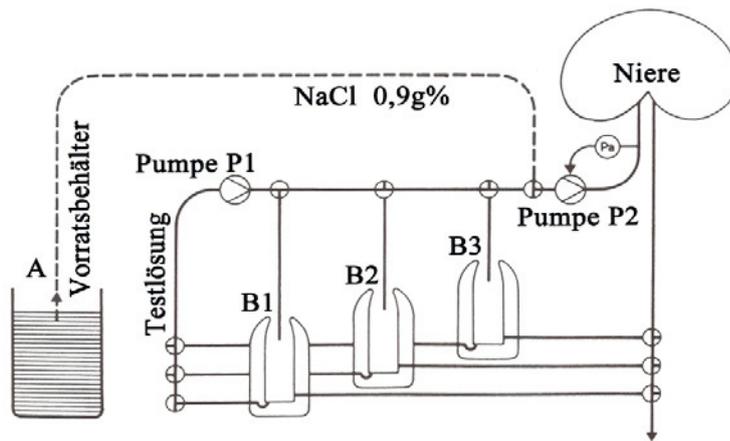


Abb. 5.4.2.: Schematischer Aufbau der Reperfuionsapparatur.

Die fixierten Nieren werden bis zum Termin bei 4°C im Kühlschrank in einer Aufbewahrungsbox mit Perfusionskanüle und Druckmessanschluss gelagert s.a. Abb. 5.4.4. Zum Versuch werden sie zunächst mit 37°C warmer 0,9% NaCl-Lösung von Fixativresten druckkonstant freigespült bei 100mmHg. Danach kommt es zum Einsatz der Testlösung zur Analyse der glomerulären Permeabilität für Makromoleküle (51, 74, 256, 305).



Abb. 5.4.3: Bild einer temperierbaren 3-fach Kammer. Damit können 3 verschiedene Lösungsvarianten sequentiell als Rezirkulationsperfusion realisiert werden. Zwischen den Wecheln wird im single pass Modus Medium verworfen um eine Kontamination der Nachfolgelösung zu vermeiden. Die beiden Anschlüsse oben sind Wasserbadanschlüsse. Die drei Anschlüsse unten sind den drei Kammern zugeordnet. S.a. technischer Anhang.

Das nächste Bild darunter zeigt eine aufgeklappte Aufbewahrungsbox mit Nischen für die Perfusionskanüle, die Niere, den Ureterkatheter und für den Dreiwegehahn der Druckmessleitung.



Abb. 5.4.4.: Aufbewahrungsboxen (cool box) für die fixierte Niere mit Perfusionskanüle, links offen, rechts geschlossen, Anschlussschlauch für die Druckmessung. Die Kammer wird mit angeschlossener und fixierter Niere (in Fixativ inkubiert) mit Tesafilm verschlossen und bei 4°C aufbewahrt bis zum Einsatz Tage oder Wochen später.

6. Sterilisations- und Desinfektionsverfahren

Alle Komponenten der Perfusionsapparatur, die mit Perfusat in Berührung kommen müssen gespült und desinfiziert bzw. sterilisiert werden. Frühe Erfahrungen haben uns gezeigt, dass man hier nur sehr bedingt Kompromisse eingehen sollte. Auch bei der Herstellung der Perfusionslösung bzw. des Dialysats sind Regeln der Hygiene und die Sterilfiltration durch 0,2µm Filter unmittelbar nach der Lösungszubereitung erforderlich. Das schließt die Verwendung von inline Filtern nicht aus, die den Zweck haben bei der Präparation anfallende Partikel vor dem Eintrag in das „Rezirkulationsmedium“ zu verhindern. Auf inline Filtration haben wir selbst im single pass Modus nicht verzichtet. Ausnahme ist der Erythrozytenzusatz, dabei sind keine oder großporigere Filter angemessen. Endre hat in Oxford zwei verschiedene Filtertypen bei Erythrozytenzusatz benutzt von Pall und einen Transfusionsfilter von Fenwall (20-40µm) (66), Leon L. Miller hat weiße Seide mit 100-150 Maschen/Zoll (2,54cm) eingesetzt (165). Retrospektiv haben wir die stabilsten Präparationen in Hannover gesehen, als wir das gesamte Schlauchsystem steril verpackt nach Äthylenoxyd Begasung nach entsprechender Lagerungszeit (zum Ausdunsten) eingesetzt haben.

6.1. Desinfektionsbad

Für Schlauch und Kunststoffteile wie Drei-Vierwegehähne nutzen wir am Versuchsende nach Spülung mit Stadt-/Brunnenwasser oder entionisiertem Wasser ein Desinfektionsbad (10-30 Liter Füllvolumen, Bode Chemie, Hamburg). Erfahrungen bestehen mit Natriumhypochlorid (Milton®) und Clearsurf® (quarternäre Ammonium-Verbindungen von FMC (Fresenius Medical Care)). Das Kunststoffmaterial wird über Nacht eingelegt und am Folgetag mit entionisiertem Wasser freigespült und im Trockenschrank bei 52°C getrocknet. Längere Schläuche müssen gegebenenfalls mit filtrierter Pressluft ausgeblasen und nachgetrocknet werden. Günstig ist es, wenn das Labor über ein eigenes Umkehrosmodul verfügt und einen nachfüllbaren Vorrat an entionisiertem Wasser (z.B. 20 Liter) speichern kann.

6.2. Thermische Desinfektion

Glas- und Metallteile können ebenfalls ins Desinfektionsbad eingelegt werden oder sie werden nach Versuchsende besser gleich reichlich gespült und bei 132°C trocken (>30min) hitzebehandelt, damit sind auch Kunststoffschraubkappen von Glasanschlüssen behandelbar. Um Rückstände durch Kontamination aus den Wasserbädern zu vermeiden sind kommerzielle Additive obligat. Mit 50% Zitronensäure kann man Trübungen in Glasteilen reinigen, in hartnäckigen Fällen hilft ein Chromschwefelsäurebad (beim Glasbläser).

6.3. Gassterilisation

Als Gassterilisation mit Äthylenoxyd in Hannover (Medizinische Hochschule) noch möglich war, haben wir Schlauchsets in Papier/Folien eingeschweißt und bis zur Wiederverwendung gelagert. Mit dem von Kliniken heute benutzten Sterilisationsverfahren mit physikalischem Plasma ist das in der damals gehandhabten Form nicht mehr gut möglich.

6.4. Zur Sterilität des Perfusats

Die Abb. 6.1.1. und 6.1.2. geben wieder, was uns in Berlin bei konventionellem Herstellungsverfahren (wie das damals in der Physiologie so gemacht wurde) des Perfusats wiederfahren ist und was die Verwendung einer sterilen Perfusionslösung demgegenüber an Stabilität gebracht hat. Die Haemaccel-Perfusionslösung wurde zunächst erst am Versuchstag aus Trockenpulver hergestellt und mit Elektrolyt-Stammlösungen und Substraten gemischt. Die Verbesserung ergab sich bei diesen single-pass Experimenten erst, nachdem eine fertige Haemaccel-Stammlösung filtriert und autoklaviert worden war, die dann mit sterilen Elektrolytkonzentraten und Substraten versehen und nochmal unmittelbar vor der Verwendung durch ein Filter mit 0,2µm Ausschlußgrenze sterilfiltriert worden war (247). Bei Perfusionen mit hoher Albuminkonzentration im Rezirkulationsmodus läßt sich manches überspielen bei extrem hohen Flussraten.

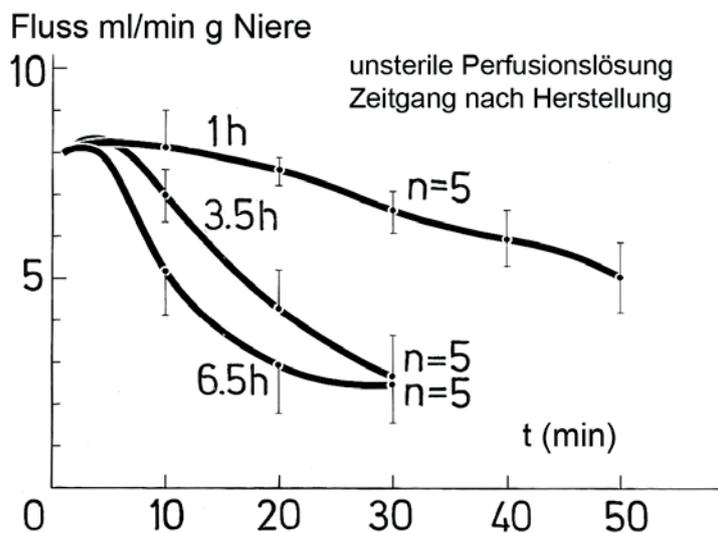


Abb. 6.1.1.: Zeitverlauf der Perfusionsrate bei single pass Perfusion mit Haemaccel als Kolloid.

Die ersten Perfusionen wurden 1 Stunde nach Präparation der Lösung begonnen, dann nach im Mittel 3½h und 6½h. Die Perfusionen erfolgten druckkonstant bei 100 mmHg (247).

Facit: Die zeitabhängige Widerstandserhöhung entspricht dem Grad der bakteriellen Kontamination.

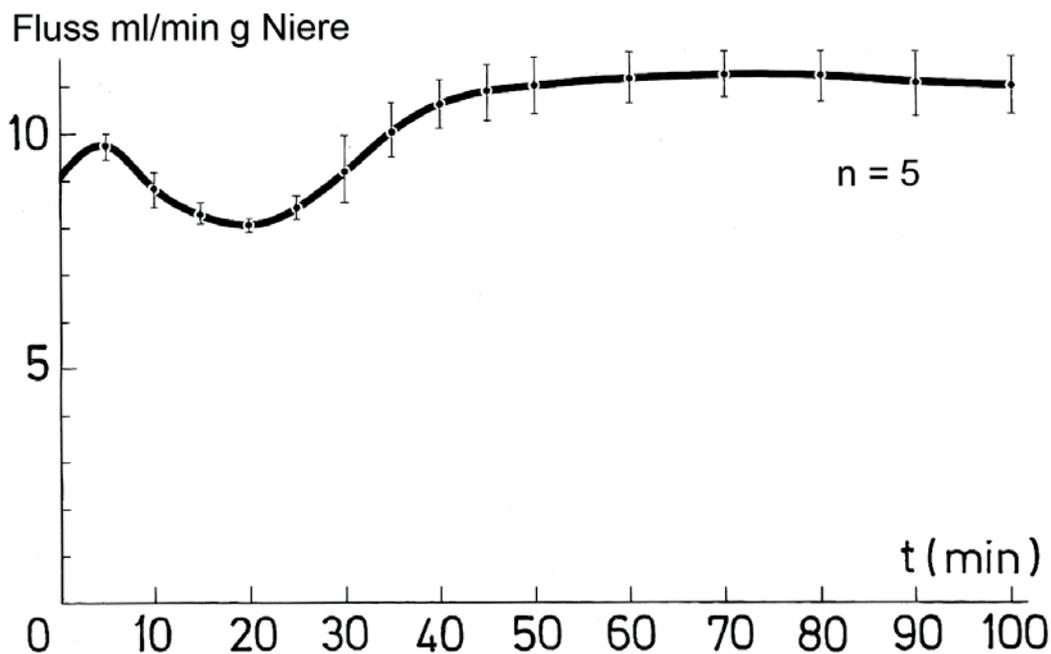


Abb. 6.1.2.: Perfusionsrate nach Umstellung auf sterile Haemaccel-Lösung (247). Rigorose Desinfektion oder Sterilisation der Perfusionsleitungen; die initiale Flußsenke bei 20min geht wahrscheinlich darauf zurück, dass niedermolekulare Fraktionen des Haemaccels filtriert werden und die Urin-Viskosität zu Beginn erhöhen (247), dem Zeitpunkt, zu dem das Filtrat noch niedrig und die Resorptionskapazität für Natrium noch hoch ist.

Eine Viskositätserhöhung in der Tubulusflüssigkeit wurde auch von H.M. Brink aus Nijmegen in Holland berichtet (41) bei Verwendung von Pluronic F108 als Kolloid.

7. Narkoseverfahren

Die am häufigsten verwendete Narkose bei der Ratte ist die Barbituratnarkose mit Inactin® 80-150mg/kg KG i.p. (5-ethyl-5 (1'-methylpropyl)-2-thiobarbituric acid) oder eine Mischung aus Xylacin (2%) und Ketamin (10%) im Verhältnis 1:40. Auch Thiopental (Trapanal®) wird eingesetzt. In Narkose kommt es leicht zur Hypothermie. Lagerung auf einem beheizten Tisch (>40°C) und rektale Temperaturkontrolle sind essentiell.

Barbituratnarkose induziert auch eine leichte Hypoxie, was an einer Stimulation der Erythropoietinsynthese abgelesen werden kann (230). Erst die aktive Beatmung mit 25% O₂ durch einen Kleintierrespirator war in der Lage, die Stimulation der EPO-Synthese noch während der Operation zu verhindern (231). Ein weiterer Gesichtspunkt ist, dass in vivo unter dem Einfluss der Barbituratnarkose Oszillationsphänomene in der Funktion des Nephrons verschwinden, die aber z.B. bei einer leichten Halothannarkose nachweisbar sind (136, 249). Diese Narkoseform (Halothan und Nachfolgesubstanzen) ist aufwendiger aber besser steuerbar und für die Nierenfunktion günstiger (113). Es ist spekulativ abzuschätzen wieviele physiologische Untersuchungen an Kleinsäufern in Hypothermie und/oder Hypoxie erfolgt sind. Die Narkose mit Inactin ist für den „Beginner“ einfacher zu handhaben, da die Substanz sich in die Fettspeicher verteilt und daraus rekrutiert werden kann, demgegenüber muß bei der Kombination Xylacin/Ketamin oft nachdosiert werden (Eintropfen ins Peritoneum). Inactin ist bei Sigma erhältlich, es war früher auch klinisch im Einsatz in Form von Trockenampullen.

Aufwendiger ist eine Narkose mit Narkosegas wie Halothan und Nachfolgern, hat aber den Vorteil einer besseren Oxygenierung (113, 136) und der besseren Nierenfunktion. Unter diesen Bedingungen sind Oszillationsphänomene der Nephronfunktion beschrieben worden, die unter einer Barbiturat-Narkose unterdrückt sind (111, 136, 249).

8. Operationstechnik und Anschlußverfahren

8.1. Auswahl des Operationsbestecks

Hier wird es individuell einige Unterschiede geben je nach Fixierungs- und OP-Technik. In der folgenden Abb. ist das von uns derzeit genutzte OP-Besteck dargestellt. Die mit Wasserbad temperierten OP-Tisch Einsätze haben seitliche Korkstreifen. Dort können Bauchwandhaken eingestochen werden.

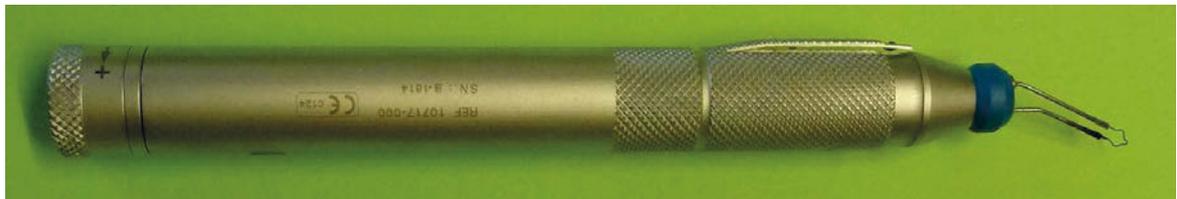


Abb. 8.1.1.1.: Standard OP-Besteck und elektrischer Kauter. Oberer Bildteil: links auf dem Korkring angeordnet Bauchwandhaken, aus nichtrostendem Stahldraht selbst gefertigt mit zwei zusätzlichen Leberhaken. Oben Sugi-Saugtupfer und Wattestäbchen zur atraumatischen Präparation. Rechts verschiedene Pinzetten, u.a. sogenannte Uhrmacherpinzetten (drittes Paar von rechts). Ganz rechts außen zwei verschiedenen große Dechamps-Unterbindungsnadeln (mit Öse zum Fadendurchzug). Von den Scheren ist die kleine Federschere in der Mitte der zu „hütende Augapfel“, sie ist zum Einschnitt des Ureters wie für die Art. mesenterica bzw. Aorta für die Intubation der Katheter essentiell. Rechts daneben eine kleine Gefäßklemme für die Aorta und eine von Martin Wensing in der Forschungswerkstatt Münster gebaute Fixierklemme, die ein Herausrutschen der Aortenkanüle verhindern kann, wenn die Einbindeligatur aus Platzgründen z.B. erst nach Perfusionsbeginn festgezogen werden kann. Unten ein kleiner Hand-Elektrokauter von Erbe Elektromedizin GmbH, Tübingen, BRD.

8.2. Operationstechnik und Anschlussverfahren

Nach Einleitung der Narkose wird das ventral rasierte Tier auf einem temperierten OP-Tisch oder Mikropunktionstisch aufgelegt. Um die Körpertemperatur bei 37°C aufrechtzuerhalten (Messung mit rektaler Sonde notwendig) muss der Tischeinsatz bei ca. 42-43°C vorgeheizt sein, bei offener Bauchhöhle kann zusätzlich ein temperiertes Mäanderkissen im Thorax Bereich aufgelegt werden um eine Körpertemperatur von 36-37°C zu gewährleisten, weil die Temperatur in Narkose sehr schnell unter 35°C absinken kann, s.a. elektrisch beheizte OP-Tische, Feedback reguliert. Wir haben die OP-Technik von Weiss (295) und Bahlmann (12) modifiziert (241, 243). Man kann initial die Vena jugularis mit einem PE10 Schlauch intubieren um Flüssigkeitsverluste auszugleichen und Heparin zu injizieren. Alternativ kann Heparin vor Anschluss an die Perfusionsapparatur auch mit dünner Nadel in einen Leberlappen injiziert werden. Nach Medianschnitt mit einer Schere entlang der linea alba vom Xiphoid bis zur Symphyse wird das Magendarmkonvolut in einer feuchten Kompresse nach links eventriert und der Bauchsitus mit vier Bauchwandhaken übersichtlich aufgespannt (z.B. eingestochen in zwei seitliche Korkplatten). Zur besseren Übersicht kann die rechte Bauchwand unterhalb des Rippenbogens quer eingeschnitten werden, nachdem man die Arteria epigastrica von der Bauchinnenwand aus thermisch koaguliert hat.

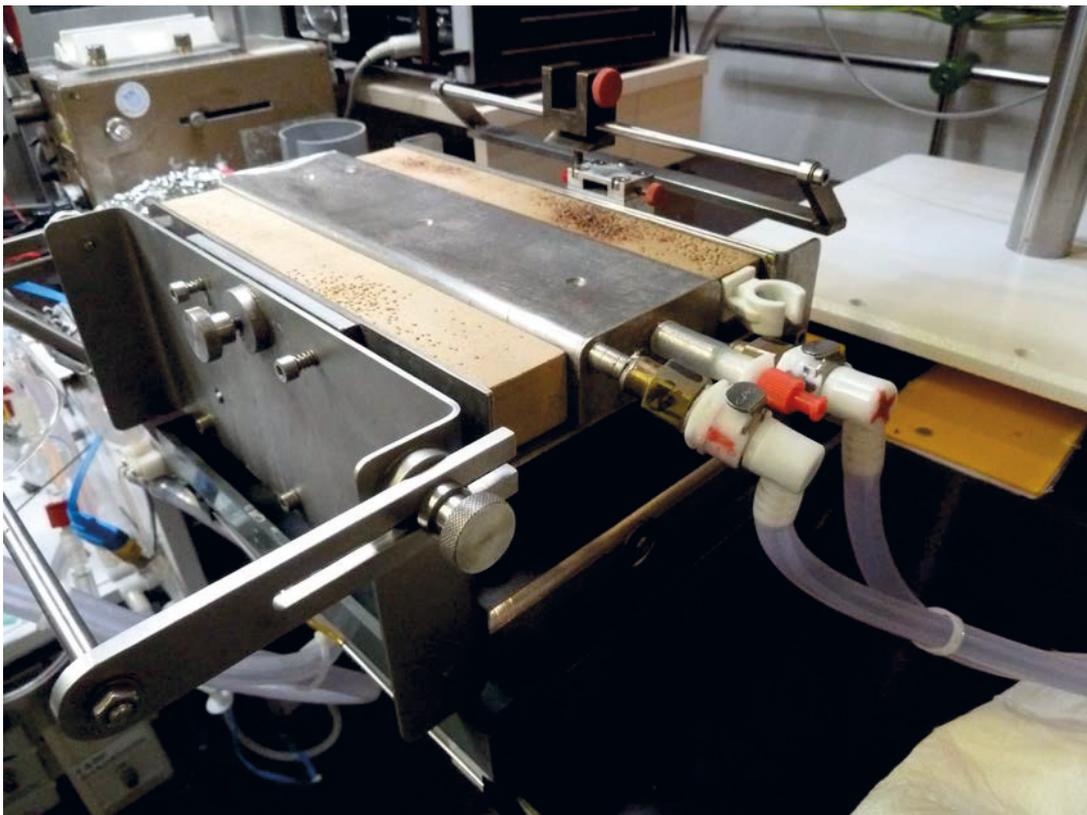


Abb. 8.1.1.2.: Kleintier OP-Tisch, schwere Ausführung für Mikropunktionsexperimente, ein mit Wasserbad temperierter OP-Tischeinsatz, der per Scherenmechanismus abgesenkt und herausgezogen werden kann (s.a. Abb. 5.1.2.0). Durch den mobilen Tischeinsatz kann die operative Vorbereitung auch an einem zweiten OP-Tisch begonnen werden, währenddessen der Perfusions-Versuchsstand vorbereitet wird. Zu den Kupplungen siehe Abb. 5.1.1.8.

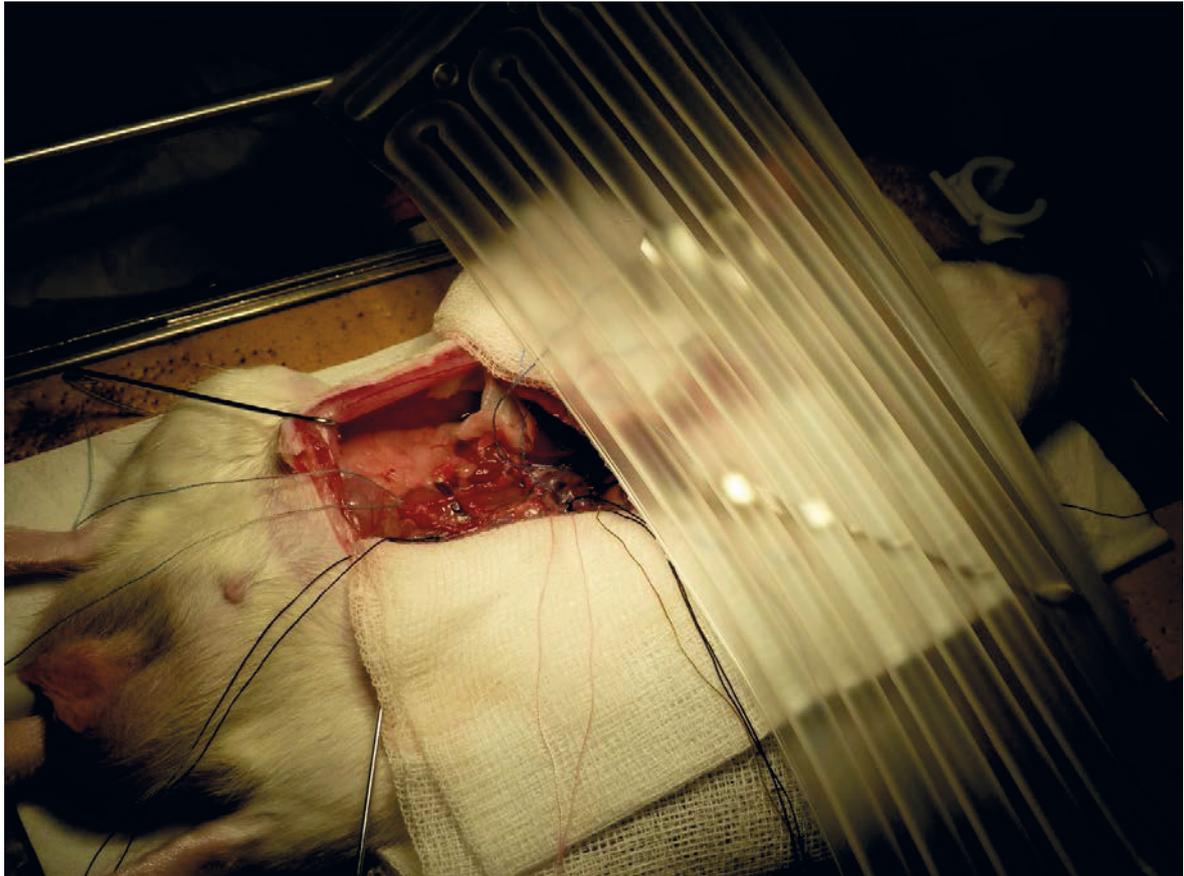


Abb. 8.1.1.3.: OP-Tisch und OP-situs. Nach links eventriertes Magen-Darmkonvolut und ein zum Ausgleich des Wärmeverlustes aufgelegtes Mäanderkissen über der Thoraxwand. Die rechte Bauchwand ist noch nicht quer aufgeschnitten.

Zur Präparation des Gefäßsitus sollte man zuerst stumpf mit Watteträgern vorgehen bevor man mit stumpfen Pinzetten weiter präpariert. Die folgende Abbildung 8.1.1.4. gibt den Gefäßsitus vereinfacht wieder. Bei der Präparation gibt es verschiedene Strategien, schnell oder schonend. Die Nebennierenarterie rechts kann man direkt abbinden. Sie entspringt meist von der rechten Nierenarterie. Die übrigen Abbindeligaturen werden zuerst nur positioniert (hierzu verwenden wir verschiedenfarbiges Polyester Nähgarn Stärke Ne 40/2), dann wird die Niere aus Ihrem Fettpolster herausgelöst, kleine Fettreste zum Anheben mit der Pinzette werden belassen, die Verbindung zur Nebenniere kann man mit den Branchen einer Pinzette ausspannen und thermisch wegkoagulieren. Dazu bringt ein flacher breiter Leberhaken mehr Übersicht. Bevor man den Ureter kanüliert, sollte man ihn aus dem umgebenden Fettgewebe lösen und die Adventitia mit kleinen Begleitgefäßen dort entfernen, wo der Einschnitt geplant ist. Man sollte Ligatur 1 schließen und den Ureter am Faden leicht anspannen (z.B. kleine Krokodilklemme) etwa in Höhe des unteren Nierenpols zur Hälfte einschneiden, das Lumen mit einer Branche einer Uhrmacherpinzette vordehnen, mit dem Kombikatheter (10mm PP10 schräg angeschnitten mit PE50 verlängert, oder Glaskatheter mit eingestecktem PE50, oder thermisch ausgezogener PE50 Katheter, s. Abb. 4.4.3.) intubieren und doppelt einbinden, bevor man ihn weit distal durchtrennt. Die Katheterspitze sollte im Ureter nicht zu nierenbeckennah und auch nicht im Nierenbecken selbst positioniert sein. Man vermeide ihn zu torquieren. Die Niere kann

dann in situ mit der Nierenschale quasi "eingeschaufelt" werden. Leichter hat man es, wenn die rechtslaterale Bauchwand quer eingeschnitten wird. Vorher sollte man die vasa epigastrica in der Bauchwand von innen koagulieren, cranial und caudal vom geplanten Schnitt. Unmittelbar vor dem Anschluss werden Art. mesenterica und die linke Nierenarterie abgebunden, nachdem ein kleiner Heparinbolus (z.B. 50µl,250U) i.v. oder in einen Leberlappen (Subkutannadel) gesetzt wurde, die Aorta distal ligiert und am Faden gespannt (z.B. mit einem Halsted-Mosquito-Klemmchen). Nach Setzen der kleinen Gefäßklemme unmittelbar distal des Abgangs der rechten Nierenarterie kann die Aorta zur Hälfte eingeschnitten werden. Unter Sicht (Aufsicht Mikroskop) Aufdehnen am Einschnitt mit den Branchen einer Uhrmacherpinzette und Intubation mit der doppelläufigen Kanüle, die zuvor entlüftet wurde. Dabei dient die gering vorstehende Innenkanüle als Pionier (auch die Innenkanüle wird über den Druckaufnehmer vorgespült). Die Kanüle wird bis zur Klemme vorgeschoben, mechanisch fixiert und eingebunden. Ist der Zwischenraum zu knapp kann man auch später einbinden, läuft aber Gefahr, dass die Kanüle aus der Aorta herausgleitet (s.a. OP-Instrumente, Fixierklemme nach Martin Wensing, Forschungswerkstätte am Universitäts-Klinikum in Münster).

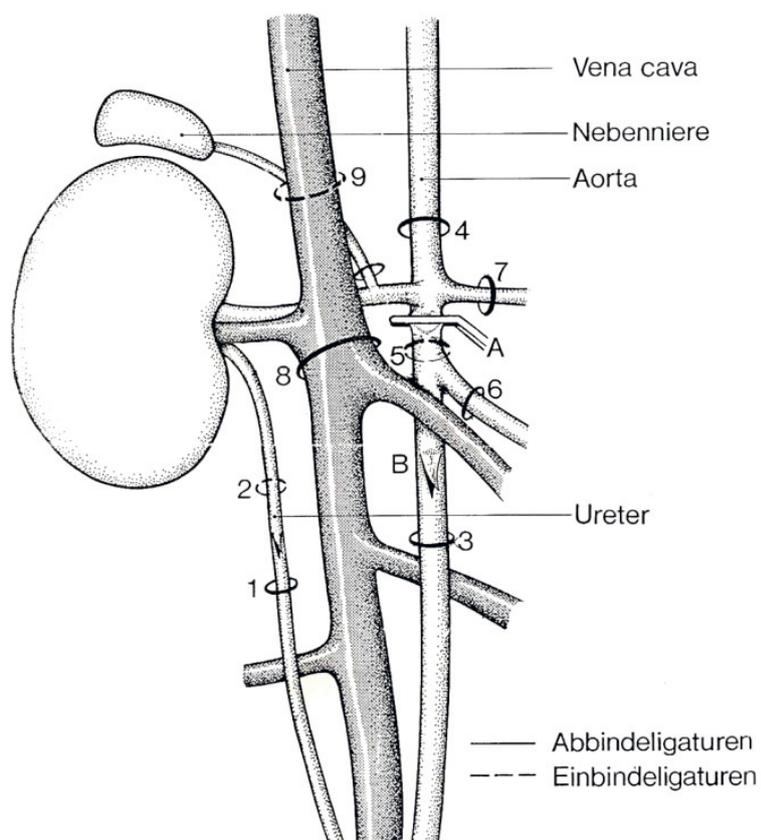


Abb. 8.1.1.4.: Op-situs nach stumpfer Präparation, schematisch (modifiziert nach Ross (213)). Abbindelegaturen sind umlaufend gezeichnet, Einbindelegaturen sind unterbrochen. Dieser Situs entspricht unserem Vorgehen zur Kanülierung der distalen Aorta mit einer doppelläufigen Kanüle. Bei dem Vorgehen von Weiss, Bahlmann und Nishihitsutsuji-Uwo wird die Nierenarterie via Art. mesenterica intubiert, was größere Tiere (>300g) und eine "ideale" Anatomie voraussetzt (12, 176, 295). Der Anschnitt des Ureters liegt in praxi näher zum Nierenbecken als es die schematische Zeichnung wiedergibt. Dennoch soll die Katheterspitze nicht im Nierenbecken zu liegen kommen wegen einer Einblutungsgefahr.

Die nächsten Schritte sind: Anschluss des Absaugröhrchens an eine Saugleitung (Absaugpumpe mit Zwischengefäß oder Wasserstrahlpumpe), Abbinden der proximalen Aortenligatur, Lösen der Klemme und Start der Perfusion zuerst flusskonstant mit z.B. 8-10ml/min. Durchtrennen von Aorta (incl. begleitendem Sympaticus bds.) und Vena Cava direkt unterhalb der Leber, Start der aktiven Absaugung des Blutes von der Nierenschale aus. Damit kein Fett das Absaugröhrchen verschließt, stecken wir ein Stück breiten Silikonhalbschlauch darunter. Absenken des OP-Tischeinsatzes mitsamt dem Tier mit Hilfe eines Scheren-Liftmechanismus und dabei werden die restlichen Verbindungen getrennt, bis Nierenschale und Perfusionspistole frei sind. Der OP-Tischeinsatz wird herausgezogen, das Nierenpräparat mit warmer Kochsalzlösung von Blutresten freigespült und der Sammeltrichter untergeschwenkt bzw. untergefahren. In diesem Moment ist die Rezirkulation geschlossen und die Perfusion kann in den druckkonstanten Modus konvertiert werden. Auf dem Sammeltrichter ist der schwenkbare Metallkatheter montiert für die Intubation der Vena cava inferior, der jetzt ohne Hektik eingeschwenkt und eingebunden werden kann. Nach distal wird die Cava-Ligatur dann verschlossen.

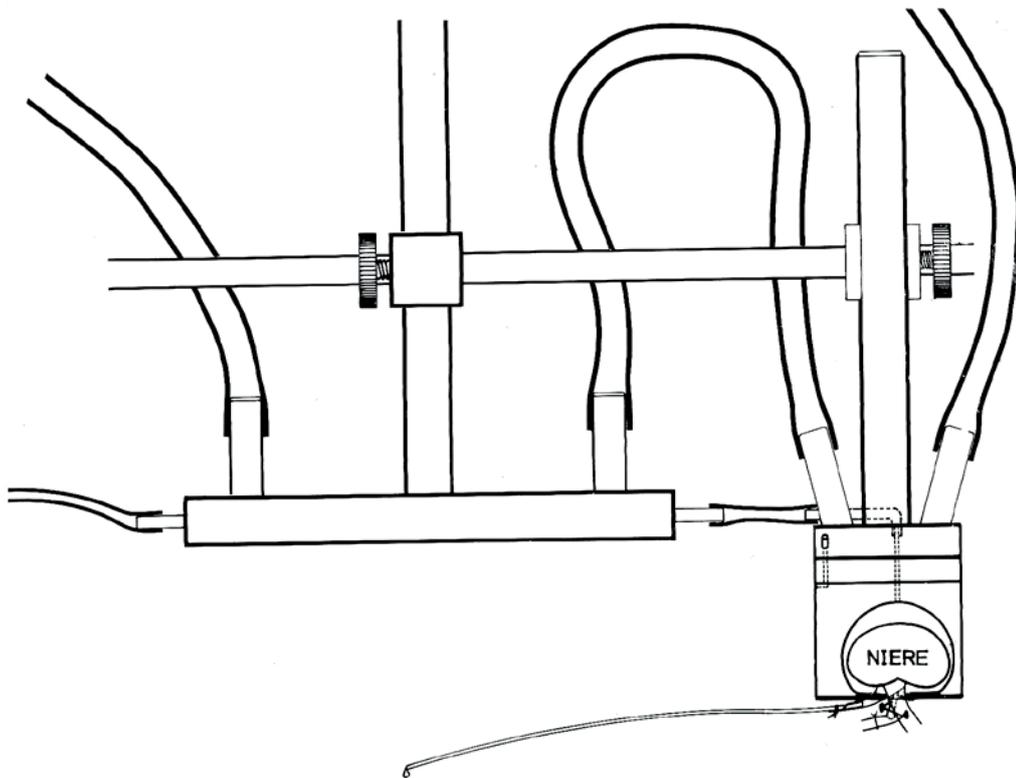


Abb. 8.1.1.5.: Einschaltung der Niere. Die Niere ist in situ in der temperierten Schale positioniert. Der Temperierblock links von der Nierenschale ist ein historisches Relikt, als im single-pass Modus perfundiert und Tubuli unter einem im besagten Block temperierten Ölfilm mikropunktiert wurden (240).

Das Phänomen der Vasokonstriktion nach Beginn der Perfusion.

Wenn die Aorta und die seitlich liegenden sympathischen Nerven nicht komplett durchtrennt sind, kann mit Einsetzen der Schnappatmung eine starke Vasokonstriktion einsetzen.

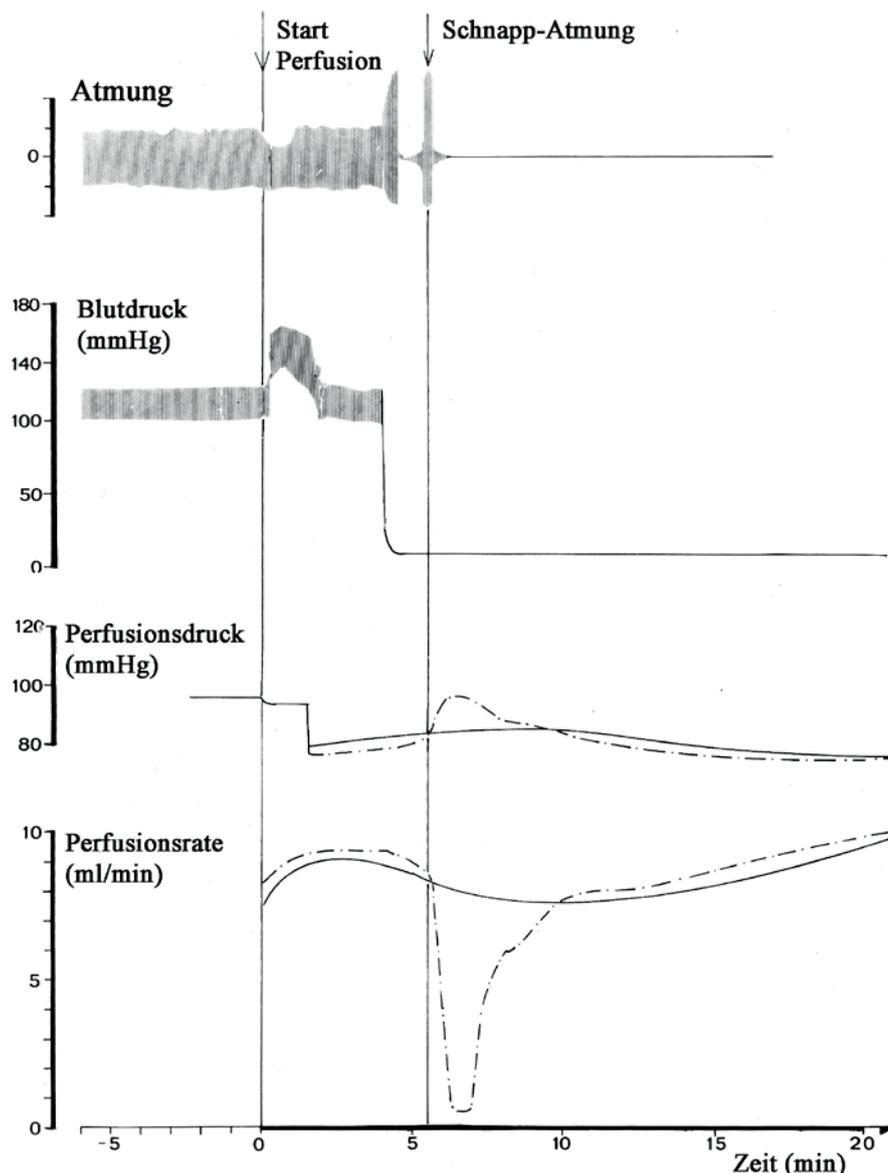


Abb. 8.1.1.6.: Historisches Protokoll (1969/1970) über die agonale, sympathikoton induzierte Vasokonstriktion in der Übergangsphase in vivo – ex vivo, single-pass Perfusion mit Haemaccel-Krebs-Henseleit Medium. Oben ist die Atmung registriert (Thermosensor in der Trachealkanüle), dann der per Art. carotis direkt gemessene Blutdruck. Danach der Perfusionsdruck bei Perfusionsantrieb über Gasdruck (Perfusionssystem Berlin s. Abb. 4.1.3.), unten die elektromagnetisch registrierte Flussrate. Mit Ligatur der Aorta und Beginn der Perfusion in situ steigt der Blutdruck und fällt die Atmungsamplitude. Mit Öffnung der Vena cava und dem proximalen Aortenschnitt Butdruckabfall, zeitverzögert mit Beginn der Schnappatmung finden sich zwei Szenarien: die unterbrochenen Linien von Perfusionsdruck und -fluss demonstriert den Verlauf, wenn beim Aortenschnitt der begleitende Nervus Sympathikus nicht mitdurchtrennt wurde, die durchgezogenen Linien zeigen den Verlauf mit parallel zur Aorta komplett durchtrenntem Sympathikus, der die Aorta beidseits begleitet. Diese Vasokonstriktion führt in der Regel zu schlechten Funktionsdaten, auch wenn die Perfusionsrate sich erholt (Institut für klinische Physiologie Klinikum Steglitz der FU-Berlin, jetzt Campus Benjamin Franklin, bisher unveröffentlicht).



Abb. 8.1.1.7.: *Aktuell eingesetzte, wasserbadtemperierte Nierenschale aus Edelstahl für die rechte Niere* mit seitlichem Absaugröhrchen. Der asymmetrische Ausschnitt vorn berücksichtigt den Ureterabgang nach caudal. Die Wasserbadanschlüsse gehen über in einen U-förmigen Verlauf der Wasserführung im Rückenblock der Schale (Details s.a. techn. Anhang), sichtbar ist auch der Scherenlift für den OP-Tischeinsatz.

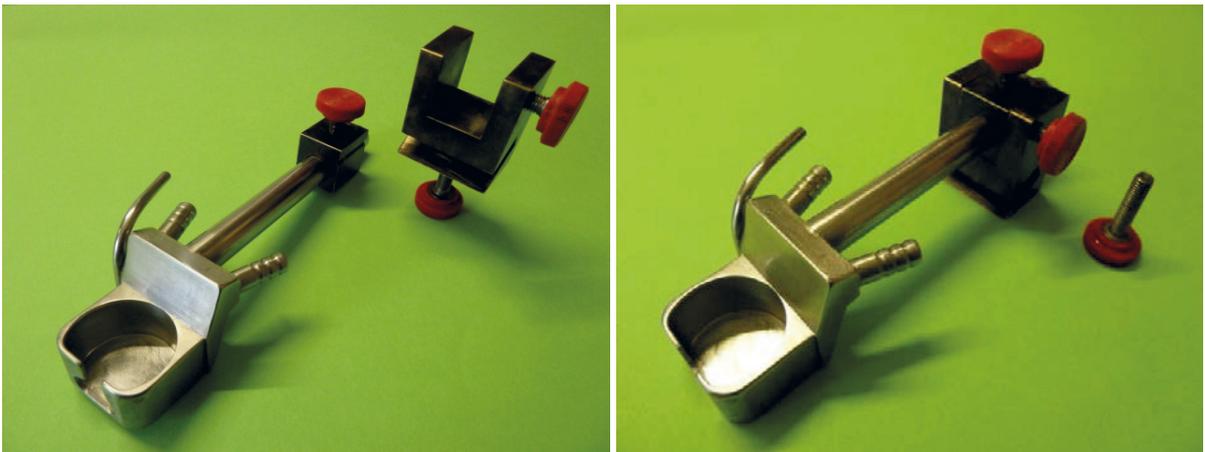


Abb. 8.1.1.8.: *Montageblock-Ensemble für die Nierenschale.* Der Montageblock für die Nierenschale hat einen Innenteil, der von oben in die Gabel eingesetzt und in seiner Schlitzrille fixiert werden kann. So kann die Niere in situ von schräg oben hiluszentriert in die Nierenschale "eingestülpt" und fixiert werden (Details s. Kapitel 15, Abb. 15.1.7. im Anhang).



Abb. 8.1.1.9.: Frontalbild der doppel-läufigen Kanüle. Im Bild ist die Innen-Kanüle der doppel-läufigen Aortenkanüle gut zu sehen, weiter unten im Bild der abgeklemmte Bypass-Schlauch für die arterielle pO_2 -Messung, im Hintergrund die Nierenschale mit Wasserbadanschlüssen, links der Absaugeschlauch an der Nierenschale. Rechts von der Nierenschale ist die rechteckige Öffnung, in die der Arm des Effluattrichters eingesetzt und fixiert wird.



Abb. 8.1.2.1.: Detailbild der doppel-läufigen Kanüle, die innere Druckmesskanüle ist deutlich zu erkennen, ebenso die umlaufende Einkerbung zur Fixierung der Einbindeligatur. Die leicht vorstehende Innenkanüle erleichtert als „Pionier“ die Intubation der angeschnittenen Aorta. Weitere Details siehe technischer Anhang.

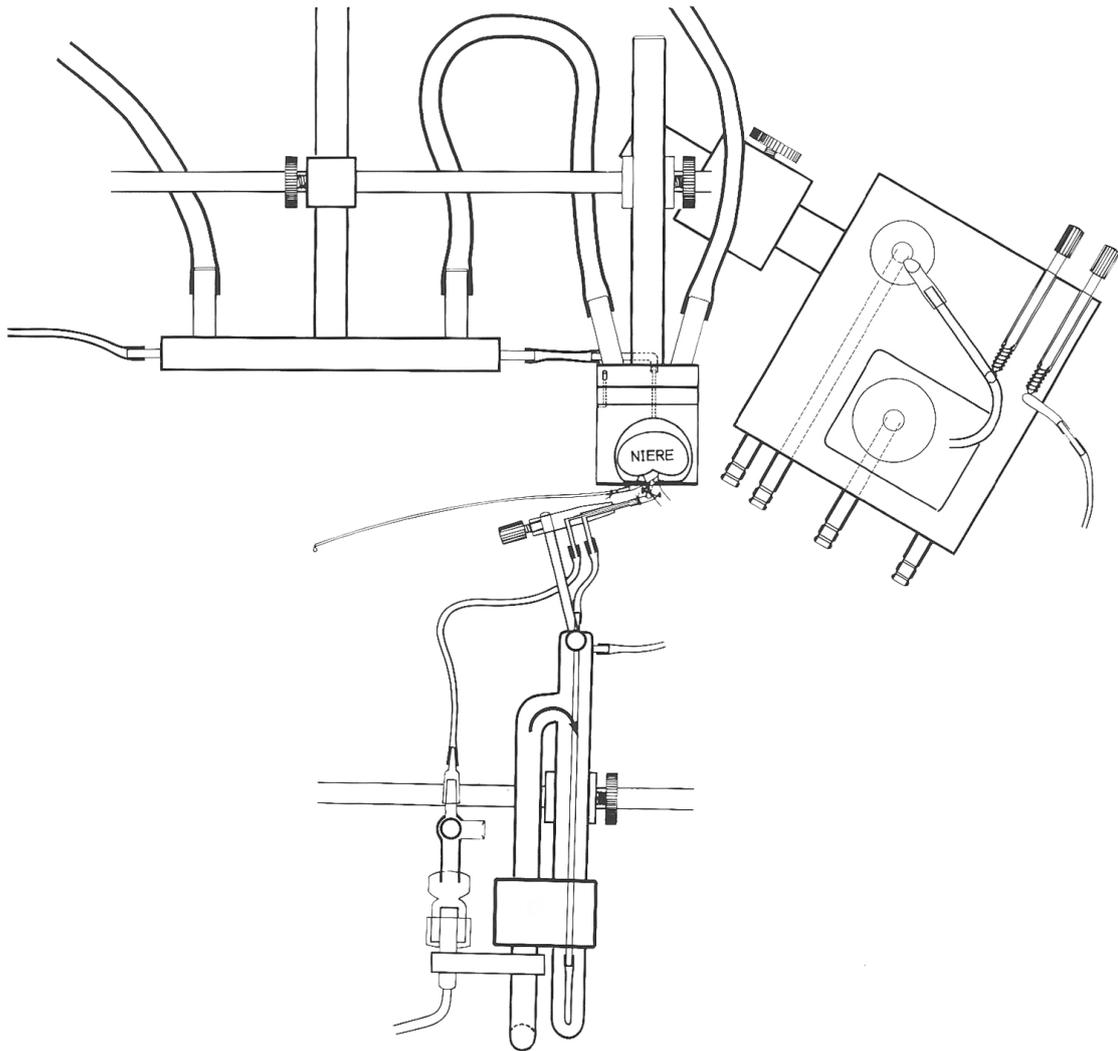


Abb. 8.1.2.2.: Phase 1 nach Start der Perfusion, schematisch: die Niere ist isoliert, der Sammeltrichter wird unter die Niere geschwenkt (240). Die Halterung ist um eine senkrechte Achse drehbar. In dieser Bauart kann das Effluat aus der Niere über den Trichter unter der Nierenschale und den Trichter für den venösen Rücklauf getrennt abgeleitet werden, bei single pass wird verworfen, bei Rezirkulation in das Reservoir rückgeführt. Durch die getrennte Ableitung kann ein potentiell Leck quantifiziert werden. Die spätere Bauart weist nur einen Trichter auf. Der Block wird nur noch seitlich verschoben und nicht mehr eingeschwenkt (241).

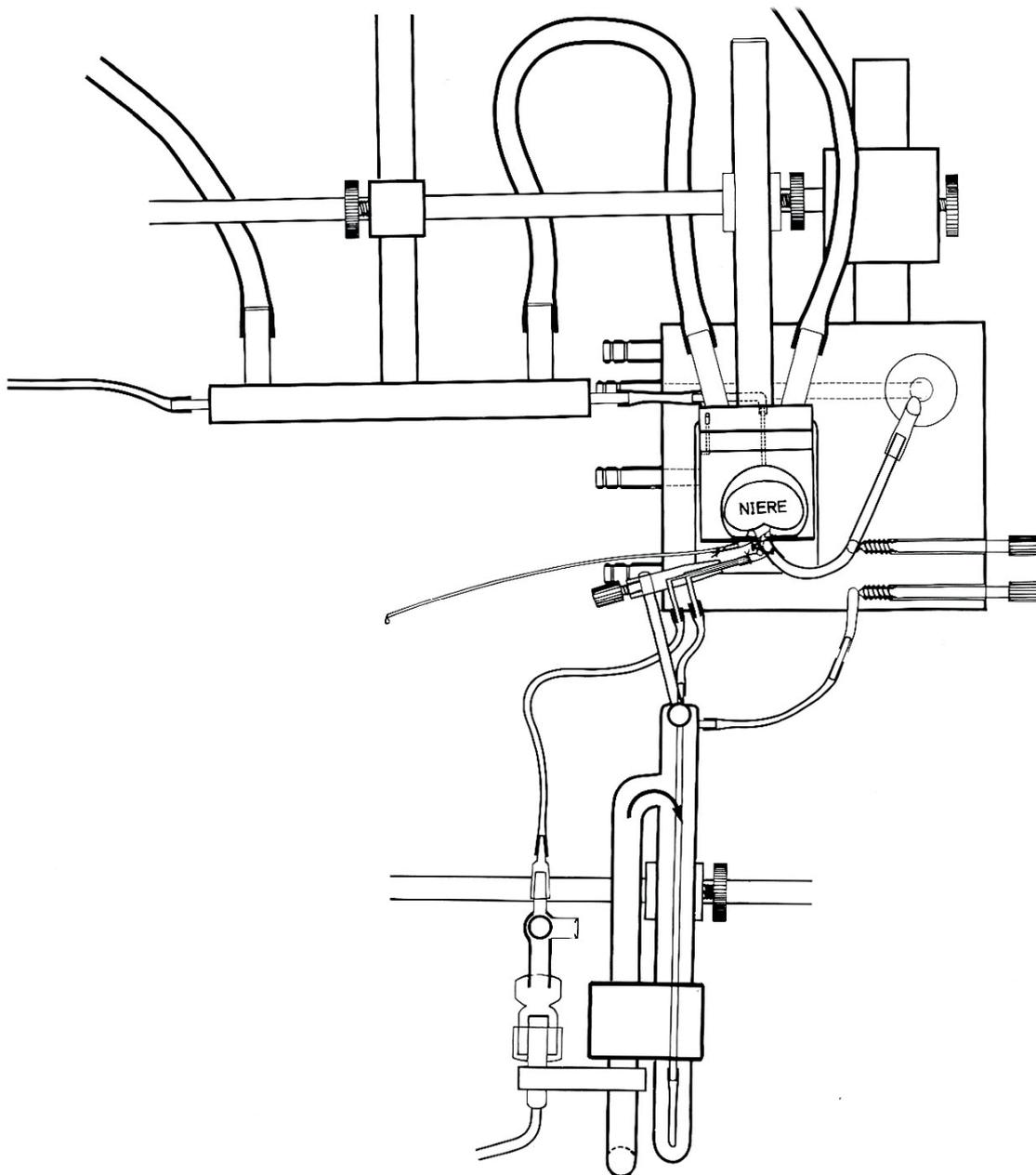


Abb. 8.1.2.3.: Phase 2 nach Start der Perfusion. Der Sammeltrichter ist mit der Venenkanüle in die Vena cava eingeschwenkt und diese ist eingebunden, der untere Abbindefaden der Cava wird geschlossen und damit drainiert das Perfusat komplett durch die Venenkanüle (240, 241). Die Fixierschraube klemmt den T-Abgang, über den ein Aliquot zur O_2 -Elektrode gepumpt werden kann bei offenem Überlauf vor der Pumpe. Der arterielle Bypass kann alternierend geöffnet werden zur Messung des arteriellen pO_2 durch dieselbe O_2 -Elektrode mit der auch venös gemessen wird.

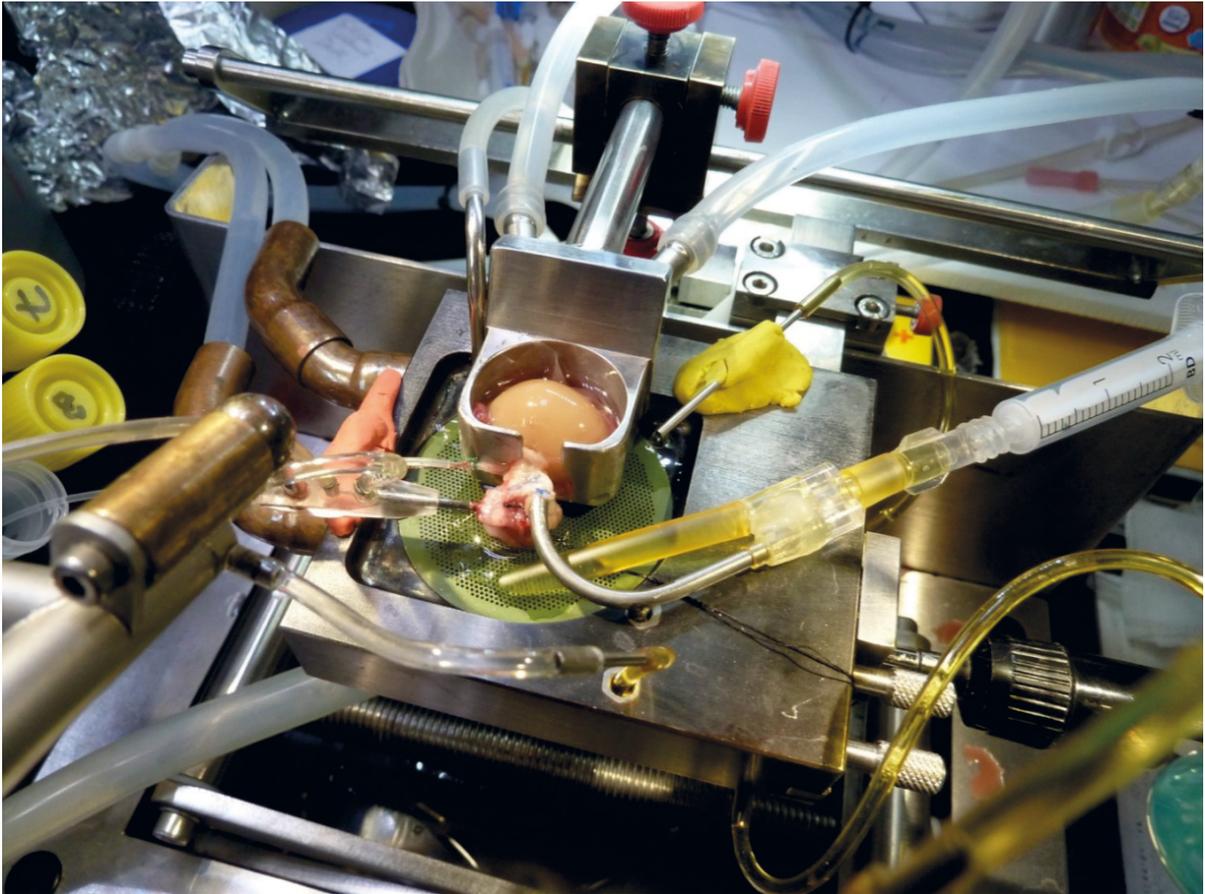


Abb. 8.1.2.4.: *Perfusion mit zellfreiem Perfusat*, die Niere hat Ihre Eigenfarbe sofort angenommen. Gegenüber der schematischen Abb. 8.1.2.2/8.1.2.3 vereinfachter Sammeltrichter mit Siebplatte aus einem online Filter (Sammeltrichter aus Edelstahl, Forschungswerkstatt Universitätsklinikum Münster). Aortenkanüle, Vena cava Kanüle und Ureterkatheter (mit rotem Plastilin gesichert) gut sichtbar. Im gelben Plastilin steckt der atmosphärisch offene Überlauf vor der O₂-Messkammer, rechts vorn der arterielle Bypass zur punktuellen Messung des arteriellen pO₂. Das vordere Rändelrad rechts am Block dient der Vorkonstriktion des durchgesteckten Schlauches vom arteriellen Bypass, das dahinter sitzende Rändelrad fixiert die schwenkbare Venenkanüle an ihrem nach unten abzweigenden T-Stück. S.a. technischer Anhang. Der Venenkanüle aufgesteckt ist ein Y-Stück, das venöses Effluat zur Siebplatte zurückführt und eine venöse Probenentnahmestelle u.a. zur Blutgaskontrolle (in einem separaten Blutgasmeßgerät) hat.

Messungen aus zellfreien Medien können beim Absaugen mit einer Spritze zu Fehlbestimmungen führen wegen der relativ geringen physikalisch gelösten Gasmenge im Vergleich zu Vollblut, was besonders arterielle Proben betrifft. Darauf hat Cheung hingewiesen bei Perfusionsstudien an der isolierten Rattenleber. Freies Abtropfen oder Verwendung von Kapillaren, die sich selbst vollsaugen werden bevorzugt (47), s.a. nächste Abb. 8.1.2.5 mit der arteriellen Abnahmestelle (da ist der Effekt noch größer).



Abb. 8.1.2.5.: Die „Perfusions-Pistole“ ist bis zu der aufgesetzten Frontmagnetschale, in die der Kugelkopf der Aortenkanüle passt, mit Wasserbad temperiert. Links der Zulaufarm, unten über einen Schlauch angeschlossen, rechts der die Kanüle tragende Arm, der ein zuführendes Edelstahlröhrchen enthält das außen an ein wie ein F konfiguriertes Glasrohr angeschlossen ist, das als ein letzter Blasenfänger dient und potentiell als Abnahmestelle für arterielles Perfusat*. Der Ablaufschlauch enthält innen den dünneren Perfusatschlauch aus Tygon. In den Intervallzeiten werden Perfusionskanüle und Innenschlauch nach Freispülen mit 3% Formalinlösung gefüllt bis zum Folgeexperiment.

*Cheung hat auf Probleme bei der pO_2 Messung zellfreier, wässriger Lösungen aufmerksam gemacht (47) s.a. Kapitel 9.3.

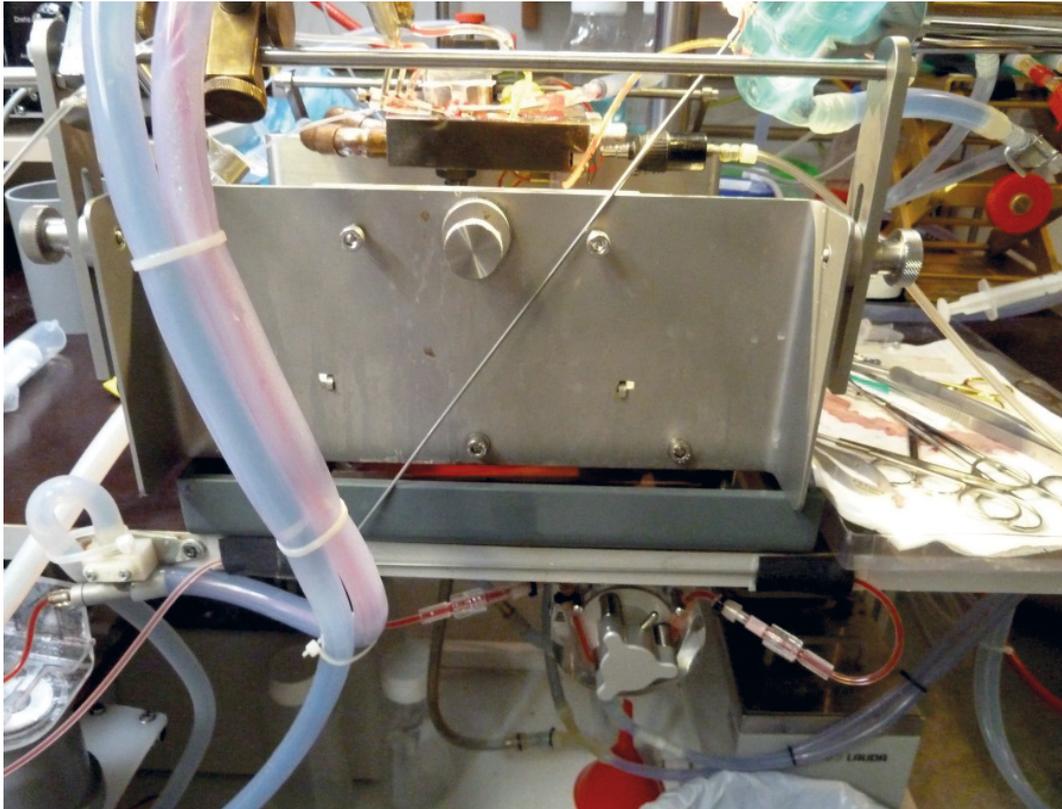


Abb. 8.1.2.6.: Perfusionspistole mit Wasserbadanschlüssen, im Ablaufschlauch scheint der rote Innenschlauch hindurch bei einer Perfusion mit Zusatz von Erythrozyten. Unten links der Übergang zur Einspeisung des Perfusats. Unter dem Tisch die Schlauchpumpe, die den Kreislauf für die Durchflussküvette der Sauerstoff-Elektrode treibt. Die Perfusionspistole ist am OP-Tischgestänge beweglich montiert. Sie kann in drei Achsen verschoben und dann arretiert werden. Damit kann die Aortenkanüle in optimaler Position fixiert werden.

9. Messmethoden und Messparameter

9.1. Temperierung und Temperaturmessung

Die Temperierung per Luft im geschlossenen Kabinett hat viele Nachteile, abgesehen von der Trägheit der Regelung. Eine Mikropunktion wäre in einem temperierten Kabinett nicht möglich, Bahlmann hat das perfundierte Organ deshalb außerhalb des Kabinetts positioniert (12). Die Temperierung durch Wasserbad bzw. Umlaufthermostate setzt ein doppelwandiges Perfusatresevoir voraus und andere adäquate Temperiersysteme wie Temperierschlangen aus Glas, Nierenschale und Auffangtrichter mit Temperierung. Die Temperaturmessung ist heute kein Problem mehr durch viele kostengünstige elektronische Mess-Systeme, wie sie im Elektronikhandel erhältlich sind. Essentiell ist die rektale Temperaturmessung beim narkotisierten Tier (das auf einem beheizten OP-Tisch positioniert ist) ebenso wie die Temperatur der Wasserbäder und Umlaufthermostate. Deren Einstellung sollte Temperaturverluste auf dem Weg zum Organ hin berücksichtigen, sofern diese nicht vermeidbar sind. Weitere technische Details finden sich im Anhang.

9.2. Perfusionsrate

Für pharmakologische oder physiologische Untersuchungen an der Niere erscheint eine gute kontinuierliche Flussregistrierung essentiell zu sein ebenso wie die Registrierung des Perfusionsdrucks. Die einfachste Methode ist die Rollerpumpe mit einem Tachogenerator auszustatten und die Pumpenrevolutionen als Analogsignal mit einem Kompensationschreiber aufzuzeichnen. Damit wird man z.B. schnell gewahr, dass kleine Manipulationen am Ureterkatheter oft unmittelbare Auswirkungen haben auf die Flussrate (bei druckkonstantem Betrieb) oder auf den Druck bei flusskonstantem Betrieb. Dies gilt für Urinflussraten über 50-100 μ l/min. Bei niedrigeren Urinflussraten z.B. bei Einsatz eines höheren COP (6,5-7,5g/dl BSA) kann dies lange übersehen werden. Die von uns eingesetzte Technik ist in Kapitel 4.2.3. ausführlich angegeben. Nachteilig ist, dass arterielle Lecks die Messung verfälschen. Bei der Technik, bei der das Signal vom Tachogenerator der Perfusionspumpe abgegriffen wird ist ein Vorverstärker notwendig, wenn dieses auch zur Regelung für eine druckkonstante Perfusion genutzt wird. Beim Studium von gefäßaktiven Substanzen, die zu einer Widerstandsänderung führen haben wir eine Zuinfusionstechnik weiterentwickelt, die bei druckkonstantem Perfusionsmodus flußproportional gesteuert wird und so zu einer konstanten Endkonzentration der Substanz führt (s.a. Kapitel 5, Abb. 5.1.1.4 und 5.1.1.5). Die Technik wurde zuerst von Joachim Lutz aus Würzburg beschrieben (152b).

Aufwendiger ist eine elektromagnetische Flussmessung, die entsprechende technische Systeme voraussetzt. Weniger aufwendig sind inzwischen auch bei reinen Elektrolytlösungen einsetzbare Messtechniken mit der Laufzeitmethode auf Ultraschallbasis (58) (Breitband Ultraschall, Transonic T106 Flowmeter mit kannülierender Flußsonde SN22, Transonics, Ithaca, NY, USA). Vorteil ist, dass mit beiden Verfahren auch der venöse Fluss, der die Niere verlässt, kontinuierlich gemessen werden kann.

Die Flussmessung mit einem Rotameter ist eine sehr einfache Technik und muß visuell abgelesen werden (Schwebekörper in einem konischen Glaszylinder). Je nach Fragestellung kann auch diese Technik ausreichend und adäquat sein, hat aber Nachteile gegenüber einer kontinuierlichen Messung, die auch aufgezeichnet werden kann.

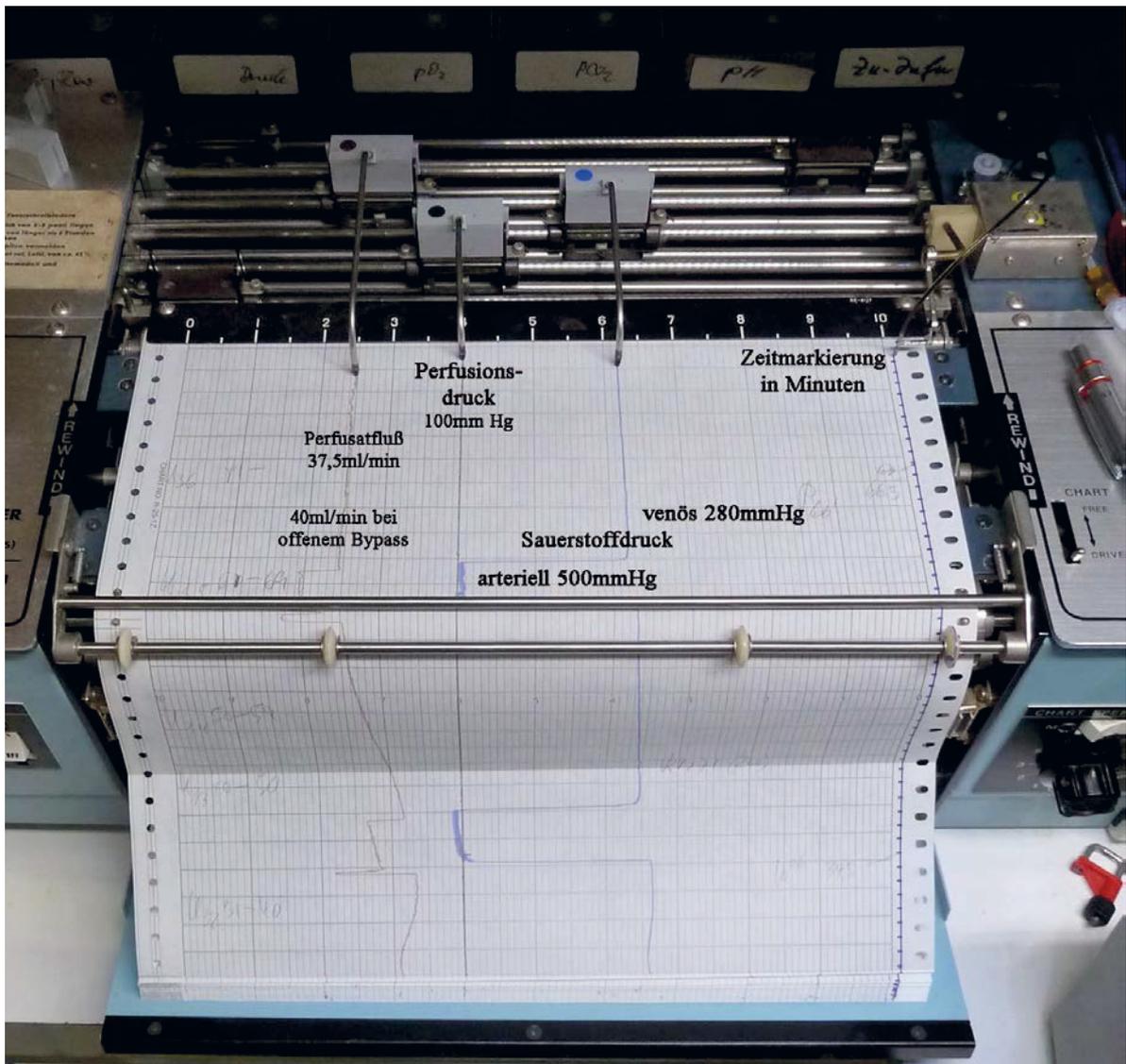


Abb. 9.1.0.: Schreiberprotokoll vom 7.10.2014 (Rikadenki 6-Kanal-Kompensations-Schreiber).

Das Experiment war eine Modus 3 Perfusion, Rezirkulation mit Dialyse, Krebs-Henseleit-BSA Lösung mit 5% gewaschenen Humanerythrozyten. Am Schreiberband rechts die Zeitmarkierung in Minuten. Die Druckregistrierung liegt bei 100mmHg, die Kalibrierung an der schwarzen Leiste (Papierausgang) im Hintergrund bei 4, der Nullpunkt liegt bei 9. Die Flussregistrierung liegt bei 37,5ml/min (30ml/g Niere), bezogen auf die schwarze Leiste entspricht 0 der 50ml Marke, 10 der 0 ml Marke. Bei Öffnung des arteriellen Bypass steigt der Fluss durch die Bypass-Entnahme auf 40ml/min an, ohne dass der Druck sich verändert. Bei dem ersten Umschalt-Manöver vorn ist der Fluss noch niedriger, die überschießende Flußspitze bei Öffnung des Bypass wird von Hand an der Stellschraube nachjustiert. Die Sauerstoffelektrode ist mit reinem O₂ und N₂ kalibriert, an der schwarzen Leiste liegt der 0-Punkt (N₂-Eichpunkt) bei 9, der O₂-Eichpunkt bei 2, entsprechend 699 mmHg (der Barometerdruck war 746 mmHg, Wasserdampfdruck 47 mmHg bei 37° C). Der daraus errechenbare Sauerstoffverbrauch lag bei knapp 9µmol/min-g Niere.

9.3. Sauerstoffverbrauch

Bei dem Einsatz einer membranbezogenen Clark-Elektrode sind die Geometrie und damit die Kalibrierung der Elektrode etwas abhängig vom hydrostatischen Druck, der auf der Membran lastet (pO₂-Elektrode Typ MT-1-AC von Eschweiler, Kiel, BRD). Wir haben deshalb primär darauf verzichtet, jeweils eine Elektrode nierenvenös und eine zweite Elektrode arteriell einzusetzen. Eine Drift ist mit Ausgangs- und Endkalibrierung mit einer Elektrode besser zu handhaben als die Prozedur mit zwei Elektroden es wäre. Wir nutzen nur eine Elektrode, an der regelmäßig venöses Effluat mit einer kleinen Rollerpumpe vorbei gezogen wird mit einer atmosphärisch offenen Stelle vor der Elektrode. Alternierend kann dann per elektro-pneumatischer Kippschaltung (doppeltes Schlauchventil) über einen vorkonstruierten arteriellen Bypass arterielles Medium für wenige Minuten an der Elektrode vorbeifließen zur Bestimmung der AV-Differenz. Auch bei der arteriellen Messung ist eine atmosphärische Öffnung eingebaut (klein eingestellter Überlauf). Bei druckkonstantem Betrieb wird das Mehr an Durchfluss bereitgestellt bzw. geregelt, s. Abb. 9.1.0. Nach Abschlußkalibrierung am Versuchsende sollte die Elektrode in der Kammer von Perfusatresten freigespült werden. Bei Rezirkulationstechnik wird das zur O₂-Messung abgezweigte Perfusat zurückgeführt. Cheung hat darauf hingewiesen, dass es bei zellfreiem Perfusat leicht zu Fehlbestimmungen kommt, wenn Proben für eine Spotmessung mit einer Spritze mit Unterdruck aufgezogen werden und different behandelt werden, am besten ist freies Abtropfen bzw. spontanes Auffüllen von Kapillaren. Dies hängt mit dem großen Unterschied zusammen zwischen Blut mit hoher Bindungskapazität für Blutgase und zellfreiem Perfusat, das Gase nur physikalisch gelöst enthält (47). Dieses Problem ist bei der hier praktizierten online-Messung zu vernachlässigen oder gar vermeidbar, ebenso bei Erythrozytenzusatz. Bei venösen pO₂-Werten über 100mmHg und Erythrozytenzusatz kann die AV-Differenz direkt mit dem Löslichkeitskoeffizienten von Sauerstoff (bei 37°C) und dem Perfusatfluss pro Minute und g Niere verrechnet werden.

9.4. Urinflussrate, Urinflussblockade

In den Labors von Christoph Weiss wurde die Urinflussrate u.a. z.B. mit einer Pipette zeitabhängig gemessen. Wir bevorzugen es, den Urin in vorgewogenen Töpfchen zu sammeln über definierte Zeitintervalle und das Volumen gravimetrisch zu messen (elektronische Waage mg Bereich). Bei kolloidfreien single-pass Experimenten benötigt man dazu z.B. 10-20ml Reagenzröhrchen (wegen der hohen Filtrations- und Urinflussraten von >500µl/min g Niere), bei BSA Rezirkulations- und Modus 3 Experimenten (Rezirkulation mit Dialyse-Regeneration) genügen entsprechend kleinere Cups wie z.B. 1,5ml - 2ml Eppendorf Gefäße. Bei reiner Rezirkulation ist es angemessen, die Urinsammelperioden kurz zu halten und gegebenenfalls entsprechende Volumina Ersatzlösung zurückzugeben, die die Urinhaltsstoffe in etwa simulieren. Den restlichen Urin zu reinfundieren wäre eine Alternative, aber Pegg hat darauf hingewiesen, dass Urin Partikel enthalten kann, z.B. tubuläre Zellaggregate bzw. Zelldebrie, was renale Kapillaren verstopfen könnte. Er ist auch deshalb dazu übergegangen, große 0,2µm Filter vor der Niere zu nutzen (permanente Sterilfiltration?). Entsprechend könnte Urin vor der Rückgabe in Minifiltern gesäubert werden (187-191). Tatsächlich sieht man bei zellfreier Perfusion nach ca. 30min die ersten

Tubuluszellen und Zellaggregate im Urinsediment (207)(s.a. Abb.2.1.), was zeitlich mit dem übereinstimmt, was morphologisch an Veränderungen zu sehen ist, Zellnekrosen von TAL-Segmenten (dicke aufsteigende Henlesche Schleife) und P₃-Segmenten (gerader Teil des proximalen Tubulus) (6, 40, 60, 253). Wenn der Urinfluss artifiziell blockiert ist z.B. durch Torquieren des Ureters und die Perfusionsrate kontinuierlich über einen Kompensationschreiber registriert wird, sieht man dies sofort an einer Flussreduktion, sofern der Urinfluss >50µl/min schon erreicht hatte. Hebt man die Blockade auf, steigt der Fluss augenblicklich wieder an. An einem einfachen Rezirkulationssystem z.B. mit Rotameter ist das kaum zu erfassen, insbesondere bei hohem COP und niedrigen Urinflussraten. Was man kontinuierlich registriert, das kann man besser sehen und einschätzen.

9.5. GFR: glomeruläre Filtrationsrate, Messtechnik der GFR

9.5.1. Inulin, Polyfructosan

Als Inulin noch im Handel war für klinische Tests war es erschwänglich. Inzwischen ist es offenbar zur Rarität für den Umsatz und dementsprechend recht teuer geworden. Auch radioaktiv markiertes Inulin wird von anderen Autoren verwendet entweder als Tritium- oder häufiger als ¹⁴C-Markierung insbesondere bei der reinen Rezirkulationstechnik mit kleinen Volumina. Wir haben bewusst auf radioaktive Marker verzichtet. Bei Rezirkulationstechnik sind auch fluoreszenzmarkierte Indikator-Substanzen auf Polyfructosanbasis einsetzbar (59, 149), ich selbst habe damit keine eigenen Erfahrungen. Wir haben lange Zeit Inulin/Polyfructosan (Inutest®) im Perfusat in einer Konzentration von 30-100mg/dl eingesetzt, ob im single-pass oder im Rezirkulations/Regenerations-System und diese mit der doppelenzymatischen Methode nach Säurehydrolyse des Inulins bestimmt (Glukose-Hexokinase Methode mit Isomerase (228)), alternativ mit der Anthron-Methode, die allerdings einen Glukosefehler aufweist den man niedrig halten kann, wie Nagel zeigen konnte (167). Bei der enzymatischen Inulinbestimmung hat die Arbeitsgruppe von Walter Pfaller eine Inulinase zur enzymatischen Spaltung der Polyfruktose eingesetzt (299), eine von Kühnle erstmals beschriebene Technik (126). Damit kann man die aufwendige Säurehydrolyse bei hohen Temperaturen vermeiden. Für die Urinproben ist eine adäquate Vorverdünnung essentiell.

9.5.2. Kreatinin

Inzwischen nutzen wir die Kreatinin-Clearance (kinetische Jaffe-Reaktion) und nehmen in Kauf, dass die Clearance bei männlichen Tieren durch Sekretion 10-20% höher liegt als die Inulin-Clearance. Kreatinin wird in einer Konzentration von 2mg/dl bis zu 50mg/dl eingesetzt, zudem gegebenenfalls zusätzlich Harnstoff (6mmol/l). Bowman hat Kreatinin als Messsubstanz propagiert weil es einfach zu messen ist, interagierende Chromogene „keine Rolle spielen“ bei dem künstlichen Medium und Kreatininsekretion bei hoher Dosis vernachlässigt werden kann (bis zu 50mg%) (32). Die hohe Dosis ist ein Kniff, mit dem sich die Natriumkonzentration im Endurin durch Verdrängung reduziert und so bei hohem COP (Albumin >6g%) eine fabelhafte fraktionelle Natriumresorption erzielt werden kann (mehr Schein als Sein). Mit dieser hohen Kreatinin Vorgabe (50mg%) kann man die Sekretion

überfahren. Wir meiden die enzymatische Methode zur Bestimmung der Kreatininclearance (zu viele unplausible Ergebnisse). Die kinetische Jaffé Methode ergibt wesentlich bessere, d.h. plausiblere Werte in Perfusat und Urin, zumal auch störende Chromogene in den synthetischen Perfusionslösungen keine Rolle spielen (wie das in vivo bei Blut im Unterschied dazu der Fall ist). Allerdings gibt es zwei störende Gesichtspunkte, zum einen sind Ketosäuren wie Oxalazetat, Pyruvat und α -Ketoglutarat potentielle Störfaktoren (271, 297), zum anderen zeigen männliche Ratten, die wegen hormoneller Konstanz auch von uns bevorzugt werden eine höhere Sekretionsrate von Kreatinin (95, 296) (Clearance-Quotient Kreatinin/Inulin von $<1,2$). Für die Ketosäuren aus Tab. 4.2 (Rezeptur R2) ergibt die Kreatinin-Messung mit der Jaffe-Methode vor Zugabe von 2mg/dl Kreatinin einen Leerwert von 0,2mg/dl. Ob sich eine Korrektur anbietet muss man offen lassen solange man nicht weiß, wieviel Ketosäuren noch im Urin auftauchen. Durch Vorverdünnung des Urins für die Messung könnte sich dieser Gesichtspunkt aber als irrelevant herausstellen. Die Arbeitsgruppe von Koene in Nijmegen hat gezeigt, dass Cimetidin die Sekretion von Kreatinin beim Menschen hemmt und die Clearance auf das Niveau von Inulin absenkt (103).

9.5.3. Andere GFR Marker

Cyanocobalamin – Vitamin B₁₂ – wurde von der Arbeitsgruppe H.M. Brink aus Nijmegen in Holland eingesetzt bei Verwendung von Pluronic F108 als Kolloid. Interessant ist die Methode diesen Farbstoff online in Perfusat und Urin kontinuierlich zu messen über Durchflussküvetten. Eine Vergleichsmessung mit ¹⁴C-Inulin ergab Übereinstimmung. BSA hat dagegen eine zu hohe Bindung von Vit B₁₂ sodass es bei Albuminperfusat als Marker für die GFR nicht zu gebrauchen ist (43). Ein anderer Marker, der u.a. von Maack genutzt wurde ist radioaktives Polyäthylenglykol ³H-PEG oder ¹⁴C-PEG (polyethylene glycol) mit einem Molgewicht von 4000 (60, 112).

9.6. Elektrolyte Na, K, Ca, Cl, HCO₃

Goldstandard ist nach wie vor die Flammenphotometrie von Natrium und Kalium, das in der Regel mit einem Standard wie Lithium oder Cäsium genutzt wird (z.B. Instrumentation Laboratory). Hier kann man die Kalibrierung nach Plasma- oder Urinstandard angemessen wählen; d.h. der gemessenen Wert sollte im Bereich des Standards liegen. Bei Autoanalyzern mit ionenselektiven Elektroden sollte man wissen, wie sie kalibriert sind („Proteinfehler“); erfaßt wird die Ionenaktivität im proteinfreien Raum, bei der Flammenphotometrie wird das Gesamtvolumen in die Flamme gegeben. Moderne Blutgas-Analysatoren haben meist auch die Elektrolyte wie Natrium und Kalium im Programm, sind aber in der Regel nicht für Urinwerte kalibriert. Zudem ist die Messung von ionisiertem Calcium oft möglich und insofern wertvoll, als man erstaunt ist wie weit Theorie (Einwaage) und Wirklichkeit (Ionenaktivität) auseinanderliegen (selbst bei Normierung auf pH 7,4). Chlorid, pH und HCO₃ sind meist auch damit zu messen bzw. zu kalkulieren. Besarab hat in einer Studie 1981 in vitro die Beziehung zwischen Gesamtcalcium und ionisiertem bzw. ultrafiltrierbarem Calcium studiert und sehr komplexe Zusammenhänge beschrieben (25).

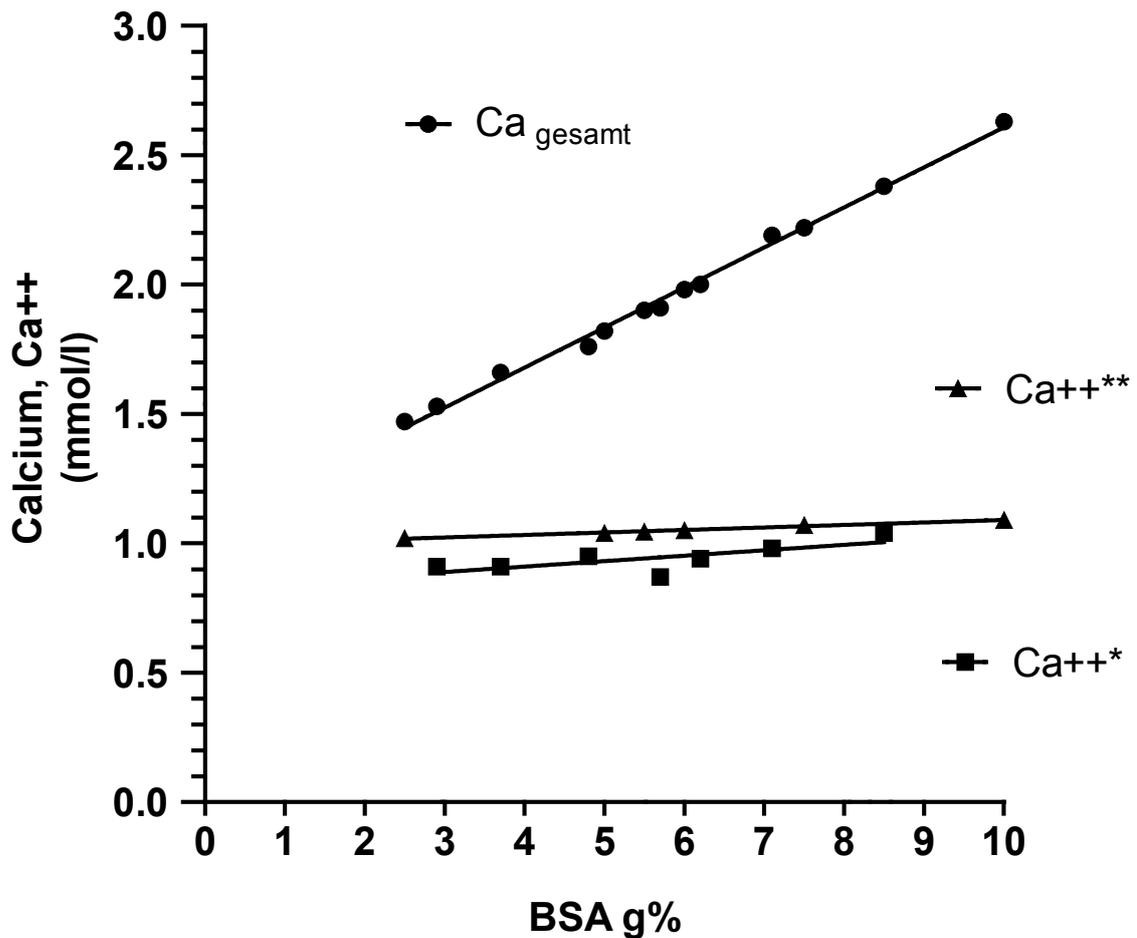


Abb. 9.1.1.: Korrelation zwischen Albumin (BSA) und Calcium/Ca⁺⁺, das BSA-Medium wurde kontinuierlich dialysiert gegen ein Standard-Dialysat vom Typ Krebs-Henseleit bei pH 7,4. Im Rezirkulationsmodus mit Dialyse ist das ionisierte Calcium im albuminhaltigen Medium sehr konstant zu halten auch bei Anstieg des Gesamtcalciums im selben Medium parallel zum Albumin (g%). Albumin wurde sowohl chemisch als auch mit einem Reichelt Refraktometer, Gesamt-Calcium chemisch mit einem Autoanalyser, Ca⁺⁺ ** mit dem ICA 113 System, dem ersten Gerät von Radiometer (Kopenhagen, Dänemark) gemessen und Ca⁺⁺* mit dem aktuellen ABL 505 Gerät im Jahre 2014 überprüft. An beiden Geräten war eine Umrechnung auf pH 7,40 möglich, was bei den aktuellen Analysen zu einem maximalen Delta von 0,02mmol/l führte bei einer Spanne von 0,85 bis 1,04mmol/l, bei pH Schwankungen zwischen 7,360 und 7,425.

Besonderer Hinweis: Bei physiologischen Konzentrationen von Calcium und Phosphat in vivo sorgt das Protein Fetuin dafür, dass Grenzüberschreitungen „abgefedert“ werden. In vitro ohne Fetuin zu arbeiten bedeutet, dass man sich immer nahe am Löslichkeitsprodukt für Calcium und Phosphat bewegt. Es erscheint deshalb essentiell, die Grenzkonzentrationen im Auge zu behalten, besonders beim Lösungsansatz (Überprüfung auf Tyndall-Effekt). Ein niedriges pH ist da eine Hilfe, z.B. über CO₂ induziert (s.a. Kapitel 4.1.3. Herstellung der Lösungen).

9.7. Osmolalität und kolloid-osmotischer Druck

Osmolalität

Gefrierpunktniedrigung (Knauer, Gonotec, Berlin) oder Dampfdruckosmometrie (Wescor Inc., South Logan, Utah, USA) sind beides zeitaufwendige und sensible Meßprinzipien und Meßmethoden für die Osmolalität. Die Dampfdruckosmometrie kommt mit weniger Material aus, 5-10µl, bei der Gefrierpunktbestimmung werden meist 50µl benötigt. Die Kalibrierung ist zeitaufwendig und die Genauigkeit ist höher bei Automaten. Wer die Möglichkeit hat und größere Serien zu messen hat, kann heute auf einen sehr guten Automaten zur Bestimmung der Gefrierpunktniedrigung zurückgreifen (Osmomat auto von Gonotec, Berlin), mit dem eine Serie von 20 Proben nach Kalibrierung automatisch abgearbeitet wird mit erstaunlich hoher Präzision (Doppelbestimmung). Für die Analyse von Mikropunktionsproben wurde früher die direkte mikroskopische Kryoskopie genutzt (Ramsey Kryoskop), die mit sehr kleinen Probenmengen auskommt (Microcups).

Die von verschiedenen Autoren (16, 26) genutzte Methode, die Urinosmolalität aus UNa^{++} und UK^{+} zu kalkulieren (Summe beider Ionen x 2) ist als Übersichtsgröße akzeptabel, kann aus meiner Erfahrung aber die direkt gemessene Osmolalität ganz erheblich unterschätzen, im Minimum um 5-10% (unveröffentlicht). Will man die osmotische Clearance, die Freiwasser-Clearance oder Freiwasser-Resorption bestimmen, sollte man immer die Osmolalität direkt messen. Osmolalität ist bezogen auf 1 kg Lösungsmittel (osmol/kg H_2O), Osmolarität auf 1 Liter Lösung (osmol/l).



Abb. 9.1.2.: Serienmeßgerät mit Gefrierpunkt-Erniedrigung.

Das Bild zeigt den von uns zuletzt genutzten Automaten von Gonotec, Berlin, mit abdeckbarem Schlitten für 20 Proben (im Vordergrund), 4 Teströhrchen sind eingestellt. Zur Kalibrierung wird das 1. mit aqua bidest, 2 & 3 mit Eichlösung belegt, das 4. (und weitere) mit einer Probe. Der Abdeckschlitten wird bei der Messung mit jeder Meßprobe weiter zurückgefahren; damit sind Verdunstungsverluste niedrig zu halten.

Kolloid-osmotischer Druck COP

Beim Einsatz von Kolloiden im Perfusat ist die Bestimmung des COP sehr nützlich. Man sollte sich vor Augen führen, dass die Beziehung zwischen Kolloid in g/dl und dem COP nicht linear ist, weil sie aus zwei Komponenten besteht, dem Donnan-Gleichgewicht (nicht linear) und der Van't-Hoff-Beziehung (linear), die sich addieren. Abb. 9.1.4. zeigt die Beziehung zwischen der Konzentration von BSA und dem COP in mmHg.



Abb. 9.1.3.: Kolloid-Osmometer (Gonotec, Berlin). Bevorzugt wird die 20000 Dalton Membran. Kalibriert wird, indem der Abfallbehälter von der 10cm erhöhten Plattform auf den Tisch gestellt wird und zurück. Der Druck kann digital in drei Varianten abgefragt werden: mmHg, cm H₂O, und k-Pascal. Bei ähnlich hohen Probenwerten kann in Serie gemessen werden mit erheblicher Zeitersparnis. Per Software lassen sich Daten-Protokolle drucken.

Die Messergebnisse hängen davon ab, wie nah die zu messende Probe in ihrer Zusammensetzung, Temperatur etc. an die Referenzlösung hinter der trennenden Membran herankommt. Dies ist in der Regel eine Ringer-Bikarbonatlösung.

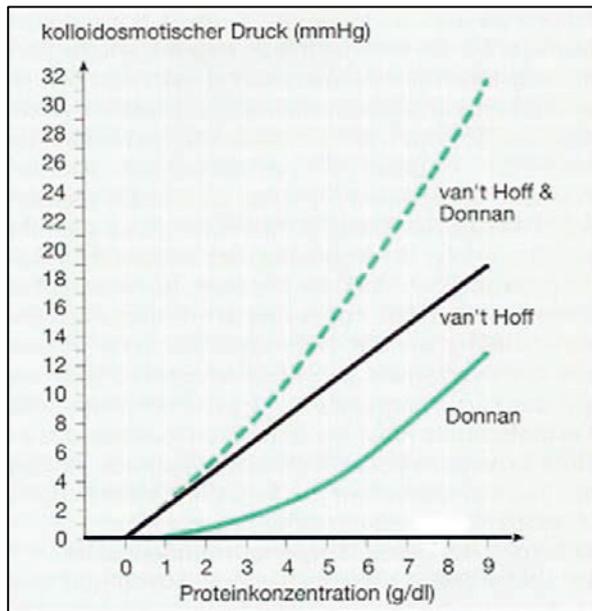


Abb. 9.1.4.: Beziehung zwischen kolloidosmotischem Druck (COP) und Proteinkonzentration, schematisch. Der COP ergibt sich aus der Addition von der Zahl der Teilchen, die linear direkt proportional wächst und dem nichtlinearen Donnan-Effekt durch das nicht-permeable Eiweiß (oder Kolloid) und die dadurch entstehende Imbalance der permeablen Teilchen. Die Abb wurde entnommen aus (255), Abb. 4.18.

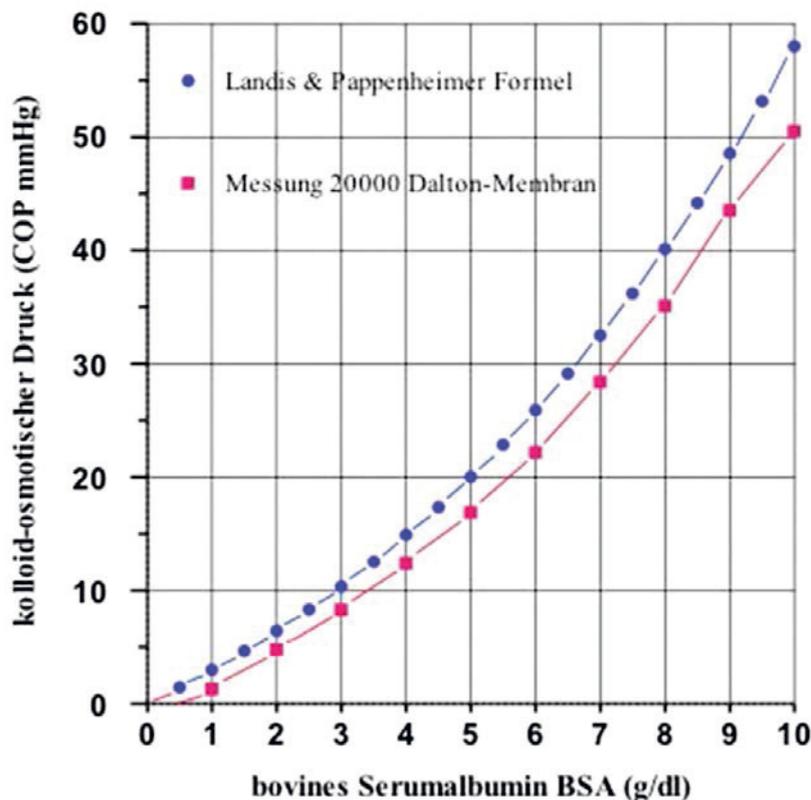


Abb. 9.1.5.: Kolloidosmotischer Druck in Abhängigkeit von der Albuminkonzentration. Der COP – kolloidosmotische Druck von Rinderserumalbumin (BSA) mit einer Membran von 20000 Dalton Ausschlussgrenze gemessen (Osmomat 50 von Gonotec GmbH, Berlin, BRD). Die Funktion ist nicht linear, da sich der Donnan Effekt (nicht linear) mit der Van't-Hoffschen Beziehung (linear) addieren. Die Van't-Hoffsche Beziehung besagt, dass der osmotische Druck einer Lösung sich proportional zur Zahl der Teilchen verhält. Die Messreihe ist aktuell von 2014. Die Messwerte liegen etwas niedriger, als sie mit der Formel nach Landis und Pappenheimer für Albumin (133) errechnet werden ($2,8c + 0,18c^2 + 0,012c^3$, c ist die Albuminkonzentration in g/dl).

9.8. Kolloide, Substrate incl. Aminosäuren, Protein und Glukose

9.8.1. Albumin

Am weitesten verbreitet für die Organperfusion ist Rinderserumalbumin BSA, das wegen der Verunreinigungen durch Dialyse aufbereitet werden sollte. In den Anfangsjahren haben wir das Trockenpulver gelöst und bei 4°C in Cellophanschläuchen in Behältern (10L) über 24h dialysiert, später dann professioneller über ca. 4-8h mit einem Einmaldialysator (lowflux) volumenkonstant dialysiert als 10% Lösung, danach sterilfiltriert und in Aliquots von 100ml tiefgefroren aufbewahrt. Dennoch ist nicht auszuschließen, dass es Albumin-Chargen gibt, die keine Freude bereiten (toxische Verunreinigungen, agonale Vasokonstriktoren?). Die besten Ergebnisse waren mit einer historischen BSA-Präparation von Armour in USA zu erreichen (ca. 1975-1987), die leider schon längere Zeit nicht mehr verfügbar ist. Eine von Sigma zuletzt 2009 bezogene Charge hat sich aber inzwischen auch bewährt. Einige Autoren wie z.B. Bowman, Maack und Bekersky verzichteten bewusst auf die Aufreinigung durch Dialyse und nutzen im Rezirkulationsmodus die an Albumin gebundenen „Verunreinigungen“ als natürliche Substrate. Diesem Modus folgte z.T. auch die Arbeitsgruppe von Brian D. Ross und den Nachfolgern in Oxford und Boston. Bei gezielten Stoffwechseluntersuchungen, wie J.J. Cohen sie durchgeführt hat ist eine Aufreinigung aber essentiell, weil es nur so unter Kontrolle zu bringen ist. Bei Versuchen mit Fettsäuren hat Cohen auch zusätzlich vorher Aktivkohle zur Albuminfettung genutzt. Albumin wird in vivo von der Leber permanent nachgebildet und alterungsbedingt veränderte Albuminmoleküle werden „entsorgt“ (194), bzw. gehen in ein Recycling. Auf diese Konditionierung muss man in vitro verzichten.

Um im Zusammenhang mit u.a. Blutreinigungsverfahren, die Albumin als Beladungsvehikel nutzen (sogenannte Albumindialyse), den Funktionszustand des Albumins zu bestimmen, ist der von der MedInnovation GmbH (Berlin-Adlershof) entwickelte Albuminfunktionstest genutzt worden. Dieser untersucht das Albuminmolekül in seiner physiologischen Funktion als Transportmolekül bezüglich seiner Be- und Entladungsfähigkeit von Liganden. Mit der Bindungseffizienz (BE in %) wird beschrieben, in welchem Maße das Albuminmolekül in der Lage ist seine Funktion der Bindung zu erfüllen, die Detoxifikationseffizienz (DTE in %) besagt wie effektiv das Molekül entgiften, d.h. die gebundenen Toxine und Metabolite an die Leber abgeben kann. Erste Analysen unserer BSA Chargen ergaben eine BE von 65% und einer DTE von 61%, was den jeweils unteren Bereichen, verglichen mit dem Humanalbumin der Normalbevölkerung, entspricht. Beide Chargen waren nach Lösung des Albuminpulvers in Dialysat noch intensiv im Kühlraum dialysiert worden, bevor Aliquots von 100ml 10% BSA eingefroren wurden. Die Proben wurden in Trockeneis gekühlt zur MedInnovation GmbH gebracht und im dortigen ESR-Analysenlabor untersucht. Eine systematische Untersuchung z.B. vor Dialyse und der fertigen Perfusionslösung mit allen Substratzusätzen steht noch aus ebenso wie der Modus, mit Aktivkohlebehandlung auch Fettsäurebindungsstellen freizulegen. Dies könnte ein Weg sein, zu homogeneren Chargen zu kommen, wenn mehr Erfahrungen damit gewonnen werden.

Detailliertes Wissen über Albumin findet sich in der Albuminfibel von T.J. Peters (194).

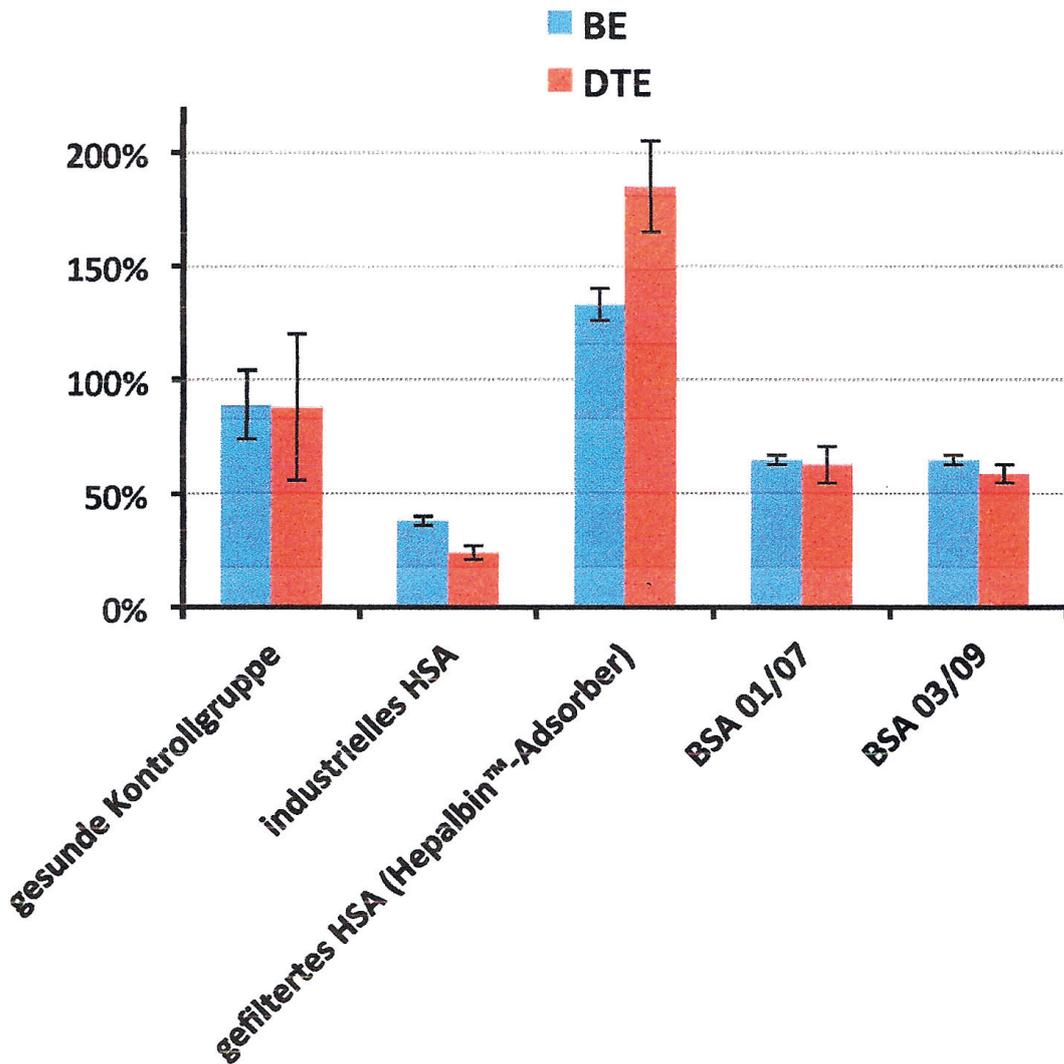


Abb. 9.1.6.: BSA 01/07 und BSA 03/09 sind zwei Chargen unseres bovinen Serumalbumins im Vergleich zu Humanalbuminproben von gesunden Probanden, speziell aufbereitetem Albumin für die Adsorber-Therapie und industriellem HSA, das mit Fettsäurezusätzen stabilisiert wird und dadurch wenig binden kann.

9.8.2. Andere Kolloide

9.8.2.1. Dextrane

In der ersten von Christoph Weiss beschriebenen Arbeit einer Perfusion der Rattenniere wurde Dextran als Kolloid verwendet (295). Für den Beleg, dass Autoregulation der Nierendurchblutung auch ohne Erythrozyten nachweisbar ist war dies ausreichend, funktionell ist dieses Kolloid für die Nierenperfusion nicht optimal. Bei vergleichbarem COP ist die Viskosität deutlich höher als bei BSA. Dextrane erfordern eine modifizierte Inulinbestimmung, wenn dieses mit der Anthron-Methode bestimmt wird. Bei einer zu hoch gewählten Temperatur für die Säurehydrolyse wird Dextran in Dextrosemoleküle gespalten,

die in die Farbreaktion miteingehen (167). Hier könnte die von Kühnle beschriebene „kalte“ enzymatische Methode mit Inulinase weiterhelfen (126, 299).

9.8.2.2. Vernetzte Gelatinepräparate

Unsere ersten Experimente in Berlin wurden mit harnstoffvernetzter Gelatine (Haemaccel, Hoechst AG) durchgeführt. Das Kolloid wurde als Pulver in destilliertem Wasser in Lösung gebracht mit einer Endkonzentration von 46,7g/l, vorfiltriert über ein Glasfilter, Pyrogenadsorption über ein EKS Seitz Filter mit einer Porosität von 1-1,5 μ m und 3 μ m in Serie. Die Lösung wurde in 500ml Glasflaschen nach Autoklavierung bei 110°C für 30min anschließend bei 4°C aufbewahrt. Diese Stammlösung wurde aktuell am Versuchstag mit sterilen Salzkonzentraten und Metaboliten zur definierten Komposition gemischt und zum Schluss durch ein Filter mit 0,2 μ m Porosität sterilfiltriert (Sartorius Filter 0,2 μ m). Die Prozedur der Autoklavierung hat nicht zur Erhöhung der Osmolalität geführt (Haemaccel-Endkonzentration 35g/l). Dennoch ist der niedermolekulare Anteil ein Problem für die Hydrodynamik im Nephron. Bei initial hoher Na- und Wasserresorption kommt es zur Eindickung der filtrierten Kolloidanteile und damit zur Erhöhung der Viskosität. Das kann man daraus schließen, dass ca. 20 min nach Perfusionsbeginn ein Flussminimum von ca. 8ml/min g Niere erreicht wird mit auf gleichem Niveau erhöhtem P_{tub} im proximalen wie distalen Tubulus. Dies weist auf einen erhöhten Widerstand im Bereich der Lamina cribriformis der Papille durch die erhöhte Viskosität hin, die mit abnehmender Resorptionsleistung durch „Verdünnung“ abnimmt (s. Abb. 6.1.1.b. unveröffentlichte Befunde). Vergleichbares haben Brink und Kollegen aus Nijmegen in Holland berichtet bei Verwendung von Pluronic F108 als Kolloid (41, 42). Die Siebungseigenschaften waren zudem filtratabhängig. Bei einem Filtrat von 100 μ l/min lag der Siebungskoeffizient bei 0,7, bei einem Filtrat von 800-1000 μ l/min bei 0,3.

9.8.2.3. Pluronic , HAES

Holger Franke hat im Labor von Christoph Weiss in Kiel Erfahrungen mit dem Einsatz von Pluronic F108 gemacht (77), selbst habe ich damit keine nennenswerte Erfahrungen. Eine Schwierigkeit ist die Bildung von Mizellen. Die Arbeitsgruppe in Nijmegen hat, wie oben beschrieben viel Erfahrung damit gewonnen. HAES hat wie alle anderen künstlichen Kolloide gegenüber Albumin den Nachteil, dass die Viskosität höher ist und damit die hohen Flussraten nicht erreicht werden wie bei Albumin (BSA). HAES wird von einigen Autoren in Kombination mit Albumin verwendet. Wir haben es zur Perfusionsfixierung für morphologische Untersuchungen genutzt und für die Perfusionsfixierung für Nieren, die für die Reperfusion der fixierten Niere – unser 4. experimentelles Modell – eingesetzt wurden.

9.8.3. Stoffwechselsubstrate

Glukose

Wir bevorzugen eine leicht erhöhte Glukosekonzentration von 8,4mmol/l. Ältere Studien haben gezeigt, dass eine höhere Glukosekonzentration (z.B. 20mmol/l) gegenüber dem Standard von 5,5mmol/l den Natrium-Transport verbessert, wenn Glukose das alleinige Substrat ist (53, 55, 215, 216, 246, 254).

Andere Stoffwechselsubstrate

Systematische Untersuchungen an der IPRK haben gezeigt, dass durch Zusatz von Aminosäuren (60, 67, 241), durch Zusatz von Krebszyklus-Intermediaten (246, 247, 254) und kurzkettigen Fettsäuren wie Butyrat eine deutliche Verbesserung der Natrium-resorption zu erreichen ist bei parallel höherem O₂-Verbrauch, so auch bei Einsatz langkettiger Fettsäuren (79). Ob ein Zusatz von Carnitin Vorteile bringt ist bislang noch nicht systematisch untersucht worden. Butyrat wird im Unterschied zu Propionat carnitinunabhängig aufgenommen und zeigt die stärksten Effekte (246). Substrate, die der Glukoneogenese in der Niere dienen, können theoretisch in Konkurrenz um die Energiereserven treten mit dem energieintensiven Natriumtransport (211). Ein Substrat wie Succinat, das seinen Wasserstoff über das FAD-System in die Atmungskette einschleust erhöht den Sauerstoffverbrauch und reduziert den Natriumtransport, da es den ersten Phosphorylierungsschritt der Atmungskette überspringt. Bei höherer Konzentration wird die CO₂-Produktion so stark reduziert, dass man den Eindruck gewinnt, dass der Krebszyklus „ausgebremst“ wird (246). Eine ganze Reihe von Arbeitsgruppen hat sich mit der Glukoneogenese beschäftigt. Dabei wurde die Rezirkulationstechnik genutzt zur Effektkumulation (31, 56, 176). Die Arbeitsgruppe von FH Epstein in Boston und insbesondere Meyer Brezis haben sich mit der Frage beschäftigt, wie die Höhe des Salztransports im Bereich der TAL-Segmente zu Sauerstoffmangelschäden führt und dessen Substratabhängigkeit (38-40).

Die folgende Abbildung zeigt den Effekt von Butyrat auf Natriumtransport und Sauerstoffverbrauch gegenüber einer substratarmen nur mit 5,5mmol/l Glukose versetzten Perfusionslösung. Um noch mehr Wasserstoff in die Atmungskette zu schleusen haben wir Anfang der siebziger Jahre versucht mit Substratgemischen, die den Malat-Aspartat-Austausch an der Mitochondrienmembran nutzen, den Natriumtransport zu erhöhen. Dies ist im single-pass Modus mit Haemaccel als Kolloid gut gelungen (247) und ist später von Brian D. Ross bestätigt worden (211). Die verwendete Substratmischung bestand aus Glutamat, Laktat, Oxalazetat und Pyruvat neben der obligatorischen Glukose. Später mit dem Einsatz von Albumin als Kolloid sind dann 8 Aminosäuren dazugekommen nach der Rezeptur von Thomas Maack (60) und danach das Spektrum von 20 Aminosäuren, wie von Franklin H. Epstein vorgeschlagen (67). Durch den Einsatz von 5 Liter Dialysat war der Substratvorrat gegenüber einem Modell mit reiner Rezirkulation unkritisch, wie sich im Fall des Arginins als NO-Quelle herausgestellt hatte (197, 198). Andererseits ist der erhöhte Sauerstoffverbrauch unter Substratstimulation in der Lage, die hypoxischen Schäden bei zellfreier Perfusion in den ohnehin kritisch versorgten Bereichen im Interbündelareal des äußeren Marks zu forcieren (39). Auch da hilft der Zusatz gewaschener Erythrozyten (253).

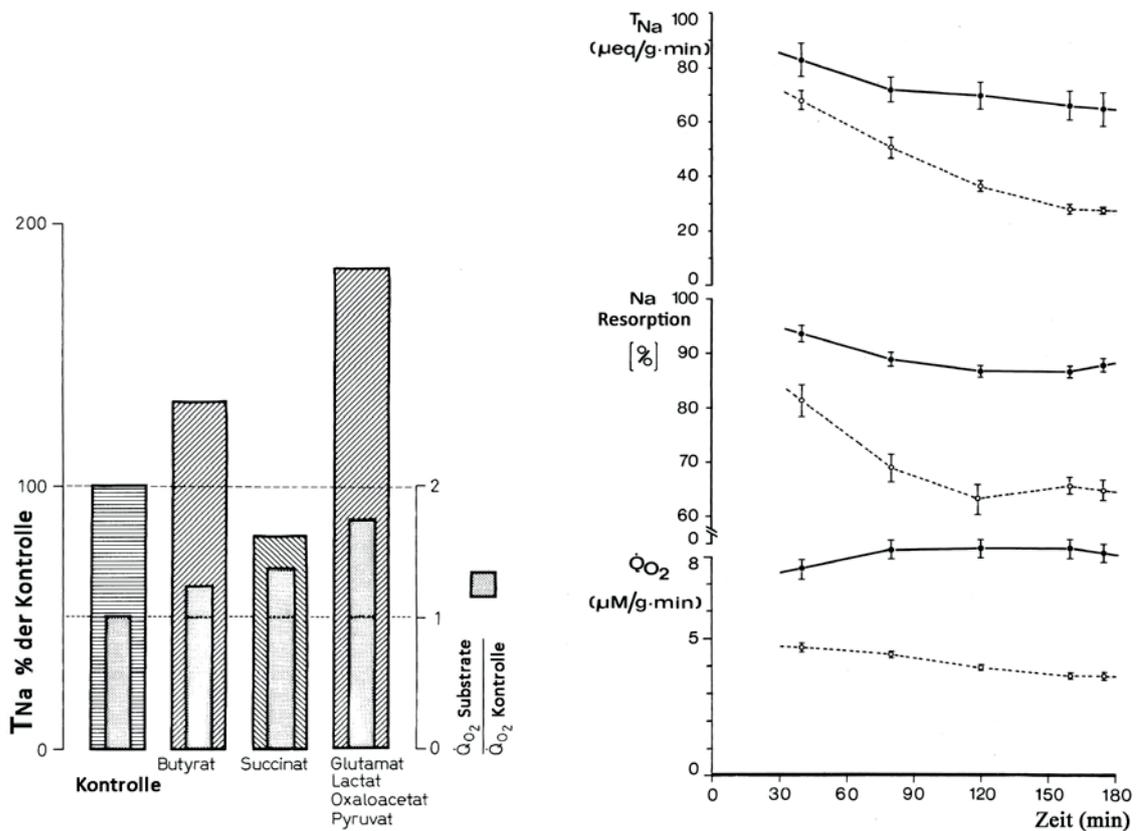


Abb. 9.1.7.: Substrateffekte auf Na-Transport und Sauerstoffverbrauch. Die linke Abbildung zeigt Substrateffekte im Vergleich zu einer Kontrollperfusion mit 5,5mmol Glukose als alleinigem Substrat. Zusatz von Butyrat erhöht den Natriumtransport proportional zum Sauerstoffverbrauch. Das Gleiche zeigt sich noch ausgeprägter bei Zusatz der Mischung aus Glutamat, Laktat, Oxalazetat und Pyruvat, während der Zusatz von Succinat den Sauerstoffverbrauch erhöht und den Natriumtransport reduziert durch Einspeisung des Substratwasserstoffs auf Höhe des FAD-Systems; damit wird die erste Phosphorylierungsstufe nicht genutzt (NADH). Die rechte Abbildung zeigt den Verlauf von Natriumtransport (absolut und %) und den Sauerstoffverbrauch bei Kontroll-Experimenten (5,5mmol Glukose alleiniges Substrat, gepunktete Linien) und bei Zusatz der Mischung aus Glutamat, Laktat, Oxalazetat und Pyruvat über drei Stunden. Die Untersuchungen wurden im single-pass Modus mit Haemaccel als Kolloid durchgeführt (123, 236, 247).

10. Nierenperfusion: Ergebnisse im Vergleich

10.1. Single-pass Perfusion – Rezirkulation mit Regeneration des Perfusats durch Dialyse

Alle in diesem Kapitel dargestellten Befunde ohne Kolloid bzw. ohne Albumin sind single-pass Experimente, alle anderen Daten sind mit dem Modus 3: Rezirkulation mit Dialyse und Albumin als Kolloid erhoben worden. Aus Kostengründen ist der Einsatz von Albumin bisher bis auf Ausnahmen bei single pass Experimenten nicht praktiziert worden (222, 223, 270). Bei einem Durchfluss von 15-30ml/min bei einer 1g schweren Niere verbraucht man pro Stunde 900-1800ml Perfusat. Mit 5 Liter Medium kann man 1-2 Experimente über 1-2h perfundieren. Bei Einsatz von Plasmaersatzstoffen wie HAES oder vernetzter Gelatine wird der Durchfluss eher im Bereich 10-15ml/min liegen (247). Für bestimmte Fragestellungen kann man auf ein Kolloid ganz verzichten, hierzu empfiehlt es sich, die Niere vor Anschluss zu dekapsulieren und den Perfusionsdruck auf 80-90mmHg zu beschränken. Durch den fehlenden COP kommt es zur deutlicheren Schwellung des Organs, was bei intakter Kapsel zur Widerstandserhöhung beiträgt. Dekapsuliert kann man Flussraten von 20-25ml/min·g Niere erreichen und eine GFR, die höher liegt als in vivo mit 1,0 bis 1,6ml/min·g Niere (bei 90mmHg). Die folgenden Abb. 10.1.0 – 10.3.0. sind eigenes Material, das z.T. bereits publiziert ist (240, 241). Die Diagramme sollen einen Überblick geben über die funktionellen Veränderungen bei Variation des kolloid-osmotischen Drucks (BSA Albumin). Bemerkenswert ist die deutliche Erniedrigung des Perfusionswiderstands mit steigendem kolloid-osmotischem Druck (Albuminkonzentration) offenbar über die Expansion des Gefäßbettes. Kolloidfreie Perfusionen wurden im single-pass Modus durchgeführt, die Perfusionen mit Albumin (BSA) im Modus 3 (Rezirkulation mit Regeneration des Medium durch Dialyse).

10.1.1. Perfusionsrate, Urinzeitvolumen, GFR und Filtrationsfraktion in Abhängigkeit von der Albuminkonzentration

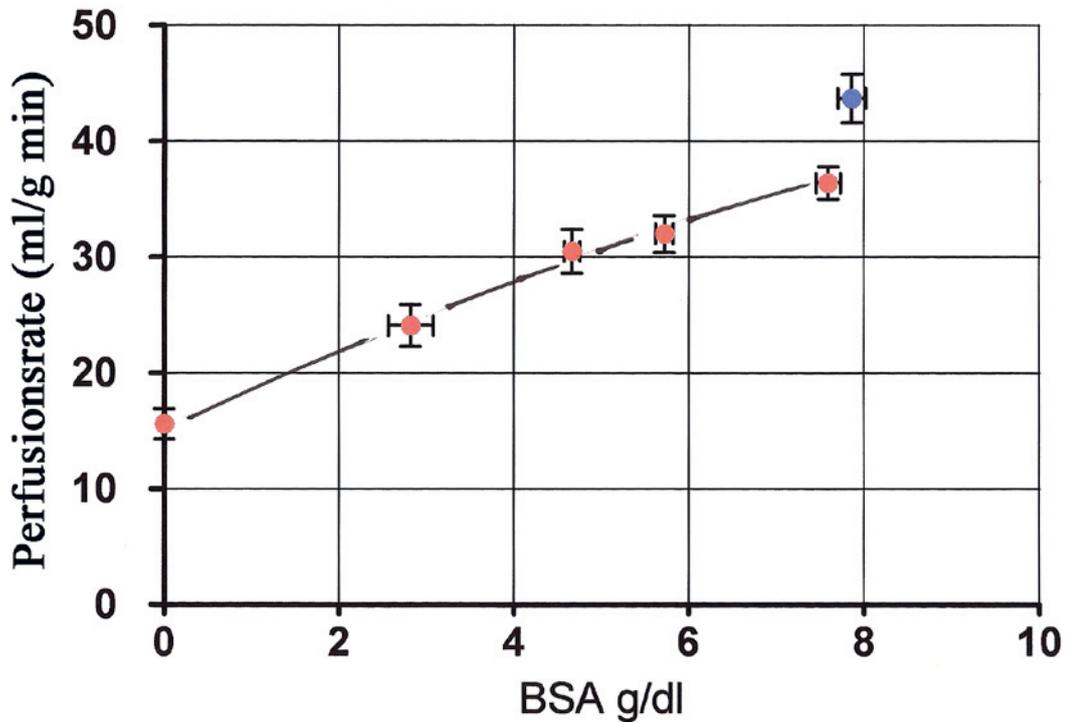


Abb. 10.1.0.: Beziehung zwischen Perfusionsrate und Albuminkonzentration im Perfusat.

Die Perfusionsrate in der "steady state" Phase ist zwischen 50-70min in Abhängigkeit von der Albumin-Konzentration aufgetragen. Nur die kolloidfreie Perfusion erfolgte im single-pass Modus (241) (240), hier noch mit intakter Kapsel, sonst im Modus 3 (Rezirkulation mit Dialyse). Die Perfusionsrate liegt mit Dekapsulierung deutlich höher – wie bei 2-3g BSA. Mittelwerte \pm SEM (Perfusionsdruck: kolloidfreies Medium 90mmHg, sonst 100mmHg). Unter Verapamil (blauer Punkt) bei hoher BSA-Konzentration liegt der Fluss höher (hier Perfusionsdruck Pa: 140mmHg, um eine vergleichbare GFR von 1ml/min·g Niere zu erreichen)(240).

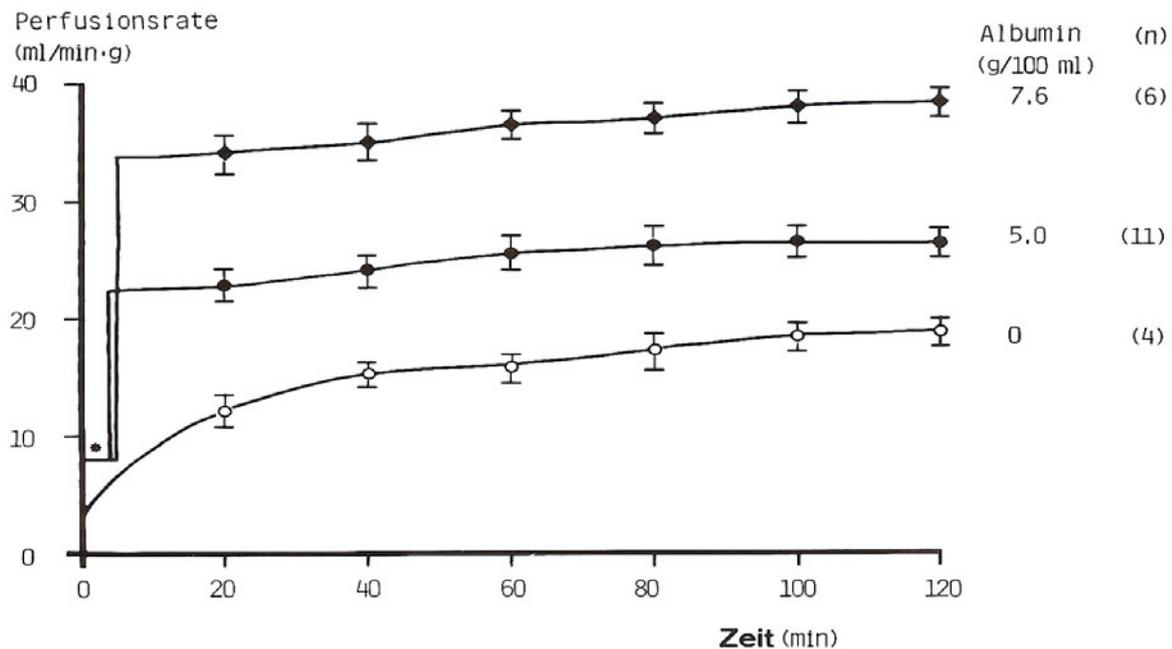


Abb. 10.1.1.: Zeitabhängiger Verlauf der Perfusionsrate bei unterschiedlicher Albuminkonzentration im Perfusat. *Die Perfusion wurde initial flusskonstant bei 8ml/min durchgeführt bis zur Schließung des Rezirkulationskreislaufts, dann druckkonstant bei 100mmHg. Bei Perfusion ohne Albumin "single pass" Anordnung ohne Rezirkulation, hier ohne systematische Dekapsulierung, bei einem Pa von 90mmHg, Mittelwerte \pm SEM. (241). Durch eine Dekapsulierung liegen die Flussraten bei Perfusion ohne Albumin besonders initial deutlich höher.

Die Perfusionsraten steigen proportional mit der höheren Albuminkonzentration, aber trotz dem damit verbunden höherem Sauerstoffangebot sind die morphologischen Schäden im äußeren Mark der Interbündelregion damit nicht zu beheben, sondern erst wenn Sauerstoffträger hinzukommen und damit die kritische O₂-Versorgung beenden (253). Man muß sich vor Augen halten, daß in vivo zwar nur 8% des O₂-Angebotes aus dem Blut extrahiert werden, Areale wie das äußere Mark aber bis zu 80% entnehmen. Bei zellfreier Perfusion sind es aber für die Gesamtniere ca. 50% des physikalisch gelösten O₂, die aufgenommen werden, da kann man sich leicht vorstellen, daß es im Interbündelareal des äußeren Marks zu knapp wird mit der O₂-Versorgung.

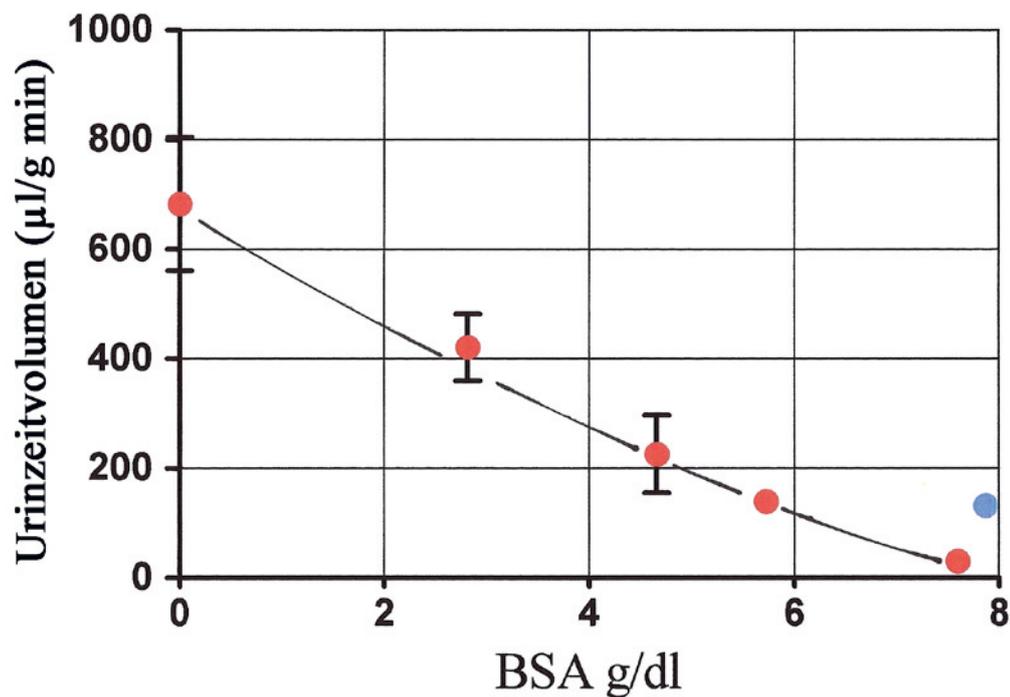


Abb. 10.1.2.: Beziehung zwischen Urinzeitvolumen und Albuminkonzentration im Perfusat.

Das Urinminutenvolumen ist in der „steady state“ Phase zwischen der 50-70 min gegen die BSA-Konzentration aufgetragen. Der blaue Punkt markiert wie bei Abb. 10.1.0. den Wert des Urinminutenvolumens bei Perfusion unter erhöhtem Druck (140mmHg) und dem Einfluss von Verapamil, die Graphik wurde aus den Tabellen von 1981 kreiert (240).

Die hohen Urinflussraten bei kolloidfreiem Perfusat können nur erreicht werden, wenn die Nieren dekapsuliert sind und wenn Ureterkatheter verwendet werden, die keinen Rückstaudruck aufbauen (s.a. Abb. 4.4.2 – 4.4.4). Parallel sind die Filtrationsraten höher als in vivo, wie man es nach Starling auch erwarten würde (277), s. folgende Abb. 10.1.3.

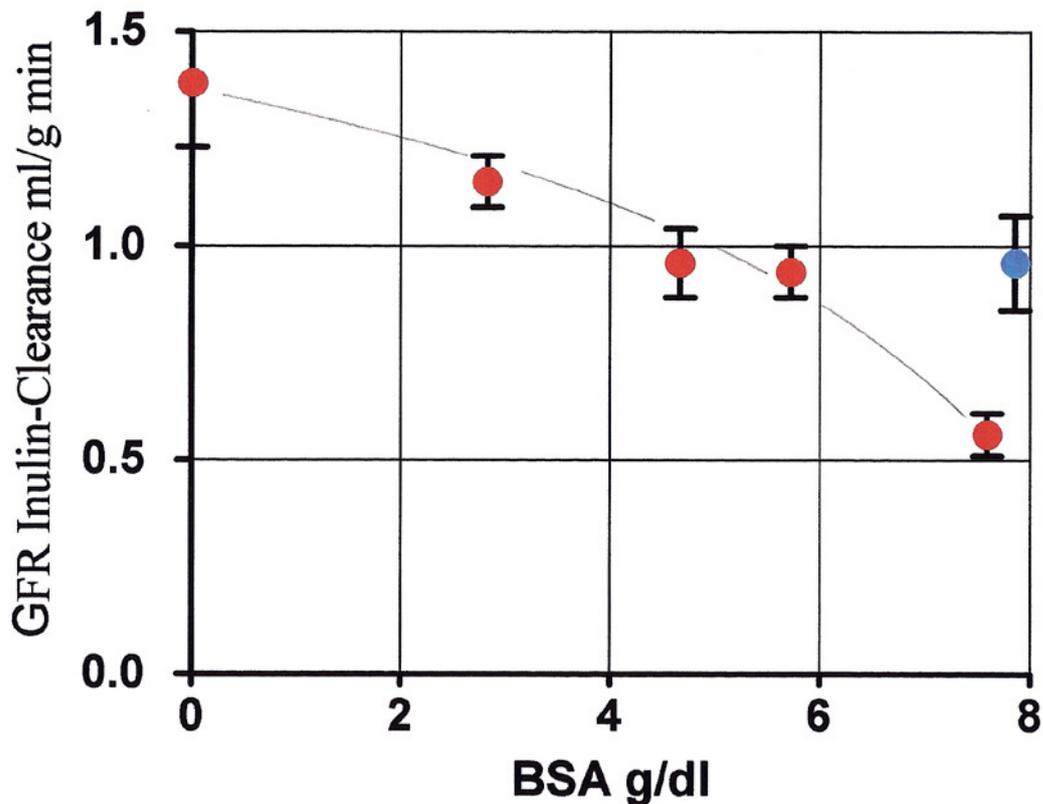


Abb. 10.1.3.: Glomeruläre Filtrationsrate (Polyfructosan-Clearance) in der steady state Phase (50-70min) in Abhängigkeit von der Albuminkonzentration. Bei hohem COP (BSA 8g/dl) ist die GFR durch Verapamil auf das "Normalniveau" wie bei 6g BSA anzuheben mit einem Perfusionsdruck von 140mmHg. Mittelwerte \pm SEM. Die GFR zeigt eine deutliche Abhängigkeit vom COP (BSA) wie man es nach Starling auch erwarten würde (240, 277), auf das "erratic behavior" wurde hingewiesen (Kapitel 4.6.3., Abb. 4.4.3.). Der blaue Punkt markiert wie bei Abb. 10.1.0. den Wert der GFR bei Perfusion unter erhöhtem Druck (140mmHg) und dem Einfluss von Verapamil. Das ist die Voraussetzung für einen Leistungsvergleich einer mit 6g% BSA mit einer mit 8g% BSA-Lösung perfundierten Niere in Bezug auf die absolute und fraktionelle Natrium-Resorption, s. hierzu die Abb. 10.2.3 – 10.2.5).

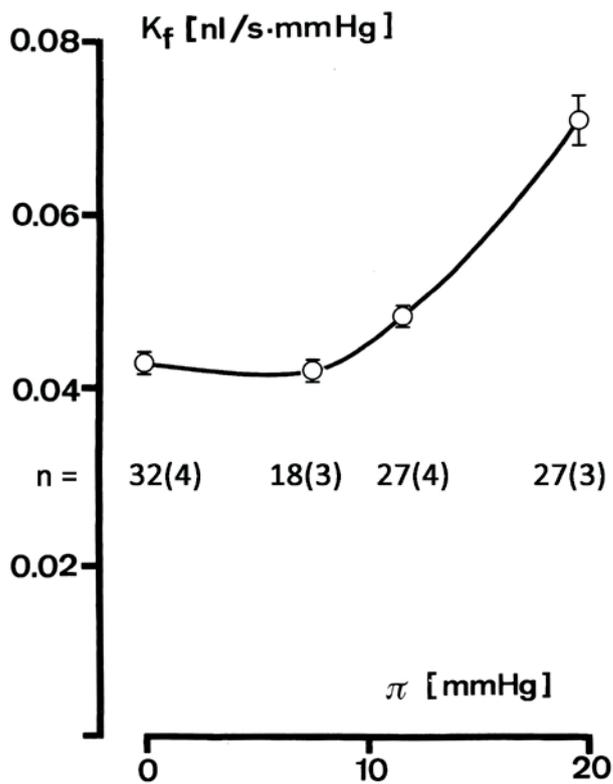


Abb. 10.1.4.: Glomerulärer Ultrafiltrationskoeffizient in Abhängigkeit vom kolloid-osmotischen Druck (COP). Der überraschende Befund einer höheren hydraulischen Leitfähigkeit bei höherer Albuminkonzentration (240) war bereits früher unter in vivo Bedingungen gemessen worden (20), wobei dies mit der Einschränkung zu werten ist, dass die Filtrationsbedingungen in vivo nicht so übersichtlich sind wie an der isoliert perfundierten Niere mit ihrer niedrigen Filtrationsfraktion, s.a. Abb. 10.1.5. Eine gute Erklärung für dieses Phänomen steht aus.

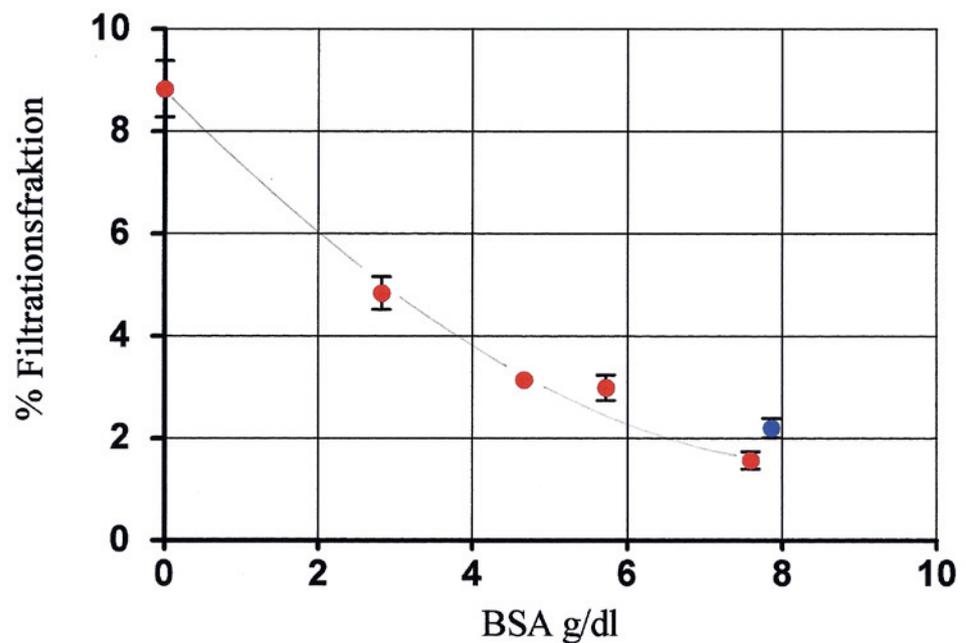


Abb. 10.1.5.: Filtrationsfraktion in der steady state Phase (50-70min) in Abhängigkeit von der Albuminkonzentration (BSA) (240). Der blaue Punkt entspricht dem Verapamilzusatz wie oben. Mittelwerte \pm SEM.

10.1.2. Das Problem der Bezugsgröße Nierengewicht

Allgemein wird bei Perfusion der rechten Niere die linke, nichtperfundierte und dekapulierte Niere als Gewichts- und Bezugsbasis genutzt und auf 1g Organgewicht bezogen. Kontrollen haben gezeigt, dass der Gewichtsunterschied zwischen beiden Nieren vernachlässigbar klein ist. Das Vorgehen erscheint deshalb praktikabel. Einige Autoren geben nur das durchschnittliche Rattengewicht an und beziehen daher nicht auf 1g Niere, sondern den Perfusionsfluss z.B. nur auf eine Minute (ml/min).

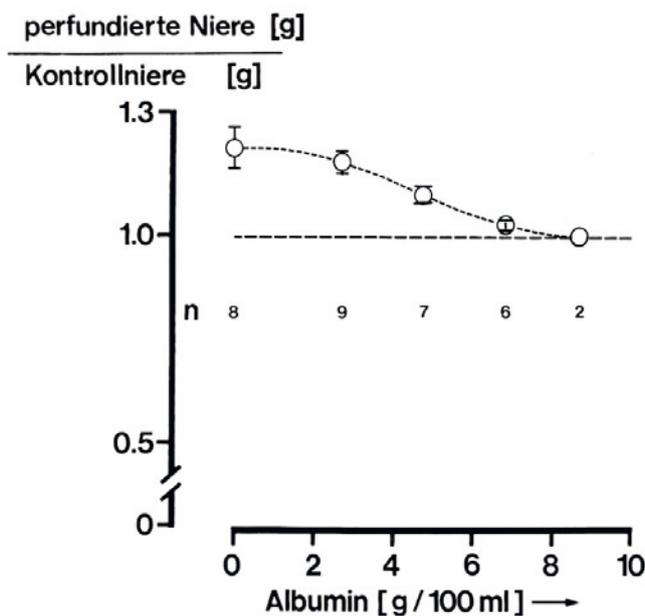


Abb. 10.1.6.: Gewichtsquotient zwischen perfundierter Niere und kontralateraler Kontrollniere.

Abhängigkeit von der Albuminkonzentration im Perfusat als Ausdruck der Schwellung der Niere bzw. als Ausdruck der intratubulären und interstitiellen Druck- und Volumenzunahme. Mittelwerte \pm SEM.

Die Abb. ist der Arbeit von 1981 entnommen (240, 241) und den Daten von Little vergleichbar (145). Die ohne Albumin oder Kolloid perfundierten Nieren waren während der Perfusion nicht dekapuliert, erst unmittelbar vor dem Wiegen, um Fettreste an Kapsel und Hilus nicht mit zu erfassen. Wird die linke kollaterale Niere mit einer Ligatur komplett ligiert (Vene und Arterie, was selten notwendig ist, z.B. wenn die linke Nierenarterie sehr versteckt unter der Vene verläuft) und nicht wie in der Regel nur durch Ligatur der Arteria renalis sinistra, ist das Gewicht nach Entnahme im Vergleich ca. 0,2g höher. Das dürfte damit zusammenhängen, dass bei offener venöser Gefäßseite die entsprechende Flüssigkeitsmenge aus Tubuli und Venen austreten kann und wird, sobald die Nierenarterie allein unterbunden ist.

und Arterie, was selten notwendig ist, z.B. wenn die linke Nierenarterie sehr versteckt unter der Vene verläuft) und nicht wie in der Regel nur durch Ligatur der Arteria renalis sinistra, ist das Gewicht nach Entnahme im Vergleich ca. 0,2g höher. Das dürfte damit zusammenhängen, dass bei offener venöser Gefäßseite die entsprechende Flüssigkeitsmenge aus Tubuli und Venen austreten kann und wird, sobald die Nierenarterie allein unterbunden ist.

Vergleich von Feuchtgewicht und Trockengewicht in vivo und ex vivo.

Petra Brandt hat in Ihrer Dissertation 1976 in Berlin (35) über den Elektrolytgehalt von Nierengewebe sehr ausführlich das Verhältnis von Feucht- zu Trockengewicht des Nierengewebes bestimmt und dazu den Vergleich von in vivo entnommenen und mit Haemaccel perfundierten Nieren beschrieben. Bei in vivo Nieren wurde zunächst die klassische Methode angewandt: frisch entnommene und feucht geschnittene Nierenstücke aus der Nierenrinde, die aliquotiert wurden, ein Teil nach dem Wiegen separiert zur Trockengewichts-Bestimmung. Dabei ergab sich eine Proportion von $26,0 \pm 0,48\%$ Trockengewicht bezogen auf 100% Feuchtgewicht. Bei der Aufarbeitung isoliert perfundierter Nieren erwies sich dieses Verfahren als nicht gut geeignet, weil diese Nieren mehr Flüssigkeit einlagern

und beim Schneiden entsprechend mehr Flüssigkeit verlieren. So wurde das von Reinhardt in seiner Habilitationsschrift beschriebene Verfahren genutzt, Nieren innerhalb von 2 Sekunden bei abgeklemmtem Hilus in flüssigem Stickstoff einzufrieren und davon Gewebeproben in gefrorenem Zustand aufzuarbeiten (206). Das ergab für die in vivo Kontrollen dann Werte von $20,0 \pm 0,31\%$ Trockengewicht bezogen auf 100% Feuchtgewicht. Bei mit Haemaccel im single-pass perfundierten Nieren lagen die Werte bei $16,85 \pm 0,21\%$ Trockengewicht bezogen auf 100% Feuchtgewicht und einem Standardperfusat mit Glukose als alleinigem Substrat. Eine Prozedur dieser Art wäre für den obigen Zweck sicherlich übertrieben, war aber im Zusammenhang mit den Elektrolyt-Analysen in der Arbeit von Petra Brandt angemessen bzw. essentiell. In dieser Arbeit wird auch das Problem diskutiert, das den Vergleich einer mit Blut gefüllten und einer zellfrei perfundierten Niere betrifft (35).

Proportion Nierengewicht (links)/Rattengewicht (Wistar-Hannover)

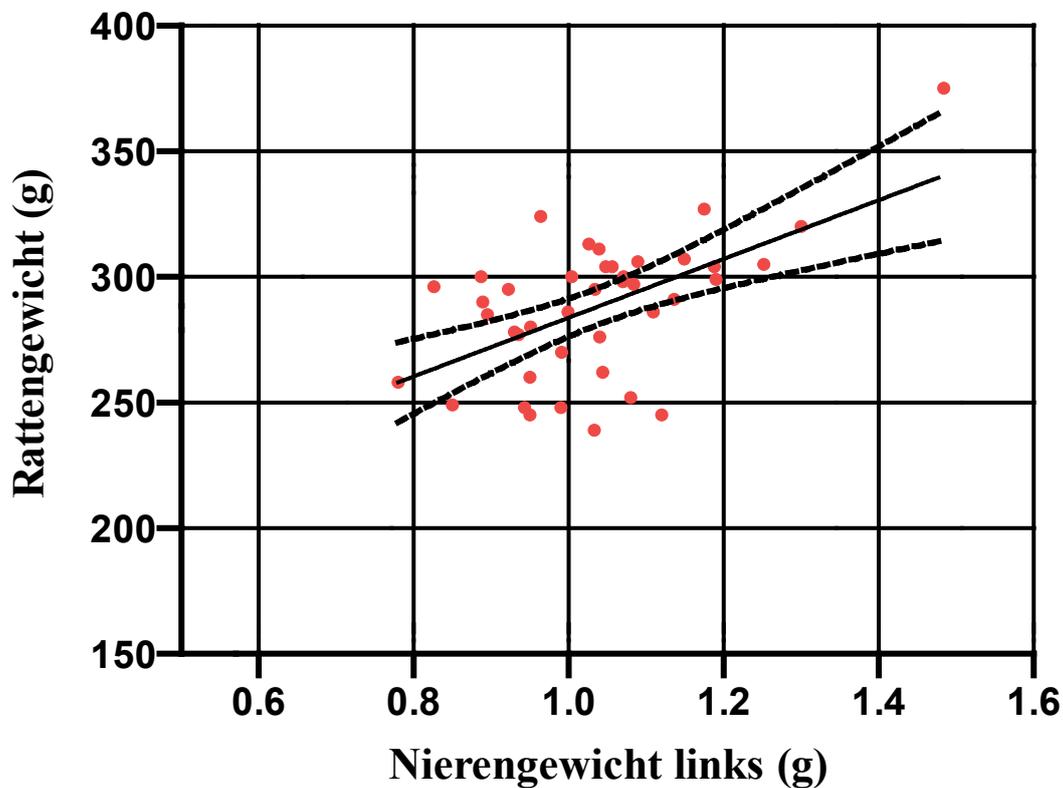


Abb.: 10.1.7. Verhältnis zwischen dem Gewicht der arteriell ligierten linken Niere und der Ratte als Bezugsgewicht für die Berechnung der Nierenfunktion/g der rechten IPR-Niere. Rattenstamm: Hannover Wistar.

10.1.3. Autoregulation der Flussrate

Zu diesem Thema gibt es eine umfangreiche Literatur, sowohl für die in vivo Niere als auch für isoliert perfundierte Nieren (87, 88, 199, 262, 295). Grundsätzlich muss unterschieden werden zwischen zellfreien Lösungen wie Blutplasma und künstlichen kolloidhaltigen Lösungen, die als Newtonsche Flüssigkeiten zählen können und Blut als einer inhomogenen Suspension von Partikeln. Für Newtonsche Flüssigkeiten gilt das Gesetz von Hagen-Poiseuille, d.h. auch dass keine lineare Beziehung besteht zwischen Druck und Fluss (s.a. Abb. 10.2.2.). Für Blut sind die Verhältnisse komplizierter.

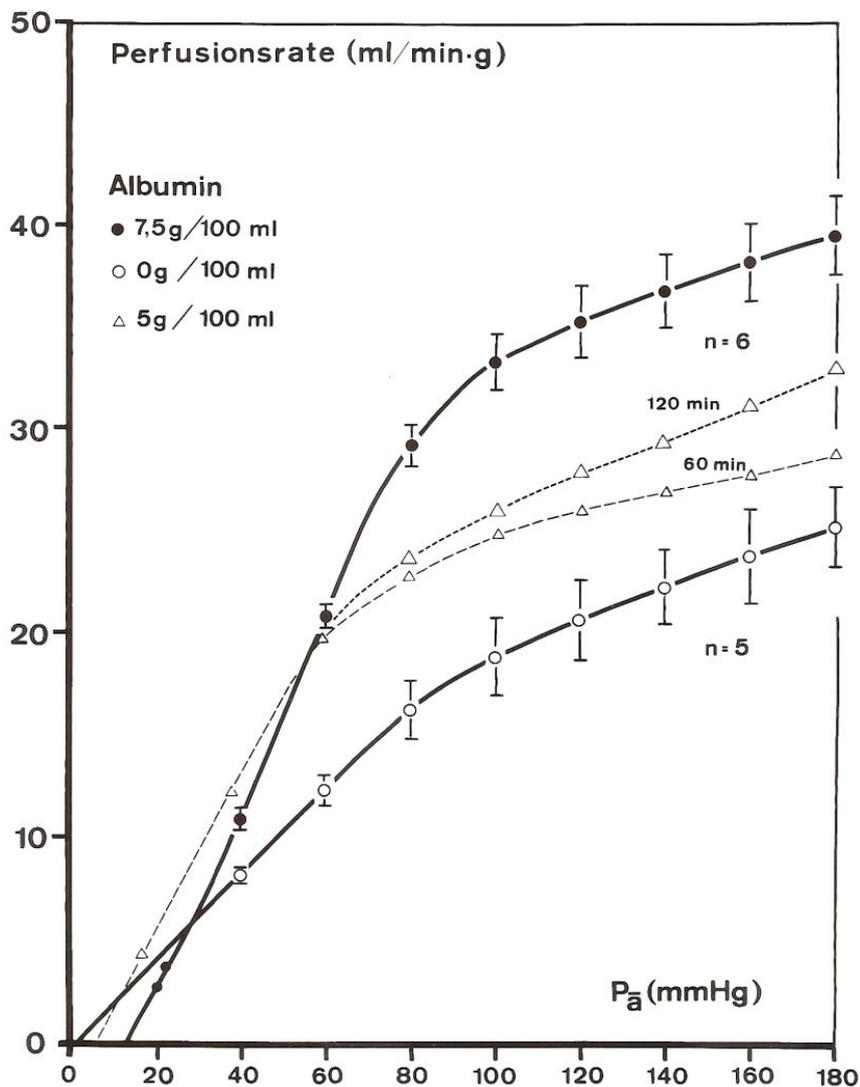


Abb. 10.2.0.: Vergleich der Autoregulation der Perfusionsrate in Abhängigkeit von der Albuminkonzentration bzw. vom COP (240). Die Messung der Autoregulation wurde nach 2-stündiger zellfreier Perfusion in Druckstufen von 20mmHg gemessen, Konzentration von Albumin 0g und 7,5g/100ml. Bei 5g% Albumin ist ein Einzelexperiment mit einer Autoregulationskurve nach 60min und der Veränderung nach 120min dargestellt. Mittelwerte \pm SEM.

Die Autoregulationskurve ohne Albumin im Perfusat verläuft sehr flach und ist nicht weit entfernt von der Kurve, die auch ohne Niere entstanden wäre, wenn die Niere durch einen definierten Strömungswiderstand ersetzt wird (s. Abb. 10.2.2.). Bei zellfreier Perfusion ist ein TGF – tubulo-glomerulärer Feedback – nicht nachweisbar, der die Autoregulation erst komplettiert (240).

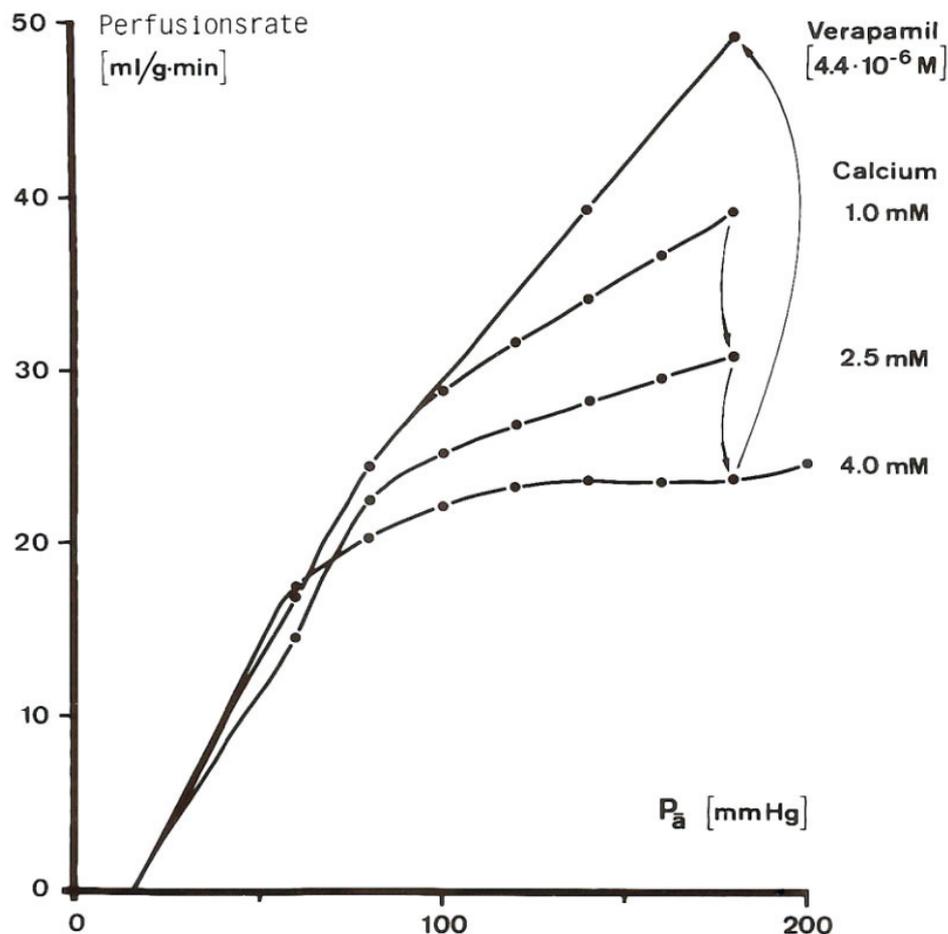


Abb. 10.2.1.: Abhängigkeit der Autoregulation der Perfusionsrate von der Kalziumkonzentration im Perfusat (Einzelexperiment).

Aufhebung der Autoregulation durch Verapamil ($4,4 \times 10^{-6}$ molar) (166, 240, 243). Die Abweichung der Kurve unter dem Einfluss von Verapamil von einer linearen Beziehung ist dem Hagen-Poiseuille Gesetz zuzuschreiben. Der Einfluss von Kalzium im Perfusat ist ganz dominant. Von Verapamil ist schon seit 1976 bekannt, dass es auch den tubulo-glomerulären Feedback hemmt (166), dem eine Rolle zukommt bei der Etablierung der kompletten Autoregulation. Die Konzentration von Kalzium wurde aus der sukzessiven Zugabe errechnet (240). Bei mittlerer Konzentration von Kalzium kann Angiotensin II Zugabe die Autoregulation so verstärken wie bei 4mmol/l Kalzium; siehe hierzu auch Guan et al. (88). Glukagon hebt die Autoregulation an der IPRK komplett auf, wie Franke zeigen konnte (76).

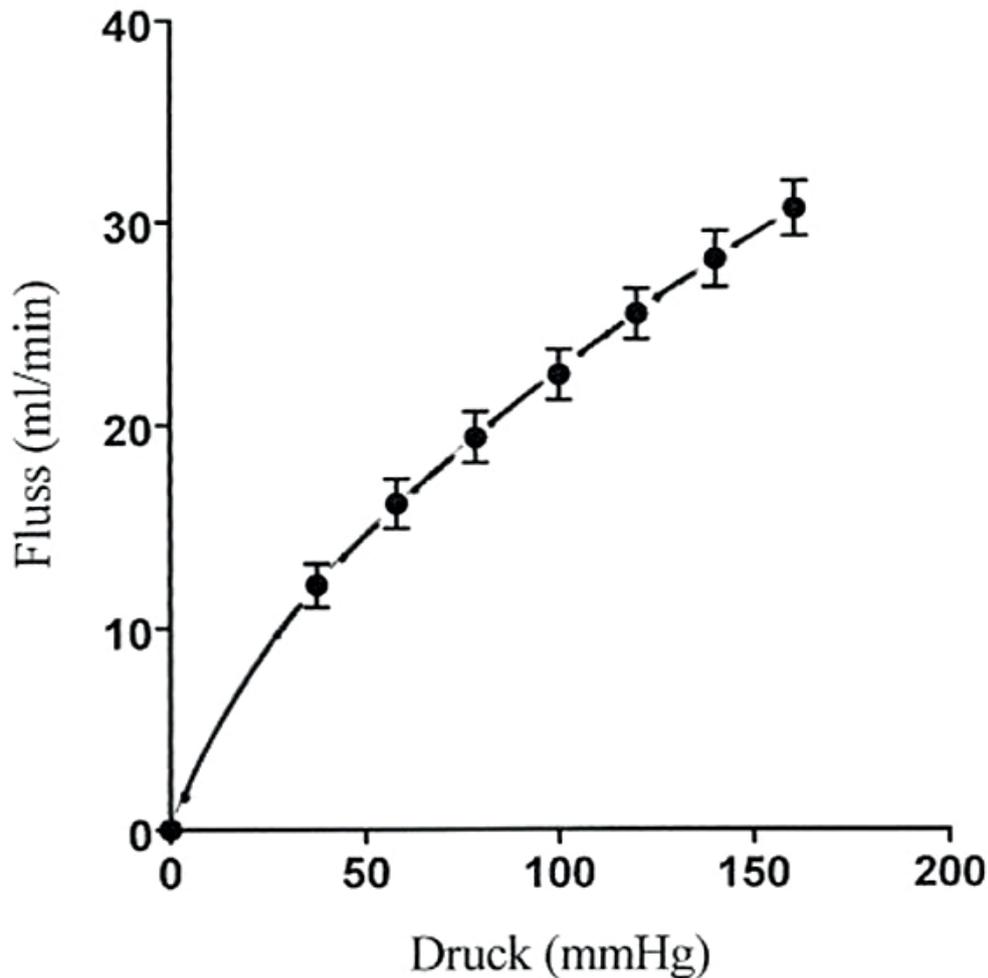


Abb. 10.2.2.: Druck-Fluss Diagramm der Apparatur ohne Niere. Das Druck-Fluss Diagramm der Perfusionsapparatur folgt dem Gesetz von Hagen-Poiseuille und ist dementsprechend unlinear. Die Kurve ist experimentell ermittelt mit einer 4% HAES-Lösung & einem komprimierten Schlauch als Nierenersatz temperiert auf 37°C. Wie Abb. 10.2.1. zeigt, ist die Verapamilkurve vergleichbar der hier experimentell ermittelten Kurve des Systems ohne Niere.

Das Hagen-Poiseuille-Gesetz:

$$\dot{V} = \frac{dV}{dt} = \frac{\pi \cdot r^4}{8 \cdot \eta} \frac{\Delta p}{l} = - \frac{\pi \cdot r^4}{8 \cdot \eta} \frac{\partial p}{\partial z}$$

\dot{V} = Volumenstrom durch ein Rohr in m³/s

r = Innenradius des Rohres in m

l = Länge des Rohres in m

η = dynamische Viskosität der strömenden Flüssigkeit in Pa · s

Δp = Druckdifferenz im Rohr in Pa

z = Flussrichtung

Pa = Pascal

Was folgt hieraus für die Autoregulation der Durchblutung bzw. Perfusion am Modell der isolierten Niere?

In der Pionierarbeit von Weiss, Passow und Rothstein aus dem Jahre 1959 war der Beleg erbracht (295), dass es zur Autoregulation keiner Blutzellen bedarf. Kinter und Pappenheimer hatten das Phänomen des Plasmaskimming noch für die alleinige Ursache der Autoregulation propagiert (116, 186), dies konnte danach nicht mehr gehalten werden wenn auch ein zellfreies Perfusat eine Autoregulation der Nierenperfusion zeigt. Für die in vivo wie die in vitro Niere gilt der Bayliss-Effekt (21) als die Basis für die Autoregulationsphänomene, hinzu kommt der tubuloglomeruläre Feedback, der an der zellfrei perfundierten Niere in unseren Händen nicht nachweisbar ist (Untersuchungen im Labor in Hannover zusammen mit U. Gutsche und R. Brunkhorst, unveröffentlicht), an der mit Blut perfundierten Hundeniere von Jürgen Schnermann aber gezeigt werden konnte (229). Als dritte Komponente kommt das erwähnte Plasmaskimming in Betracht, spielt aber für die zellfrei perfundierte Niere keine Rolle. Hinweise für eine vierte Komponente ergeben sich aus Befunden der Arbeitsgruppe von B. Flemming und E. Seeliger in Berlin (73, 262), ob dies am isolierten Organ eine Rolle spielt muss vorerst offen bleiben. Unsere eigene Erfahrung ist, dass am Modell der IPRK Hypoxie die Autoregulation abschwächt, dass Angiotensin II und eine erhöhte Calciumkonzentration die Autoregulation verstärkt. Unter den zuletzt genannten Bedingungen kann man eine nahezu perfekte Autoregulation erreichen ohne funktionierenden tubuloglomerulären Feedback (s.a. Kapitel 12.3, Abb. 12.3.7).

Aus Einzelbeobachtungen können wir schließen, dass auch Peptidhormone wie Arginin-Vasopressin (AVP) und vor allem auch Parathormon (PTH) die Autoregulation verstärken können.

10.1.4. Natrium-Resorption fraktionell und absolute Transportrate T_{Na}

Der Natriumtransport ist ein gutes Kriterium zur Einschätzung der Funktion isolierter Nieren. Will man die Transportleistung vergleichen, ist der Bezugspunkt auf das Nierengewicht ebenso relevant wie der Bezug auf die GFR. Eine fraktionelle Natriumresorption von >99% wie in vivo ist in vitro bei zellfreiem Perfusat nicht zu erreichen und bei reduziertem Filtrat nur bei Erythrozytenzusatz und zusätzlichen Manövern wie z.B. Glutathiongabe und überhöhtem Kreatininzusatz (50mg%, siehe hierzu (154, 155)). Thomas Maack hat dies in zwei Reviews ausführlich diskutiert und plädiert für den Einsatz hoher Albuminkonzentrationen im Perfusat um den kolloid-osmotischen Druck zu erreichen, der in vivo im Kapillarbett der proximalen Tubuli durch die hohe Filtrationsfraktion erreicht wird. Am isolierten Nierenpräparat kann dies wegen der niedrigen Filtrationsfraktion nur erreicht werden, wenn man ein stark reduziertes Filtrat in Kauf nimmt (s.a. Abb. 3.0.1). Die folgenden Abbildungen zeigen die Abhängigkeiten des Natriumtransports v.a. von der filtrierte Natriummenge (Na-Load). Die eingesetzten Perfusionslösungen sind substratangereichert wie 1981 beschrieben (240, 241).

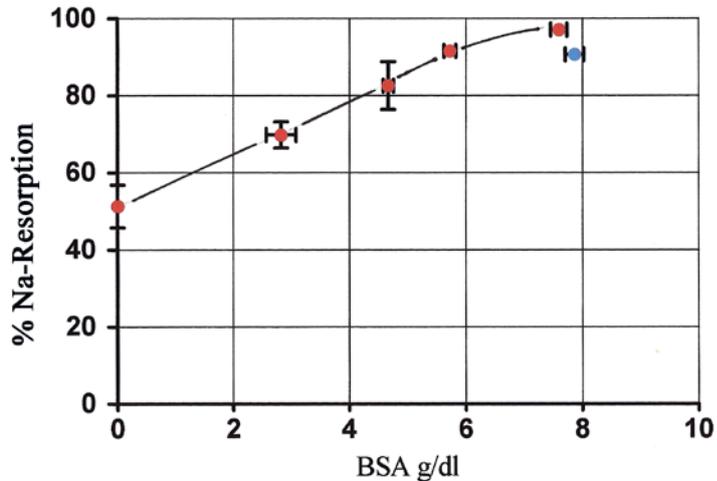


Abb. 10.2.3.: Fraktionelle Natriumresorption in der steady state Phase (50-70min) in Abhängigkeit von der Albuminkonzentration (BSA). Mit Verapamil bleibt die %Na-Resorption bei hohem COP im Niveau der niedrigeren COP-Werte von 6g Albumin bei vergleichbarer GFR. Mittelwerte \pm SEM, s.a. Abb. 10.2.4.. Die hohe fraktionelle Natriumresorption von >98% ist von einer zellfrei isoliert perfundierten Niere nur bei reduzierter GFR mit hyperonkotischem Perfusat zu erreichen.

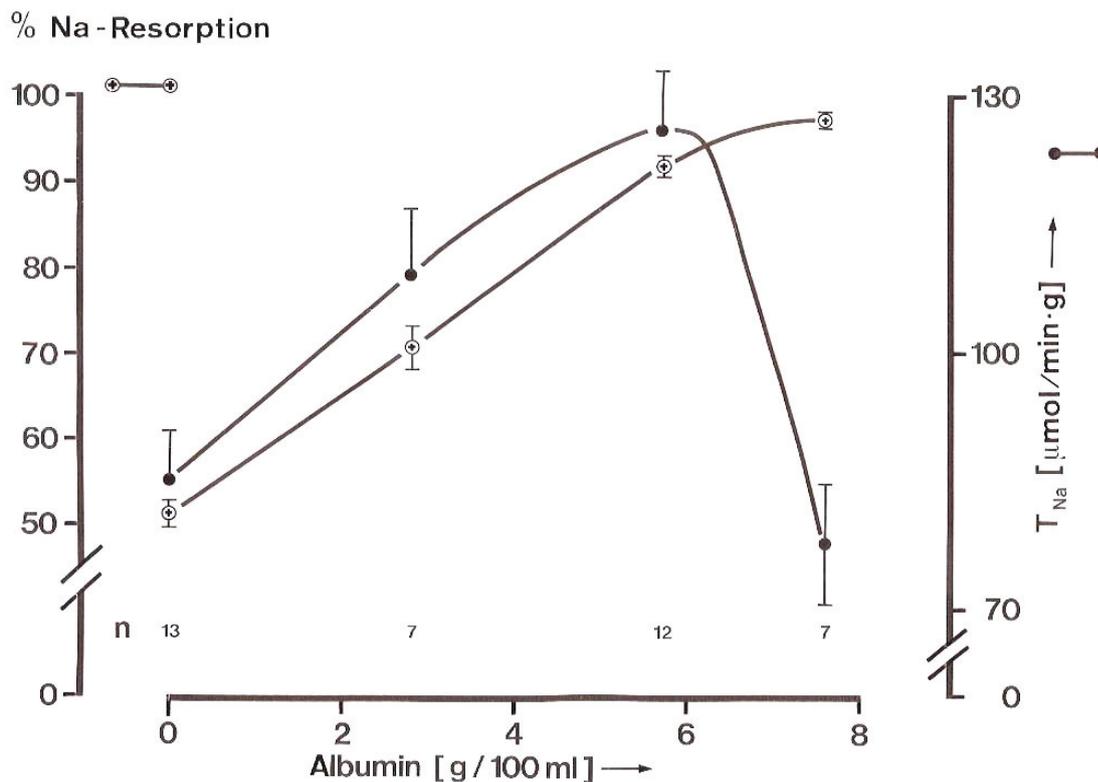


Abb. 10.2.4.: Fraktionelle Natriumresorption und absoluter Natriumtransport T_{Na} in der steady state Phase (50-70min) in Abhängigkeit von der Albuminkonzentration (BSA). Bei kolloidfreiem Medium wird nur ca. 50% des filtrierte Natriums resorbiert, s.a. Abb. 10.2.5. Mittelwerte \pm SEM (240).

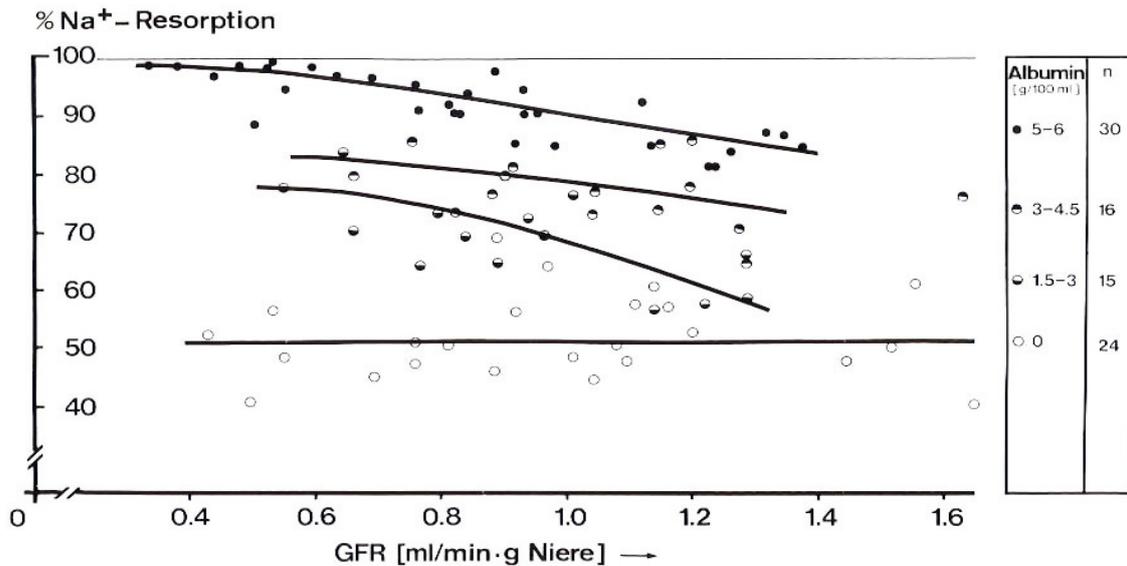


Abb. 10.2.5.: Fraktionelle Natriumresorption in der steady state Phase (50-70min) in Abhängigkeit vom COP (BSA) und der GFR. Bei kolloidfreiem Perfusat liegt die Resorption im Mittel bei 50% unabhängig von der GFR, bei höherem COP dagegen sieht man die deutliche Abhängigkeit vom Natrium-Load. Einzelwerte (240, 241). Die Resorptionsleistung reduziert sich zeitabhängig deutlich in der 2. - 3. Stunde.

10.1.5. Glukose-Resorption

Dass keine höhere fraktionelle Resorption erreicht wird hängt mit den durch Hypoxie induzierten Schäden proximaler Tubuli (S_3 -Segmente) im Interbündelareal des äußeren Marks zusammen und der leicht erhöhten Glukosekonzentration im Perfusat (8,4mM/l). Zusatz von 5% Erythrozyten vermeidet diese Schäden und die fraktionelle Glukose-resorption liegt deutlich höher im Vergleich als bei zellfreier Perfusion.

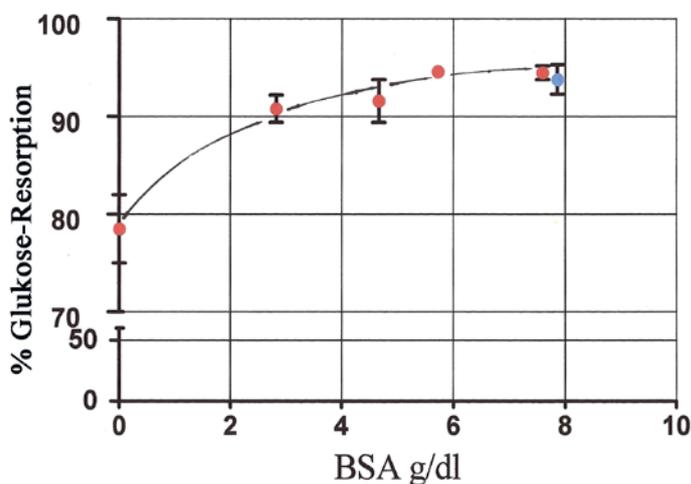


Abb. 10.2.6.: Fraktionelle Glukose-Resorption in der steady state Phase (50-70min) in Abhängigkeit von der Albuminkonzentration (BSA). Mit Verapamil (Pa 140mmHg) liegt die %-Resorption bei höherem Load (GFR) nur wenig niedriger im Vergleich als ohne Verapamil. Bei Erythrozytenzusatz von 5% liegt die fraktionelle Glukoseresorption > 95%, auch bei niedrigen BSA-Konzentrationen. Mittelwerte \pm SEM (240).

10.1.6. Kalium-Sekretion

Misst man die Kaliumsekretion bei Ratten unter Standardbedingungen in vivo im Stoffwechsellkäfig so findet man bei normaler Standardkost ca. 20% der filtrierten Kaliummenge im Endurin, das entspricht einem Wert von 0,2 ausgedrückt als Clearancequotient $K^+_{U/P}$: Kreatinin (Inulin) $_{U/P}$. Am Modell der IPRK fanden Silva et al. in einer 1975 publizierten Arbeit einen Clearancequotienten von 0,41 und unter diesen Bedingungen „niemals“ eine Netto Sekretion. Dies fand man nur bei Nieren von chronisch mit Kalium überfütterten Versuchstieren (266). Die niedrigen Werte dürften mit folgenden Bedingungen erklärt werden: hohe Albuminkonzentration im Perfusat von 6,5-6,8g% – was einem überhöhten COP entspricht – führen zu einer reduzierten GFR und niedrigeren Urinflussraten (kleinlumiger Ureterkatheter PE10). Zudem wurde ein substratarmes Perfusat mit lediglich 5mM Glukose verwendet. Unter unseren Bedingungen finden sich ganz andere Verhältnisse mit einer K^+ -Nettosekretion die von der Urinflussrate und dem Einsatz einer substratangeereicherten Perfusionslösung abhängig ist, ohne dass eine chronische Kaliumüberladung vorausgegangen war. Bei einer Albuminkonzentration von 5g% und niedriger finden sich höhere Urinflussraten und dies lässt auf einen rheogenen Effekt auf die Sekretion schließen. Erst bei sehr hohem COP im Perfusat und niedrigeren Urinflüssen liegt die Kalium-Ausscheidung niedriger und der Clearancequotient unter 1, also keine Netto-Sekretion mehr. 1979 publizierte die Autorengruppe von Silva Daten an isoliert perfundierten Nieren von adrenaletomierten Tieren, die nach Aldosteronzugabe einen schnellen Anstieg der Kaliurese zeigten, der durch Spironolakton gehemmt wurde. Der Aldosteroneffekt war nur zu sehen, wenn außer Glukose weitere exogene Metabolite zugegeben wurden wie Pyruvat, Laktat oder α -Ketoglutarat (272). Die Netto-Kaliumsekretion entspricht den Befunden, die wir in der Basisarbeit von 1975 bereits gezeigt haben und die im Mittel bis zu 213% der filtrierten Kaliummenge erreichte (247). Daraus kann man schließen, dass die Vorstimulation in vivo mit Aldosteron ausreichend lange vorhält für die Zeit der Perfusion.

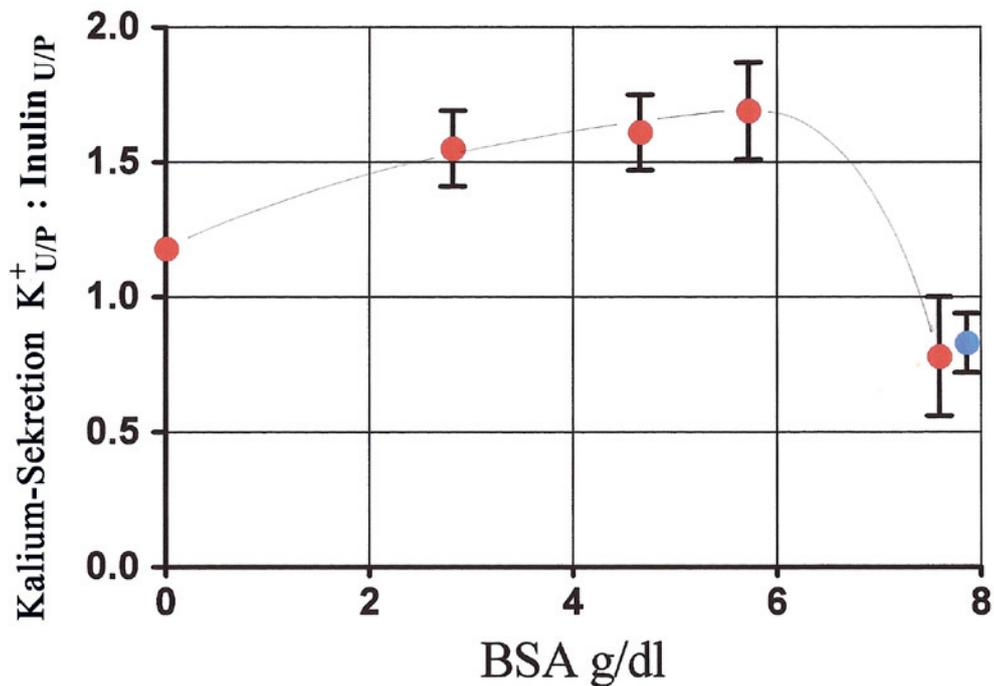


Abb. 10.2.7.: Kalium Sekretion in der steady state Phase (50-70min) bei substratange-reichertem Perfusat.

Abhängigkeit von der Albumin-Konzentration (BSA). Mittelwerte \pm SEM (240). Bis zu einer Albuminkonzentration von 6g% zunehmende Nettosekretion, erst bei 7,5g% Albumin, damit verbunden niedriger GFR und niedriger Urinflussrate war keine Nettosekretion mehr nachweisbar. Das blaue Symbol entspricht Versuchen, bei denen mit Verapamil und höherem Perfusionsdruck die GFR auf das Niveau von 6g% Albumin-Versuchen angehoben wurde.

Die in Abb. 10.2.7 gezeigte Beziehung zwischen Kaliumsekretion und Albuminkonzentration im Perfusat läßt erkennen, daß nur im Bereich hoher Albuminkonzentrationen (COP-Werte) keine Nettosekretion nachweisbar ist. Bei hohen Urinflußraten wie sie in diesen Experimenten bei Verwendung adaequater (nicht zu enger) Ureterkatheter auftreten, ist der rheogene Effekt auf die Kaliumsekretion deutlich erkennbar. Zudem ist der Befund von Silva (266), der eine Kaliumsekretion nur nach diätetischer Stimulation gesehen hat wohl auf 2 Unterschiede zurückzuführen, zum einen die Verwendung von PE10 Kathetern und zum andern auf ein substratarmes Perfusat (mit Glukose als alleinigem Substrat). In den Abb. 10.2.8. und 10.2.9. ist diesen Gesichtspunkten Rechnung getragen.

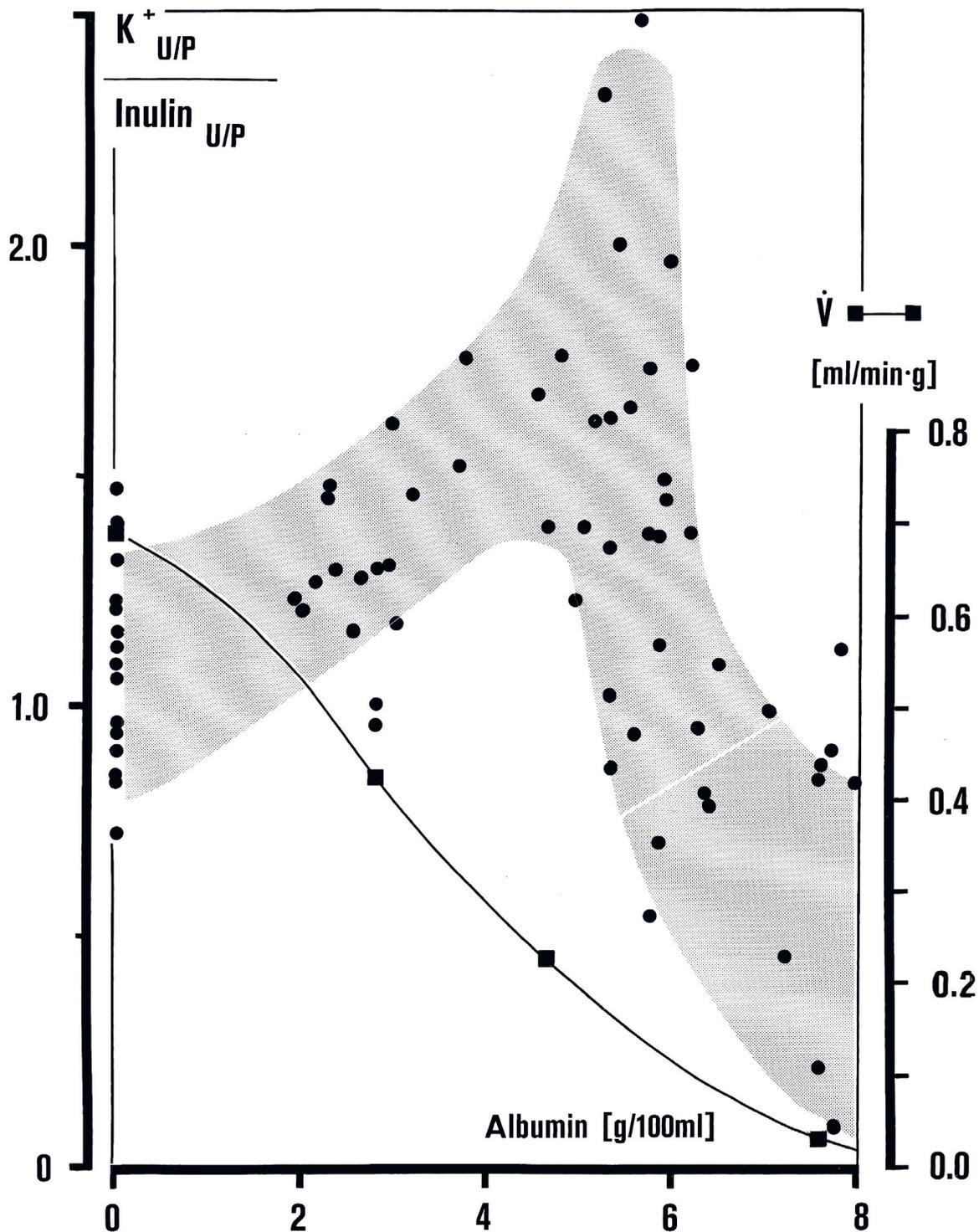


Abb. 10.2.8.: Kalium Sekretion in der steady state Phase (50-70min) in Abhängigkeit von der Konzentration an Albumin (BSA). Einzelwerte in Beziehung zum Urzeitvolumen das mit der Albuminkonzentration im Perfusat abnimmt (rechte Ordinate). Die hohe Sekretion ist ein Merkmal des mit Substraten angereicherten Perfusats (s. Abb. 10.2.9.). In vivo liegt der Bereich bei ca. 0,2, ein Wert, der an der IPRK nur bei sehr hohem COP erreichbar ist. Im schraffierten Bereich liegen die meisten Einzelwerte.

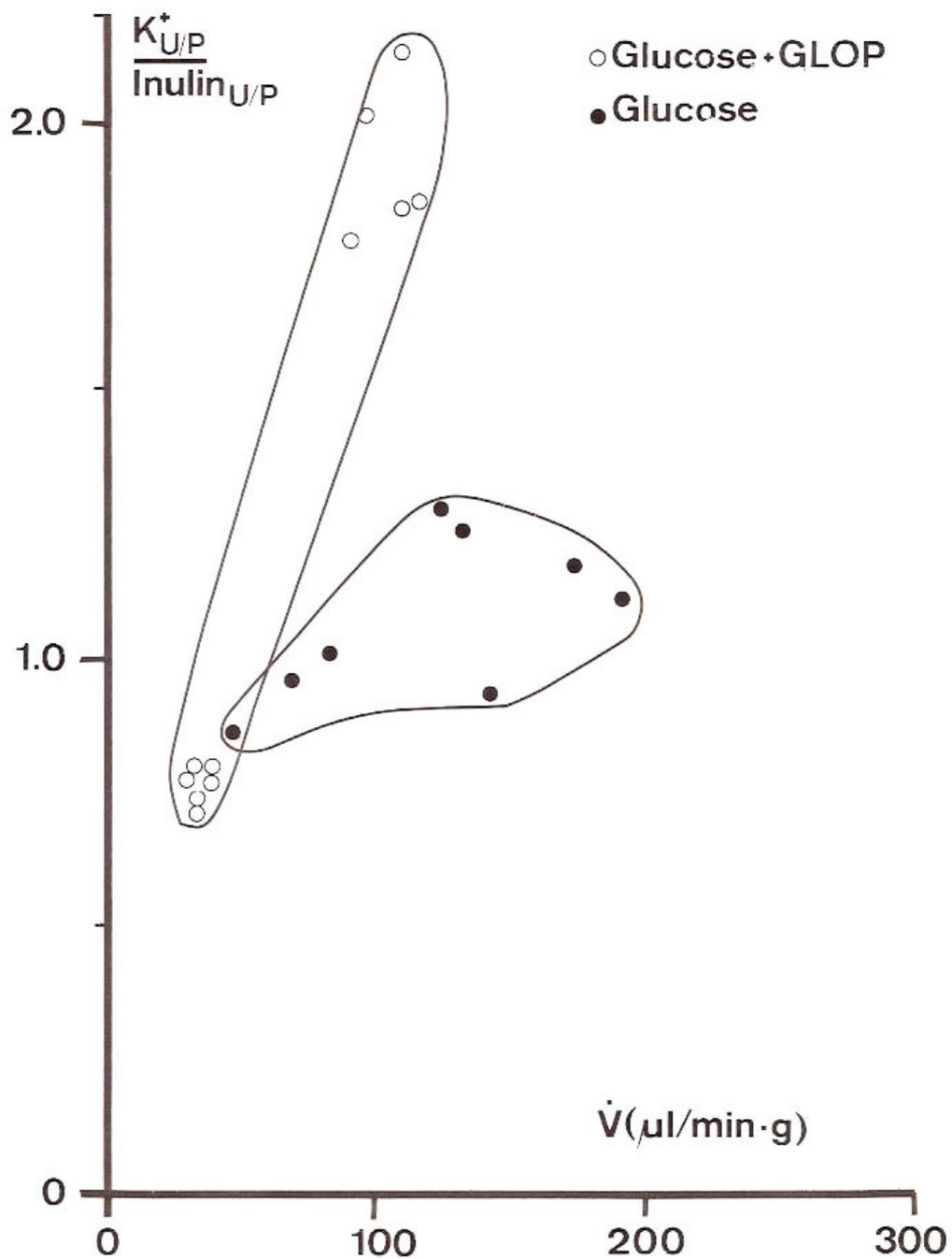


Abb. 10.2.9.: Kalium Sekretion in der steady state Phase (50-70min). Abhängigkeit vom Urinzeitvolumen und von Substratzusätzen: im Vergleich substratarmes (Glukose allein) zu angereichertem Perfusat (Glukose plus Glutamat, Laktat, Oxalazetat, Pyruvat und 8 Aminosäuren). Einzelwerte. Der in vivo Bereich bei Untersuchungen im Stoffwechsellkäfig liegt bei Standardkost und niedrigem Urinzeitvolumen \dot{V} („Antidiurese“) von unter $10\mu\text{l}/\text{min}$ bei einem Clearancequotienten von ca. 0,2.

10.1.7. Effizienz des Natrium-Transports in Bezug auf den Sauerstoffverbrauch.

Ein Vergleich des Natrium-Transports zwischen in vivo Niere und isolierter Niere führt zu der Frage, warum die in vivo Niere Natrium wesentlich effizienter transportieren kann. Die errechneten Quotienten in vivo zwischen T_{Na} und $\dot{Q}O_2$ liegen bei 18, d.h. 18 transportierte Natriummoleküle pro verbrauchten Sauerstoffmolekül. Die isolierte Niere schafft im Optimum mal einen Quotienten von 15. Als Ursache werden „backleak“ Phänomene diskutiert, die ja auch die verminderte absolute und fraktionelle Natrium-Resorption erklären könnten und bei kolloidfreiem Perfusat am deutlichsten erscheinen. Eine Ausnahmesituation ist unten beschrieben, bei der kurzfristig 18 erreicht wird.

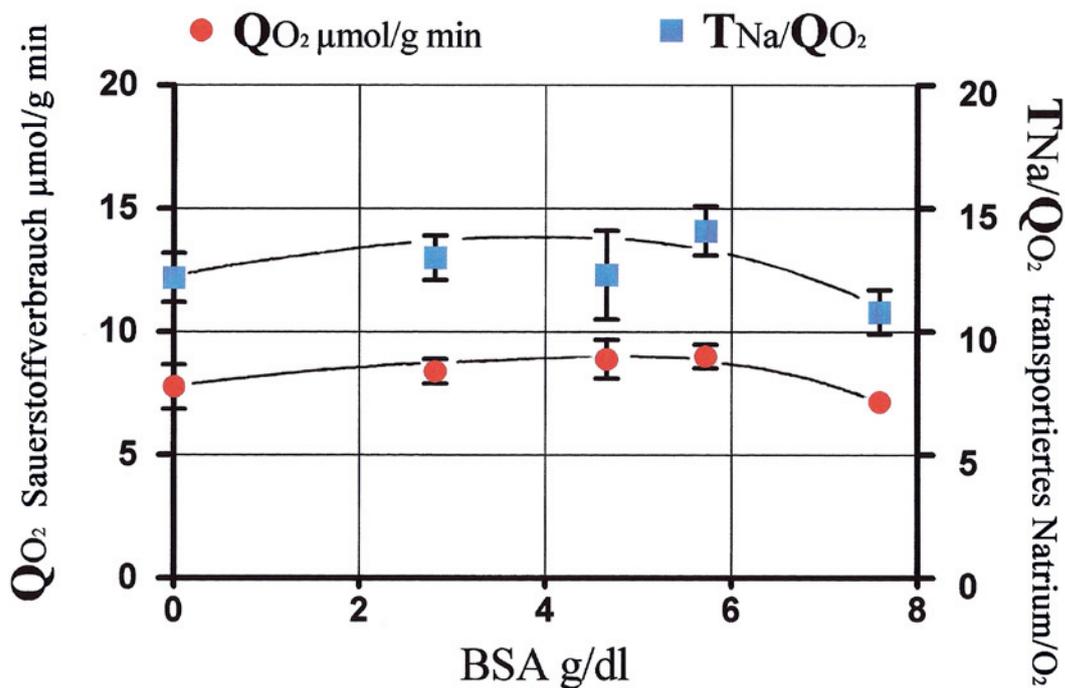


Abb. 10.3.0.: Sauerstoffverbrauch und $T_{Na}/\dot{Q}O_2$ in der steady state Phase (50-70min) bei substratangereichertem Perfusat. Abhängigkeit von der Albuminkonzentration (BSA). Mittelwerte \pm SEM.

In vivo Werte von einem $T_{Na}/\dot{Q}O_2$ von 18 können kurzfristig mit Zugabe von Glutathion, Cystein und 5% Erythrozyten erreicht werden, s.a. Tab. 11.1.6. 50 min nach Perfusionsbeginn, nach 100 min wieder Rückgang des Quotienten auf 16,3. Die hohe Effizienz geht offenbar zeitabhängig verloren, die Ursache dafür ist nicht klar erkennbar.

10.2. Rezirkulationsperfusion

Bei der single-pass Perfusion, die wir initial in Berlin noch mit dem Gelatinepräparat Haemaccel als Kolloid durchgeführt hatten, waren wir nach den anfänglichen Problemen mit der Stabilität des Perfusionswiderstands in der Folge nach Umstellung auf sterile Perfusionslösungen recht zufrieden mit einer guten Zeit an Stabilität über 2-4h (247). Die ersten Perfusionsexperimente in Hannover mit Einsatz von bovinem Serumalbumin (BSA) und Rezirkulationstechnik haben an alte Probleme erinnert. Nach 90 min kam es regelmäßig zu einem Abfall von Fluss und GFR bei druckkonstanter Perfusion. Der Einsatz von Filtern mit 8µm Porosität hat dies nicht wesentlich verändert, dennoch wurde die inline-Filtration als Technik beibehalten. Die Erinnerung an die recht stabilen single-pass Experimente haben dann – für einen Nephrologen naheliegend – zu der Lösung geführt, das Perfusionsmedium mit Hilfe einer Dialyse zu regenerieren. So konnte man das Dialysat mit einer Glasfritte begasen und das albuminhaltige Perfusat konditionieren, mit dem Erfolg der besseren Stabilität. Literaturrecherchen haben ergeben, dass die Dialysetechnik bereits 1967 durch Baumung und Peterlik in Wien an der isolierten Rattenleber eingesetzt worden war um die Azidoseinigung ihres Präparates zu kompensieren. S.a. im folgenden Abschnitt 10.3.

Tabelle 10.1. Funktionsparameter der isoliert perfundierten Niere bei Perfusion mit **5g Albumin/dl** und Verwendung eines a) Dialysatorkreislaufs und b) eines Membranoxygenators in Abhängigkeit von der Zeit. Mittelwerte \pm SEM, n = Zahl der Nieren, Pa 100mmHg.

Zeitraum (min)	Perfusion a)		a)		a)		a)	
	b)	b)	b)	b)	b)	b)	b)	
Perfusionsrate (ml/min·g)	22,9±0,9	24,9±1,1	26,2±1,3	27,5±2,1				
	26,1±1,9	25,8±1,8	25,3±1,6	*				
Urinfluss \dot{V} (µl/min·g)	128±21	166±25	201±28	255±33				
	111±18	121±19	124±22	*				
GFR Inulin-Clearance (ml/min·g)	0,96±0,04	0,95±0,03	0,96±0,04	0,98±0,06				
	0,85±0,05	0,79±0,06	0,66±0,09	*				
TNa (µmol/min·g)	126±6	116±4	113±5	112±8				
	112±7	102±7	82±10	*				
Na-Resorption %	91,6±1,6	87±2,1	83,3±2,4	81,3±2,5				
	90,8±1,7	89,3±1,4	87,3±1,6	*				
Glukose-Resorption %	94,9±0,3	93,5±0,8	91,9±1,0	90±1,8				
	96,9±0,2	95,5±0,5	91,0±1,3	*				
K_{UP}/Inulin_{UP}	1,50±0,13	1,47±0,09	1,30±0,08	1,22±0,09				
	1,15±0,07	1,04±0,07	0,97±0,07	*				
\dot{Q}_{O_2} (µmol/min·g)	7,93±0,29	8,2±0,3	8,01±0,32	7,90±0,58				
	8,78±0,38	8,5±0,4	7,86±0,03	*				
Anzahl Versuche n =	14	14	14	9				
	13	13	13	*				

* Die Experimente in Rezirkulationstechnik mit Membranoxygenator wurden nach 90 min abgebrochen bei deutlichem Abfall der Perfusionsrate und der GFR.

Die Tabelle 10.1. ist der Arbeit von 1981 entnommen (241). Der Vergleichbarkeit wegen sind alle Parameter auf 1g Nierengewicht bezogen. Als Referenz wurde die nichtperfundierte linke Niere dekapsuliert und gewogen, nachdem noch vor Perfusionsbeginn die linke Nierenarterie abgebunden worden war. Dies ist bei dem in der Regel geringen Unterschied im Gewicht zwischen rechter und linker Niere in vivo valider als ein Bezug auf die perfundierte Niere, die nahezu immer an Gewicht zulegt, ausgenommen bei hyperonkotischem Perfusat (z.B. BSA >7g%). In der Arbeit von Hartwig wurde im Rezirkulations-Experiment mit Membranoxygenator Verapamil eingesetzt und damit war ein geringerer Fluss- und Filtratabfall zu verzeichnen (94).

Perfusionsexperimente zur endokrinen Funktion der Niere

Um die Bedeutung der Niere für die Homöostase von Peptidhormonen zu erfassen, wurde die isolierte Niere in Rezirkulationstechnik eingesetzt sowohl im Modus der filtrierenden wie auch der nicht filtrierenden Niere (226, 258). Damit konnte man die metabolische Clearance von der Clearance durch Filtration unterscheiden und quantifizieren (258). Zudem war z.B. nachweisbar, dass die metabolische Clearance für homologes Ratteninsulin höher lag als von heterologem Insulin vom Schwein (226). Daneben zeigte sich ein eigenartiges Phänomen, dass Peptidhormone wie Insulin und Parathormon (PTH) am Modell der nicht filtrierenden Niere nicht abgebaut werden* (162, 226, 258), es zeigte sich aber auch, dass bei der IPRK ein normales Filtrat für diese Untersuchungen besser ist als ein reduziertes Filtrat bei hyperonkotischem Perfusat wie es Rabkin eingesetzt hat (195), ebenso wie es notwendig ist bei der nichtfiltrierenden Niere die von Johnson und Maack vorgegebenen Bedingungen einzuhalten, wie hyperonkotisches 10g% BSA, reduzierter Perfusionsdruck (70mmHg) (112) und Ligatur des Ureters im Unterschied zu Maude, der nur bei reduziertem Perfusionsdruck das Sistieren des Urinflusses angestrebt hat (160). Wir haben darüber hinaus durch Lissamingrün-Bolus Injektion den optischen Nachweis der Nichtfiltration erhärtet so wie Maack (154).

Aber auch andere Leistungen der Niere wie die Konversion von Cholecalciferol (Vit D) und der Metabolismus von Steroidhormonen konnten untersucht und aufgeklärt werden (101, 102, 209). Wir selbst haben neben Untersuchungen an Insulin, C-Peptid und PTH auch weitere Hormone untersucht, so z.B. die Konversion von Thyroxin [T₄] zu Trijodthyronin [T₃] und den Export der Niere von T₃ für andere Gewebe quantifiziert. Gegenüber von Ferguson (71) konnten wir zeigen, dass mit einem optimierten und substratangereicherten Perfusionsmedium bei Zusatz von Erythrozyten als Sauerstoffträger eine wesentlich höhere Konversionsrate zu finden war, Dissertationen (94, 302). Schon zuvor hatten wir die Clearance beider Hormone im single-pass Modell ohne Kolloid untersucht und dies 1980 publiziert (3). Unter diesen Bedingungen, d.h. ohne Bindungsproteine fand sich eine nicht sättigbar hohe Resorptionskapazität selbst bei unphysiologisch hohen Konzentrationen (Faktor 100 überhöht). In der Arbeit von Michael Hartwig kam zudem eine Äquilibriumsdialyse zum Einsatz, um bei albuminhaltigem Perfusat auch die freie Hormonfraktion mit zu erfassen (94).

*Dies bezieht sich darauf, dass es bei Messung mit dem RIA keine Veränderung gibt, säulenchromatographisch zeigt sich aber dennoch eine gewisse Fragmentierung (162).

Um die Widerstandserhöhung bei reiner Rezirkulation, die regelmäßig nach den ersten 60-90min auftrat, zu überwinden haben wir bei den Untersuchungen von Hartwig von Anbeginn Verapamil eingesetzt und waren damit in der Lage die Flussraten stabil zu halten (94). Frühere Arbeiten hatten gezeigt, dass die Autoregulation und der tubuloglomeruläre Feedback auch in vivo damit zu unterdrücken sind (166) (s.a. Abb. 10.3.1.). Pegg hat bei Versuchen an der isolierten Kaninchenniere darauf hingewiesen, dass die Rückgabe des Urins ins Perfusat dazu führen kann, dass tubulärer Zelldebride Kapillaren verlegen kann. Dies ist bei zellfreien Perfusionsmedien nach ca. 30-40min Perfusionsdauer im Urin-sediment auch mikroskopisch nachweisbar (207), bei Einsatz von 5% Erythrozyten jedoch zu vermeiden, weil keine Nekrosen auftreten (207, 253).

Ferguson und Jennings haben ein substratarmes Perfusat mit kleinem Volumen genutzt (30ml/g Niere) und das gebildete T_3 sowohl im Nierengewebe wie auch das ins Medium abgegebene T_3 gemessen (71). In der Abb. 70 ist wegen der Vergleichbarkeit nur das ins Perfusat exportierte T_3 dargestellt. Bei den relativ niedrigen Konversionsraten scheint keine Sättigung zu bestehen bis zum 10fachen der physiologischen T_4 Konzentration. Demgegenüber ist die Konversionsrate in der Dissertationsarbeit von Gisela Wruck im physiologischen Bereich um Faktor 10 höher als bei Ferguson, steigt aber bei der T_4 Konzentration von $75\mu\text{g}/\text{dl}$ nicht linear sondern nur um das 3-fache an (302). Der methodische Unterschied lag darin, dass das Perfusat substratangereichert war inklusive Glutathion-Vorläufer-Substraten und Glutathionzusatz und Erythrozyten zugegeben wurden um Sauerstoffmangelschäden zu verhindern und dass das Verhältnis Perfusatvolumen zu Niere mit $150\text{ml}/\text{g}$ Niere 5mal höher lag. Der Vorteil besteht in dem höheren Substratvorrat für das Organ. Der Nachteil der niedrigeren T_3 -Konzentrationen wurde dadurch ausgeglichen, dass dafür ein hochsensitiver RIA entwickelt wurde (302).

In der Arbeit von Michael Hartwig sind die T_4 Vorgaben noch einmal bis auf $145\mu\text{g}/\text{dl}$ erhöht worden, der Einsatz von Verapamil hat einen konstanten Perfusionswiderstand bis in die zweite Stunde gebracht und die bewusste Begrenzung des $p\text{O}_2$ auf ca. 400mmHg hat die T_3 -Exportraten zusätzlich noch einmal weiter erhöht, wenn auch bei der höchsten T_4 Konzentration die T_3 -Exportrate in der zweiten Stunde von $79,7\pm 6,5$ auf $51,5\pm 4,0\text{ng}/\text{h}$ g Niere dann doch noch eine Sättigung gezeigt hat. Daraus ist abzuleiten, dass man mit einer Modelloptimierung möglicherweise näher an die in vivo Verhältnisse herankommt. Dennoch war bereits von Ferguson gezeigt worden, dass kein Unterschied in der Konversionsrate besteht zwischen filtrierender und nichtfiltrierender Niere, was in der Arbeit von Wruck bestätigt werden konnte, auch bei höherem Exportniveau. Bei der physiologischen Konzentration von $10\mu\text{g}/\text{dl}$ T_4 hat die filtrierende Niere $5,8\pm 1,2\text{ng}/\text{h}$ g Niere T_3 exportiert, bei der nichtfiltrierenden Niere waren es $6,7\pm 0,8\text{ng}/\text{h}\cdot\text{g}$ Niere, bei einer T_4 -Konzentration von $75\mu\text{g}/\text{dl}$ waren es $16,6\pm 2,6$ bei der filtrierenden und $15,5\pm 1,8\text{ng}/\text{h}\cdot\text{g}$ Niere bei der nichtfiltrierenden Niere. Allerdings haben Ferguson und Jennings die nichtfiltrierende Niere lediglich durch Absenken des Perfusionsdrucks auf $50\text{-}60\text{mmHg}$ erzeugt (BSA unverändert bei $7,5\text{g}/\text{dl}$) und das Versiegen von Harnfluss und die Konstanz der T_4 Konzentration als Beleg für die Nichtfiltration angenommen. Im Unterschied dazu wurde die nichtfiltrierende Niere bei Wruck nach dem Modus von Maack dadurch erzeugt, dass der Ureter abgebunden, BSA auf $10\text{g}/\text{dl}$ erhöht wurde, der Perfusionsdruck von 100

auf 70mmHg reduziert wurde und in einem Pilotexperiment gezeigt wurde, dass ein Lissamingrün-Bolus nicht in den kollabierten Tubuluslumina erschienen ist.

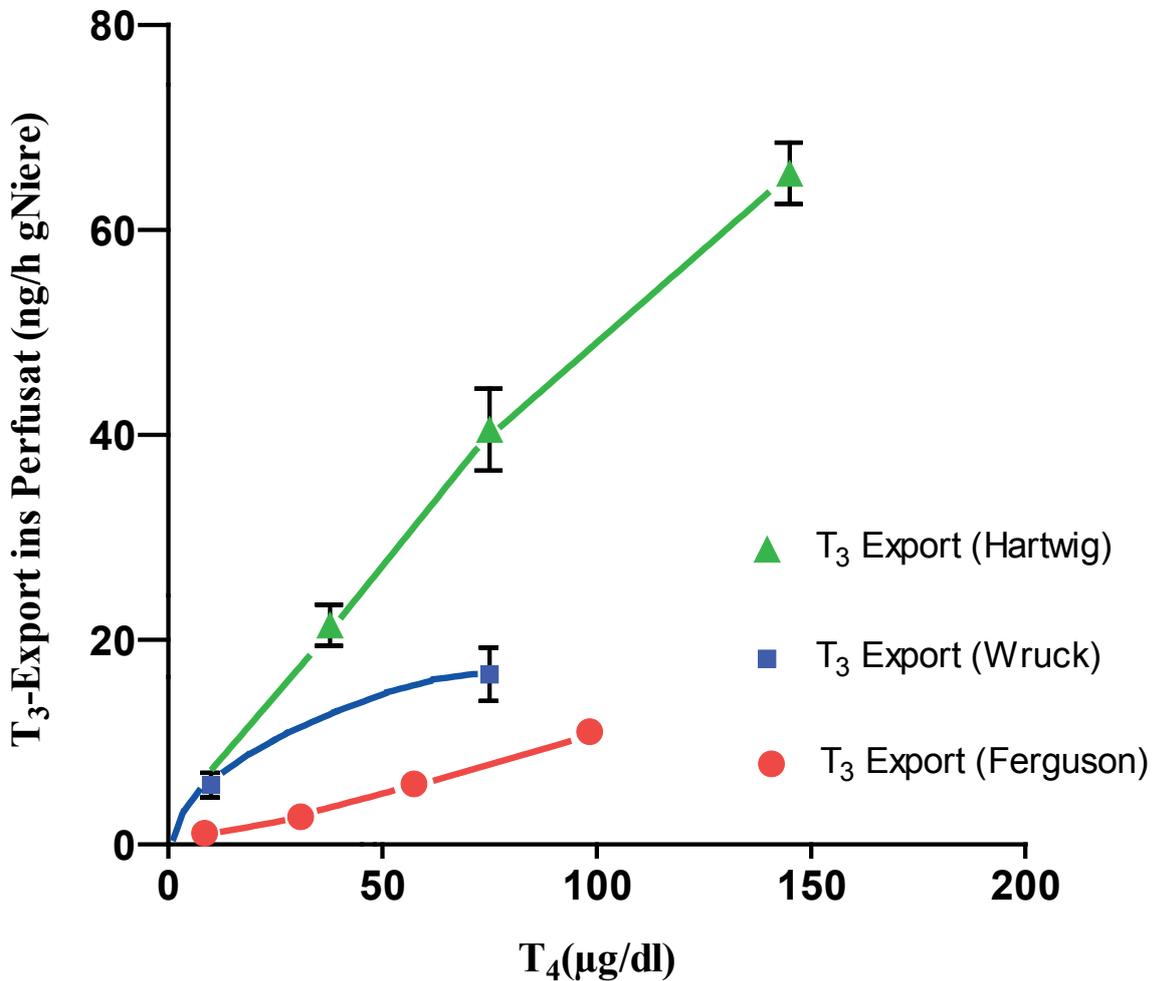


Abb. 10.3.1.: Vergleich der Konversionsraten von Thyroxin (T_4) zu Trijodthyronin (T_3) am Modell der isoliert perfundierten Niere. Dargestellt ist die ins Medium exportierte T_3 -Menge. Die großen Unterschiede lassen sich auf methodische Differenzen zurückführen (s.Text). Die Daten von Ferguson (71) wurde aus der Graphik der Originalarbeit errechnet, bei den Befunden von Gisela Wruck liegen Mittelwerte \pm SEM vor bei $n = 5$, bzw. 4. Bei den Befunden von Michael Hartwig sind es Mittelwerte \pm SD, $n = 4$. Die letzteren Daten liegen bisher nur in der jeweiligen Dissertation vor, sind aber in Hannover einsehbar.

10.3. Rezirkulationsperfusion mit Regeneration des Perfusats durch Dialyse

Die Funktionsstabilität der isoliert perfundierten Niere ist höher, wenn eine hyperonkotische Albuminlösung verwendet wird. Damit nimmt man eine reduzierte GFR in Kauf. Setzt man 5g/dl BSA ein mit dem Resultat einer normalen GFR von 1ml/min·g Niere wird deutlicher, dass bei zellfreiem Medium die Funktion schon in der 2. Stunde deutlich einbricht. Aus der Erfahrung der single-pass Perfusionen heraus (Haemaccel als Kolloid) mit stabiler Perfusionsflussrate über 2-3h habe ich in Hannover mit dem ersten Einsatz von bovinem Serumalbumin die Dialysetechnik etabliert, damals mit Perfusativolumina von 200ml initial und 150ml im Rezirkulationskreislauf und 2000ml Dialysatvolumen. Später wurde das Dialysatvolumen auf 5000ml aufgestockt. Damit war es möglich, die Einwaage von Substraten auf das Dialysat zu beschränken, die AlbuminstammLösung damit adäquat zu verdünnen und per Dialyse in der Vorbereitung zur Perfusion zu äquilibrieren. Einzelheiten darüber wie wir heute vorgehen um die großen Dialysatmengen herzustellen finden sich im Kapitel 4.1.3.

Wie im vorangegangenen Kapitel 10.2. erwähnt, haben Literaturrecherchen ergeben, dass die Dialysetechnik bereits 1967 durch Baumung und Peterlik in Wien an der isolierten Rattenleber eingesetzt worden war um die Azidoseneigung ihres Präparates zu kompensieren (hypoxische Laktatazidose oder Bikarbonat-Verbrauch durch Harnstoffsynthese?). Die Dialysatoren wurden damals 1967 nach dem Kolff-Watschinger Modell einer Spulenniere hergestellt aus Cuprophanschläuchen von 2,8cm Breite und 160cm Länge. In der Originalpublikation findet sich eine ausführliche Beschreibung (19). Der erste von uns 1976 genutzte Dialysator war der von Josef Hoeltzenbein in Münster entwickelte Kapillarplatten-Dialysator (106) in der Form, die von Travenol in Belgien industriell gefertigt worden ist (Typ M1000), s. Abb. 4.3.1. und 4.3.2. Ein hervorragendes Merkmal war „blutseitig“ das kleine Füllungsvolumen und die optimierten Diffusionsstrecken.

Die Tabelle 10.1. zeigt den Vergleich Rezirkulationstechnik mit Oxygenator und Rezirkulationstechnik mit Regeneration des Perfusats durch diesen Dialysator und zeigt die bessere Funktion mit dieser Technik gegenüber der reinen Rezirkulation mit Oxygenator. Dies hat ermöglicht an diesem Modell über 2-3 Stunden Tubuli zu mikropunktieren. In den frühproximalen Mikropunktionsproben konnte mit der Mikrodiskgradientengel-Elektrophorese Albumin bestimmt werden und so der Siebkoeffizient unter verschiedenen experimentellen Bedingungen (234, 235, 238, 240, 242, 256, 281-283). Parallel zur Einführung der Dialysetechnik zur Regeneration des albuminhaltigen Perfusats wurde neben den Standardsubstraten Glukose, Laktat, Pyruvat, Oxalazetat und Glutamat auch das Aminosäuregemisch von 8 Aminosäuren eingesetzt, das De Mello und Maack 1976 beschrieben hatten (60). Später wurden wir gewahr, dass der Einsatz von Arginin im Dialysat eine gute Voraussetzung war, einen schnellen Verbrauch dieser NO-Quelle zu vermeiden und dies dürfte zu der besseren „Langzeitstabilität“ dieser Präparation beigetragen haben. Dies ist dann in Kooperation der Arbeitsgruppe mit Jörg Radermacher am Versuchsstand in Hannover systematisch untersucht und bestätigt worden (197, 198). Der Argininmangel ist bei reiner Rezirkulation durch hohen Verbrauch schnell erreicht, macht sich aber dann nicht so deutlich bemerkbar, wenn mit hyperonkotischem Medium perfundiert wird. Unter diesen

Bedingungen zeigt das Gefäßbett den geringsten Perfusionswiderstand. Umso deutlicher wird dies bei Konzentrationen von Albumin um 5g/dl und darunter (bei reiner Rezirkulation). Mit L-NNA (N Omega-Nitro-L-Arginin) war der gleiche Effekt zu erreichen wie mit Arginin-Verarmung. So wurde klar, warum durch den empirischen Schritt mit dem Einsatz der Dialyse und damit einem großen Argininvorrat die bessere Langzeitstabilität erreicht werden konnte. Auf dieser Basis sind eine Reihe von weiteren Untersuchungen mit Mikropunktionstechniken möglich geworden (172, 173, 175, 235). Die ersten tubulären Druckmessungen waren in Berlin noch an der single-pass Präparation mit Haemaccel durchgeführt worden. Dabei fiel auf, dass die Tubulusdrucke proximal und distal nahezu identisch waren in der frühen Phase nach 20min parallel zu einer Flusssenke (s. Abb. 6.1.2. S. 90). Dies wurde als Hinweis gedeutet, dass filtrierte Gelatine die Viskosität luminal im Tubulus in dieser Phase erhöht, in der noch eine hohe fraktionelle Na- und Flüssigkeitsresorption besteht, die später reduziert ist. Danach fand sich auch wieder ein niedrigerer Druck im distalen Tubulus.

Die ersten tubulären Druckmessungen in Hannover an der mit Albumin perfundierten Niere hat Gerd Schwietzer mit der Landistechnik (134) durchgeführt, die damals im Labor von Karl-Heinz Gertz Standard war. Bei den folgenden Studien konnten wir das von der Berliner Arbeitsgruppe entwickelte System einsetzen (147) in der von Hampel in Frankfurt gebauten Version. Die Untersuchungen mit dieser Mikropunktionstechnik hat Klaus Hinrich Neumann durchgeführt, der in den Laboratorien von Karl-Heinz Gertz in Hannover und Floyd Rector in San Francisco seine Expertise akkumuliert hatte. Die zuletzt benutzten Dialysatoren waren „low flux“ Dialysatoren von FMC, zunächst der Polysulfon-Typ F4, danach der FX5 (Helixone®, verbesserte Polysulfonmembran) mit 1m² Oberfläche und 54ml Füllvolumen (blutseitig). Sogenannte high flux Dialysatoren sind ungeeignet wegen einer zu hohen Durchlässigkeit für Albumin unter diesen experimentellen Bedingungen.

10.4. Anatomisch fixierte Niere zur Analyse des glomerulären Filters

Der grosse Aufwand von Mikropunktionsuntersuchungen zur Charakterisierung der glomerulären Permeabilität von Makromolekülen hat die Suche nach einer einfacheren Möglichkeit induziert und daraus ist diese Technik entstanden mit Beiträgen, die im Anhang unter 12.4. zusammengefaßt sind.

10.4.1. Technik der Perfusionsfixierung der isolierten Niere zur Reperfusion

Die Nieren wurden zunächst mit der Standardmethode bei 100mmHg vorperfundiert mit einer substratangereicherten Krebs-Henseleit-Lösung mit 5g% BSA über 15min im Modus Rezirkulation mit Dialyse mit der Besonderheit, dass dem Medium Verapamil (Endkonzentration von $4,4 \cdot 10^{-6}$ mol/l) zugesetzt war. Kurz vor der Fixierung wurde der Perfusionsdruck auf 150mmHg angehoben, danach wurde auf die temperierte Fixierlösung umgeschaltet und unter dem gleichen Druck fixiert über einen Zeitraum von 5-9min.

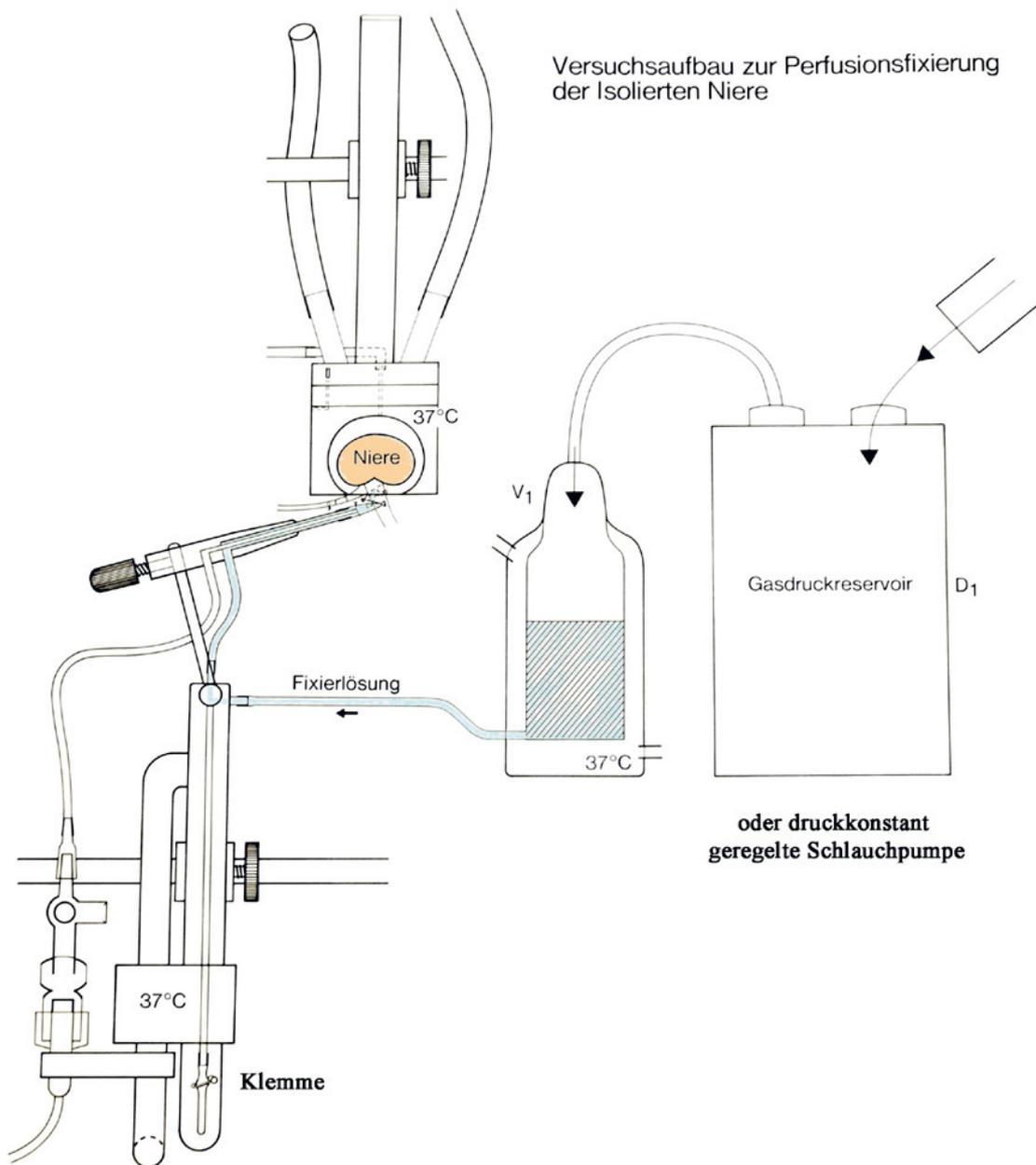


Abb. 10.4.1.: Aufbau für die anatomische Fixierung. Der arterielle Bypass ist umfunktioniert als Zufluss für die Fixierlösung, die auf 37°C temperiert und als treibende Kraft unter Gasdruck steht. Der kann über ein vorgefülltes Druckreservoir aufgebaut werden oder mit einer druckgesteuerten Schlauchpumpe aufgefüllt werden. Der Zufluss des Standardperfusats wird abgeklemmt und der Zufluss der Fixierlösung geöffnet, so kann übergangslos fixiert werden.

10.4.2. Fixierungslösung für die Reperfusionsexperimente

Ausgangsmaterial war eine 6%ige HAES-Lösung in 0,9%NaCl (FMC), die per Ultrafiltration auf die Hälfte des Volumens eingedickt wurde auf 12g%. Dazu nutzten wir eine 8% monomere Glutaraldehydlösung, die mit Phosphatpuffer (pH 7,1) verdünnt wurde und 1:1 mit der HAES-Lösung gemischt eine Glutaraldehyd-Endkonzentration von 1,25% ergab. Die Begründung für den Einsatz von HÄS: wenn man kolloidfreie Fixierlösung einsetzt, kommt es unmittelbar nach dem Übergang in die Fixierungsperfusion zu einem drastischen Anstieg des Perfusionswiderstands, der sich durch **Kolloidzusatz** vermeiden lässt. Dadurch erhält man auch eine bessere und homogenere Fixierung des Nierengewebes nach morphologischen Kriterien der Licht- und Transmissions-Elektronen-Mikroskopie (s. Kapitel 12.2.).

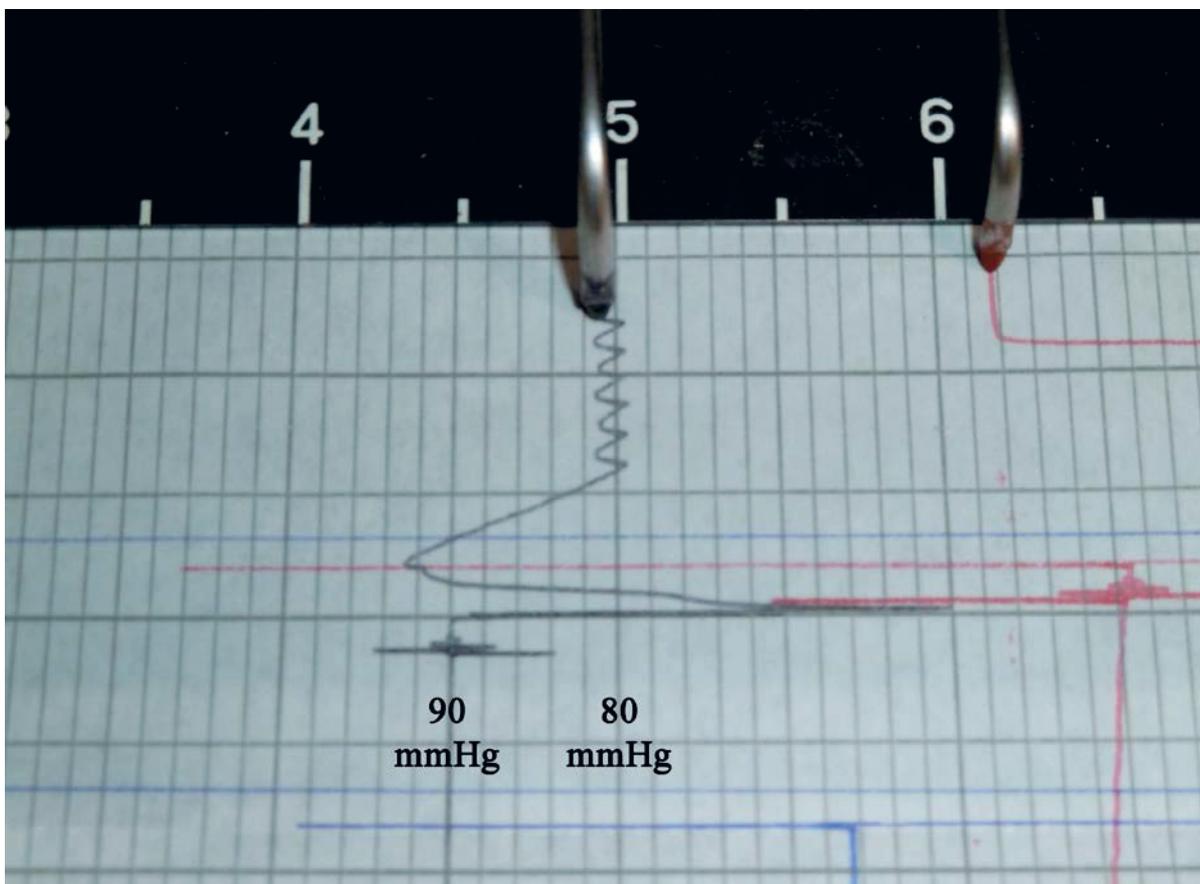


Abb. 10.4.2.: Druckregistrierung in der Fixierungsphase: Das Schreiberprotokoll zeigt das Einschwingen des Perfusionsdrucks (schwarze Linie) beim Übergang zur Fixierung. Ausgangsdruck 90mmHg, beim Umschalten kurzer Druckabfall, dann Anstieg auf knapp über 90mmHg und dann Einschwingen auf den voreingestellten Fixierungsdruck hier von 80mmHg, das leichte Pulsieren entspricht dem Wiederanlaufen der Luft transportierenden Schlauchpumpe, die versucht den Druck im Fixierungsreservoir auf dem Niveau von 80mmHg zu halten. In diesem Fall diente die Fixierung speziell morphologischen Zwecken. Für die Fixierung von Nieren, die zur Reperfusion genutzt wurden haben wir mit einem effektiven Druck von 150mmHg fixiert.

11. Tabellarium

Abkürzungsverzeichnis zu den nachfolgenden Tabellen und zu Kapitel 13°.

Parameter	Dimension	Bedeutung
ffp (P_{ff})°	mmHg	Freiflussdruck frühproximal
sfp (P_{sf})°	mmHg	Stoppflussdruck frühproximal
efp (P_{uf})°	mmHg	effektiver Filtrationsdruck
gcp	mmHg	glomerulärer Kapillardruck
K_f *	nl/s·mmHg	glomerulärer Ultrafiltrationskoeffizient
k	nl/s·mmHg·cm ²	effektive hydraulische Permeabilität
K	μl/min·mmHg	Koeffizient der hydraulischen Leitfähigkeit der Gesamtniere
TF/P_{Inulin}		Quotient für Inulin aus Tubulusflüssigkeit und Perfusat
gfr, SNGFR	nl/min	Einelnephronfiltrationsrate
Q̇**	nl/min	Perfusionsrate im Einelnephron
GFR	ml/g·min	glomeruläre Filtrationsrate (Inulin) der Gesamtniere
RPF	ml/g·min	renaler Perfusionsfluss der Gesamtniere
FF	%	Filtrationsfraktion GFR/RPF
TNa	μmol/g·min	Natriumresorption, absolut
Q̇O₂	μmol/g·min	Sauerstoffverbrauch
Ṡ	μl/g·min	Urinminutenvolumen
COP/π	mmHg	kolloid-osmotischer Druck des Perfusats
K_{U/P}/Inulin_{U/P}		Clearancequotient für Kalium

* errechnet aus K(f) der Gesamtniere/30000 Nephrene pro Rattenniere

**errechnet aus der Gesamtperfusionsrate/30000 Nephrene pro Rattenniere

Tabelle 11.1.0: Auswirkungen steigender Albuminkonzentrationen (COP) im Medium auf Funktionsparameter der IPRK (50-70min nach Perfusionsbeginn). Albumin (bovines Serumalbumin BSA) als alleiniges Kolloid. Berechnung des COP nach Landis und Pappenheimer: L&P-Formel: $2,8c + 0,18c^2 + 0,012c^3$, wobei c der Albumin-Konzentration in g/100ml entspricht. Die gemessenen COP Werte sind einer Eichkurve entnommen, die mit einer 20000 Dalton-Membran ermittelt wurden. Die Daten der kolloidfrei perfundierten Nieren wurden im Modus 1: single-pass, die anderen im Modus 3: Rezirkulation mit Regeneration des Perfusats durch Dialyse gewonnen. Der effektive Perfusionsdruck Pa wurde bei kolloidfreiem Perfusat auf 90mmHg reduziert und lag sonst bei 100mmHg. Um bei hohem COP eine vergleichbare GFR zu erreichen wie bei „normalem“ COP wurde bei den Versuchen der letzten Spalte der effektive Perfusionsdruck von 100 auf 140 mmHg erhöht und Verapamil ($4,4 \cdot 10^{-6}$ mol/l) zugegeben, n = Zahl der Tiere, Mittelwerte \pm SEM. Einzelnephron-Flussrate und Einzelnephron-gfr wurden kalkuliert auf der Basis von $3 \cdot 10^4$ Nephronen/Niere. Das Material dieser Tabelle ist 1981 erstmals publiziert worden (240, 241).

		Verapamil				
Albumin (g/100ml)	0	2,82\pm0,26	4,66\pm0,09	5,72\pm0,1	7,59\pm0,14	7,86\pm0,16
π COP L&P-Formel (mmHg)	0	9,6 \pm 0,89	18,2 \pm 0,35	24,2 \pm 0,42	36,9 \pm 0,68	39,0 \pm 0,79
πCOP gemessen (mmHg)	0	7,5	15,3	20,8	32,3	34
Perfusionsrate (ml/min·g)	15,6 \pm 1,3	24,1 \pm 1,8	30,5 \pm 1,9	32,0 \pm 1,6	36,4 \pm 1,4	43,7 \pm 2,1
Urinfluss \dot{V} (μl/min·g)	683 \pm 122	421 \pm 61	226 \pm 71	140 \pm 17	30,6 \pm 8,8	132 \pm 22,1
GFR Inulin-Clearance (ml/min·g)	1,38 \pm 0,15	1,15 \pm 0,06	0,96 \pm 0,08	0,94 \pm 0,06	0,56 \pm 0,05	0,96 \pm 0,11
TNa (μmol/min·g)	96,8 \pm 15,5	109,1 \pm 7,8	108 \pm 7	126 \pm 7	77,7 \pm 7,1	119 \pm 16
Na-Resorption %	51,3 \pm 5,5	69,8 \pm 3,4	82,6 \pm 6,2	91,6 \pm 1,3	97,1 \pm 1,0	90,7 \pm 1,2
TGlukose (μmol/min·g)	9,17 \pm 1	8,71 \pm 0,62	7,48 \pm 0,63	7,73 \pm 0,65	4,32 \pm 0,29	8,72 \pm 1,44
Glukose-Resorption %	78,5 \pm 3,5	90,8 \pm 1,4	91,6 \pm 2,2	94,6 \pm 0,6	94,5 \pm 0,7	93,8 \pm 1,5
K_{UP}/Inulin_{UP}	1,18 \pm 0,03	1,55 \pm 0,14	1,61 \pm 0,14	1,69 \pm 0,18	0,78 \pm 0,22	0,83 \pm 0,11
\dot{Q}_{O_2} (μmol/min·g)	7,77 \pm 0,9	8,4 \pm 0,51	8,89 \pm 0,79	9,0 \pm 0,48	7,15 \pm 0,14	n.g.
TNa/ \dot{Q}_{O_2}	12,2 \pm 1,03	13,0 \pm 0,86	12,3 \pm 1,8	14,1 \pm 1,0	10,8 \pm 0,9	n.g.
Filtrations-Fraktion %	8,83 \pm 0,55	4,84 \pm 0,32	3,14 \pm 0,15	2,99 \pm 0,25	1,57 \pm 0,17	2,20 \pm 0,19
Einelnephron Flussrate (nl/min)	532 \pm 45	821 \pm 60	1140 \pm 71	1034 \pm 51	1117 \pm 43	1310 \pm 63
Einelnephron gfr (nl/min)	47,0 \pm 5,2	39 \pm 2,0	35,7 \pm 2,8	30,2 \pm 2,0	17,0 \pm 1,5	28,9 \pm 3,2
Anzahl n =	4	7	3	12	7	5

Die kolloidfrei perfundierten Nieren waren in dieser Serie noch nicht systematisch dekapsuliert worden vor Beginn der Perfusion (häufig spontane Dekapsulierung im Verlauf). Dadurch sind die Perfusionsraten deutlich niedriger, als wenn die Perfusion von Beginn an ohne Nierenkapsel erfolgt wäre.

Tabelle 11.1.1.: Albuminfrei perfundierte Rattenniere. Auswirkungen der Perfusion mit und ohne ureteralen Rückstaudruck auf die Gesamtnierenfunktion und die Hydrodynamik des Nephrons. Mittelwerte \pm SEM, n = Zahl der Tubuli, in Klammern Zahl der Tiere. Pa = 100mmHg. Die Einzelnephron-gfr und K_f wurden unter der Annahme von $3 \cdot 10^4$ Nephronen/Niere berechnet. Zeitraum der Messungen: Funktionsparameter der ganzen Niere: 50-70 min. Einzelnephronparameter: 30-115 min. Bei kolloidfreiem Perfusat ist der Stoppflussdruck $sfp = gcp$, dem glomerulären Kapillardruck. Der Ureter der Kontrollnieren wurde mit einer kurzen Glaskanüle kanüliert und verlängert mit einem PE50 Schlauch, der ureterale Rückstaudruck wurde durch einen PP10 Schlauch im Ureter erzwungen (10cm Länge), s.a. Abb. 4.4.3.. Das Material dieser Tabelle ist 1981 erstmals publiziert worden (240, 241).

Parameter IPRK	Anzahl n =	mit ureteralem Rückstaudruck	
		Kontrolle n = 32 (4)	Rückstaudruck n = 21 (4)
Perfusionsrate (ml/min·g)		15,6 \pm 1,3	15,0 \pm 1,1
Urinfluss \dot{V} (μ l/min·g)		683 \pm 122	279 \pm 30
GFR Inulin-Clearance (ml/min·g)		1,34 \pm 0,05	0,54 \pm 0,01
TNa (μ mol/min·g)		96,8 \pm 15,5	37,7 \pm 3,9
Na-Resorption %		51,3 \pm 5,5	49,6 \pm 3,9
TGlukose (μ mol/min·g)		9,17 \pm 1	3,32 \pm 0,3
Glukose-Resorption %		78,5 \pm 3,5	84,2 \pm 1,2
$K_{UP}/Inulin_{UP}$		1,18 \pm 0,03	1,21 \pm 0,15
$\dot{Q}O_2$ (μ mol/min·g)		7,77 \pm 0,9	7,23 \pm 0,32
TNa/$\dot{Q}O_2$		12,2 \pm 1,0	5,23 \pm 0,54
Filtrations-Fraktion %		8,83 \pm 0,55	3,33 \pm 0,25
Einzelnephrondaten			
Freiflussdruck ffp (mmHg)		55,4 \pm 1,6	47,7 \pm 1,8
Stoppflussdruck sfp (mmHg)		73,8 \pm 1,3	68,9 \pm 1,4
effektiver Filtrationsdruck efp		18,4 \pm 0,6	21,2 \pm 1,1
Einzelnephron Flussrate (nl/min)		520	500
Einzelnephron gfr (nl/min)		46,1 \pm 1,5	19,4 \pm 0,3
Ultrafiltrationskoeffizient K_f (nl/s mmHg)		0,0426 \pm 0,0015	0,0161 \pm 0,0011

Der durch den zu dünnen PP10 Katheter aufgebaute Druckabfall lag bei einem Urinfluss von 279 μ l/min bei ca. 22mmHg (s.a. Abb.: 4.4.3.).

Bemerkenswert ist der geringe Unterschied im Sauerstoffverbrauch gemessen an der transportierten Natriummenge **TNa**. Der **TNa/ $\dot{Q}O_2$** -Quotient fällt von 12,5 auf 5,2 ab. Dies könnte durch backleak-Phänomene im proximalen Tubulus bedingt sein.

Tabelle 11.1.2. Funktionsvergleich der isolierten Rattenniere bei Perfusion a) ohne Kolloid im single pass Modus und b) mit 7g Albumin/100ml (Rezirkulation mit Regeneration durch Dialyse) in Abhängigkeit von der Versuchsdauer. Mittelwerte \pm SEM, n = Zahl der Nieren. Pa = 100mmHg. Damals wurde die Nierenkapsel nicht systematisch entfernt bei kolloidfrei perfundierten Nieren. Das Material dieser Tabelle ist 1981 erstmals publiziert worden (240, 241).

Perfusion a) Perfusion b)	a) b)	a) b)	a) b)	a) b)
Zeitraum (min)	30-50	50-70	70-90	90-110
Perfusionsrate (ml/min·g)	14,5 \pm 1,0	16,8 \pm 1,4	19,4 \pm 1,7	21,0 \pm 1,7
	33,1 \pm 2,1	35,4 \pm 1,4	35,0 \pm 1,8	34,6 \pm 1,8
Urinfluss \dot{V} (μ l/min·g)	556 \pm 80	703 \pm 59	718 \pm 61	778 \pm 97
	15 \pm 2,7	26,8 \pm 5,7	33,3 \pm 7,6	28,2 \pm 6,8
GFR Inulin-Clearance (ml/min·g)	1,18 \pm 0,13	1,40 \pm 0,07	1,37 \pm 0,07	1,40 \pm 0,1
	0,58 \pm 0,09	0,63 \pm 0,04	0,58 \pm 0,06	0,49 \pm 0,08
TNa (μ mol/min·g)	87,3 \pm 9,6	97,4 \pm 5,4	89,2 \pm 5,2	86,6 \pm 3,1
	84,1 \pm 12,8	89,6 \pm 7,6	82,7 \pm 8,3	69,7 \pm 10,6
Na-Resorption %	54,7 \pm 3,2	50,9 \pm 2,3	47,8 \pm 2,3	45,6 \pm 3,1
	99,1 \pm 0,2	98,4 \pm 0,4	97,1 \pm 0,7	94,4 \pm 1,1
Glukose-Resorption %	86,6 \pm 2,2	83,4 \pm 2,3	82,4 \pm 3,8	79,1 \pm 5,0
	95,9 \pm 0,4	95,8 \pm 0,3	95,4 \pm 0,3	94,4 \pm 1,1
K_{UP}/Inulin_{UP}	1,15 \pm 0,05	1,09 \pm 0,06	1,08 \pm 0,07	1,05 \pm 0,09
	0,43 \pm 0,07	0,67 \pm 0,13	0,67 \pm 0,13	0,77 \pm 0,12
$\dot{Q}O_2$ (μ mol/min·g)	7,26 \pm 0,45	7,29 \pm 0,36	7,43 \pm 0,45	7,58 \pm 0,60
	7,12 \pm 0,20	7,33 \pm 0,2	7,44 \pm 0,21	7,42 \pm 0,17
TNa/$\dot{Q}O_2$	12,02	13,36	12,01	11,42
	11,81	12,22	11,12	9,39
Anzahl Versuche n =	10	10	8	7
	6	6	6	6

Der fehlende Unterschied im Sauerstoffverbrauch zwischen den kolloidfrei perfundierten Nieren und den mit BSA perfundierten Nieren hat sein Äquivalent in der transportierten Natriummenge **TNa**, die sich in den ersten 90 Minuten kaum unterscheidet, erst im letzten Zeitintervall fällt die Proportion **TNa/ $\dot{Q}O_2$** bei den kolloidfrei perfundierten Nieren deutlich ab. Vergleiche auch Tabelle 11.1.1 und der Vermeidung eines ureteralen Rückstaudrucks.

Tabelle 11.1.3.: Hydrodynamik oberflächlich erreichbarer Nephrone (frühproximale Tubuli) und Funktionsparameter der Gesamtniere bei steigender Albuminkonzentration (BSA) von 0 bis 4,9g/dl. Pa = 100mmHg, n = Zahl der Tubuli, in Klammern Zahl der Tiere. Das Material dieser Tabelle ist 1981 erstmals publiziert worden (240).

Zeitfenster 50-70 min

Albumin BSA (g/100ml)	0	2,82±0,26	4,66±0,09
π COP L & P (mmHg)	0	9,60±0,89	18,17±0,35
Perfusionsrate (ml/min·g)	15,6±1,3	24,1±1,8	30,5±1,9
Urinfluss \dot{V} (μl/min·g)	683±122	421±61	226±71
GFR Inulin-Clearance (ml/min·g)	1,38±0,15	1,15±0,06	0,95±0,08
TNa (μmol/min·g)	96,8±15,5	109±7,8	108±7,3
Na-Resorption %	51,3±5,5	69,8±3,4	82,6±6,2
Glukose-Resorption %	78,5±3,5	90,8±1,4	91,6±2,2
K_{UP}/Inulin_{UP}	1,18±0,03	1,55±0,14	1,61±0,14
\dot{Q}_{O_2} (μmol/min·g)	7,77±0,90	8,40±0,51*	8,46±1,19
TNa/ \dot{Q}_{O_2}	12,2±0,90	13,0±0,86*	13,6±2,0
Filtrations-Fraktion %	8,83±0,55	4,84±0,32	3,14±0,15
Filtrationskoeffizient Ganzniere (μl/min·mmHg)	76,6±2,8	82,3±2,0	127,4±8,5
Anzahl n =	4	7 (5*)	3

Zeitfenster 30-107 min

Albumin BSA (g/100ml)	0	2,76±0,08	4,9±0,08
π COP L&P (mmHg)	0	9,35±0,23	19,5±0,4
πCOP gemessen (mmHg)	0	7,4	16,5
Freiflussdruck ffp (mmHg)	55,4±1,6	35,4±0,4	29,8±1,1
Stoppflussdruck sfp (mmHg)	73,8±1,3	49,5±0,5	39,2±1,5
glomerulärer Kapillardruck gcp (mmHg)	73,8±1,4	59,0±0,6	58,7±1,5
Filtrationsdruck Δp (gcp - ffp)	18,4±0,6	23,6±0,49	28,8±0,7
effektiver Filtrationsdruck efp	18,4±0,7	14,0±0,3	9,4±0,6
Ultrafiltrationskoeffizient K_f (nl/s mmHg)	0,0426±0,0015	0,0458±0,0011	0,0708±0,0047
Einelnephron Flussrate \dot{Q} (nl/min)	535±44	810±59	1136±70
Einelnephron gfr (nl/min)	46,1±1,5	37,8±0,7	36,7±1,3
Anzahl n =	32 (4)	46 (7)	27 (3)

\dot{Q} , gfr und K_f wurden kalkuliert auf der Basis von $3 \cdot 10^4$ Nephrone/Niere

π COP L & P (mmHg) – L&P, errechnet nach der Formel von Landis und Pappenheimer (s. Kapitel 9.7.1, Abb. 9.1.5.)

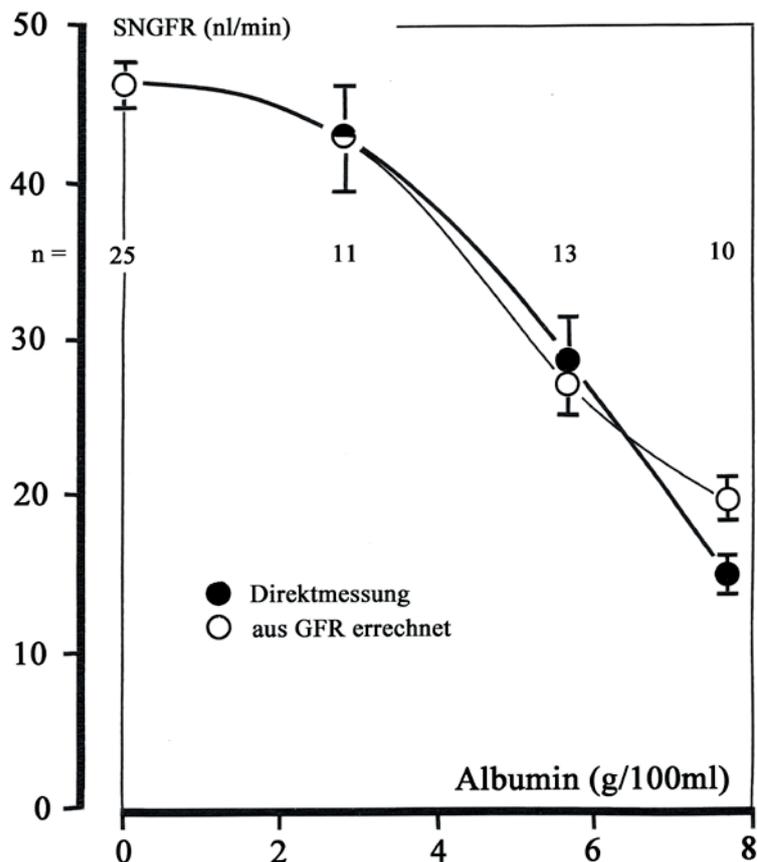


Abb. 11.1. : Vergleich der SNGFR-Direktmessung durch Mikropunktion mit der GFR der Gesamtniere (240). Zugrunde gelegt wurde eine mittlere Zahl von 30000 Nephronen pro Rattenniere. Die Einzelnephronfiltrationsrate (SNGFR) wurde an subcortikalen Nephronen gemessen unter fortlaufender Druckkontrolle (172). Es findet sich eine gute Übereinstimmung im physiologischen Bereich des kolloid-osmotischen Drucks des Perfusats, erst bei hyperonkotischem Perfusat liegt die SNGFR der per Mikropunktion erreichbaren Nephrene deutlich niedriger als die aus der Gesamt-GFR errechnete SNGFR. Hier dürfte sich die höhere SNGFR der juxtamedullären Glomeruli auswirken. GFR-Marker war Polyfructosan, doppelenzymatische Methode nach Schmidt, Makro- und Mikroversion (172, 173, 175, 228, 240, 241).

Tabelle 11.1.4.: zu Abb. 11.1. gehörige Tabelle. Der kolloid-osmotische Druck wurde nach der Landis & Pappenheimer Formel errechnet aus der Albuminkonzentration (240).

Albumin-Konzentration (g/100ml)	COP (mmHg)	SNGFR gemessen (nl/min)	SNGFR errechnet (nl/min)	Zahl der Nephrene ()	Nieren-Gewicht (g)
0		n.g.	46,1±1,5	32 (4)	1,02±0,08
2,79±0,07	9,5	43,2±3,4	42,3±2,4	11 (4)	0,93±0,07
5,64±0,12	23,7	29,0±2,6	27,4±2,0	14 (5)	0,92±0,05
7,67±0,04	37,5	15,3±1,3	20,1±1,1	10 (3)	0,96±0,05

Tabelle 11.1.5.: Hydrodynamik oberflächlich erreichbarer Nephrone (frühproximaler Tubulus) bei Verwendung zu dünner Ureterkatheter („Ureterrückstau“) und Funktionsparameter der Gesamtniere bei steigender Albuminkonzentration (BSA) von 0 bis 4,9g/dl. Pa = 100mmHg, n = Zahl der Tubuli, in Klammern Zahl der Tiere. Das Material dieser Tabelle entstammt der Habilitationsarbeit von 1981 (240), s.a. Abb. 4.4.3.

Zeitfenster 50-70 min

Albumin BSA (g/100ml)	0	2,54±0,16	4,85±0,17
π COP L&P (mmHg)	0	8,47±0,53	19,18±0,67
Perfusionsrate (ml/min·g)	15,0±1,1	19,8±1,4	24,8±0,6
Urinfluss \dot{V} (μl/min·g)	279±30	350±40	208±33
GFR Inulin-Clearance (ml/min·g)	0,50±0,03	0,88±0,04	0,90±0,05
TNa (μmol/min·g)	37,7±3,9	84,7±5,1	106,4±7,0
Na-Resorption %	49,6±3,9	67,6±2,7	82,6±3,7
Glukose-Resorption %	84,2±1,2	92,5±0,6	90,3±2,0
K_{UP}/Inulin_{UP}	1,21±0,15	1,18±0,08	1,49±0,21
\dot{Q}_{O_2} (μmol/min·g)	7,23±0,23	8,02±0,66	8,50±0,58
TNa/ \dot{Q}_{O_2}	5,32±0,54	10,3±0,6	12,6±1,1
Filtrations-Fraktion %	3,49±0,55	4,46±0,53	3,64±0,19
Filtrationskoeffizient Ganzniere (μl/min·mmHg)	28,9±1,8	70,7±3,2	91,5±1,9
Anzahl n =	(4)	(3)	(4)

Zeitfenster 37-115 min

Albumin BSA (g/100ml)	0	2,67±0,03	4,9±0,08
π COP L&P (mmHg)	0	8,99±0,14	19,5±0,2
πCOP (20000 Dalton Membran, mmHg)	0	7,1	16,5
Freiflussdruck ffp (mmHg)	47,7±1,8	52,0±0,5	36,4±0,9
Stoppflussdruck sfp (mmHg)	68,9±1,4	66,1±0,5	46,7±0,9
glomerulärer Kapillardruck gcp (mmHg)	68,9±1,5	75,2±0,5	66,3±0,9
Filtrationsdruck Δp (gcp - ffp)	21,2±1,1	23,2±0,6	29,9±0,8
effektiver Filtrationsdruck efp	21,2±1,1	14,1±0,6	10,3±0,24
Ultrafiltrationskoeffizient K_f (nl/s mmHg)	0,0161±0,0011	0,0393±0,0018	0,0508±0,001
Einzelnephron Flussrate Q (nl/min)	540±68	731±50	856±33,2
Einzelnephron gfr (nl/min)	19,4±0,3	32,2±0,7	31,9±0,6
Anzahl n =	22 (4)	21 (3)	21 (4)

\dot{Q} , gfr und K_f wurden kalkuliert auf der Basis von $3 \cdot 10^4$ Nephrone/Niere

π COP L&P (mmHg) – L&P, errechnet nach der Formel von Landis und Pappenheimer (s. Kapitel 9.7.1, Abb. 9.1.5.)

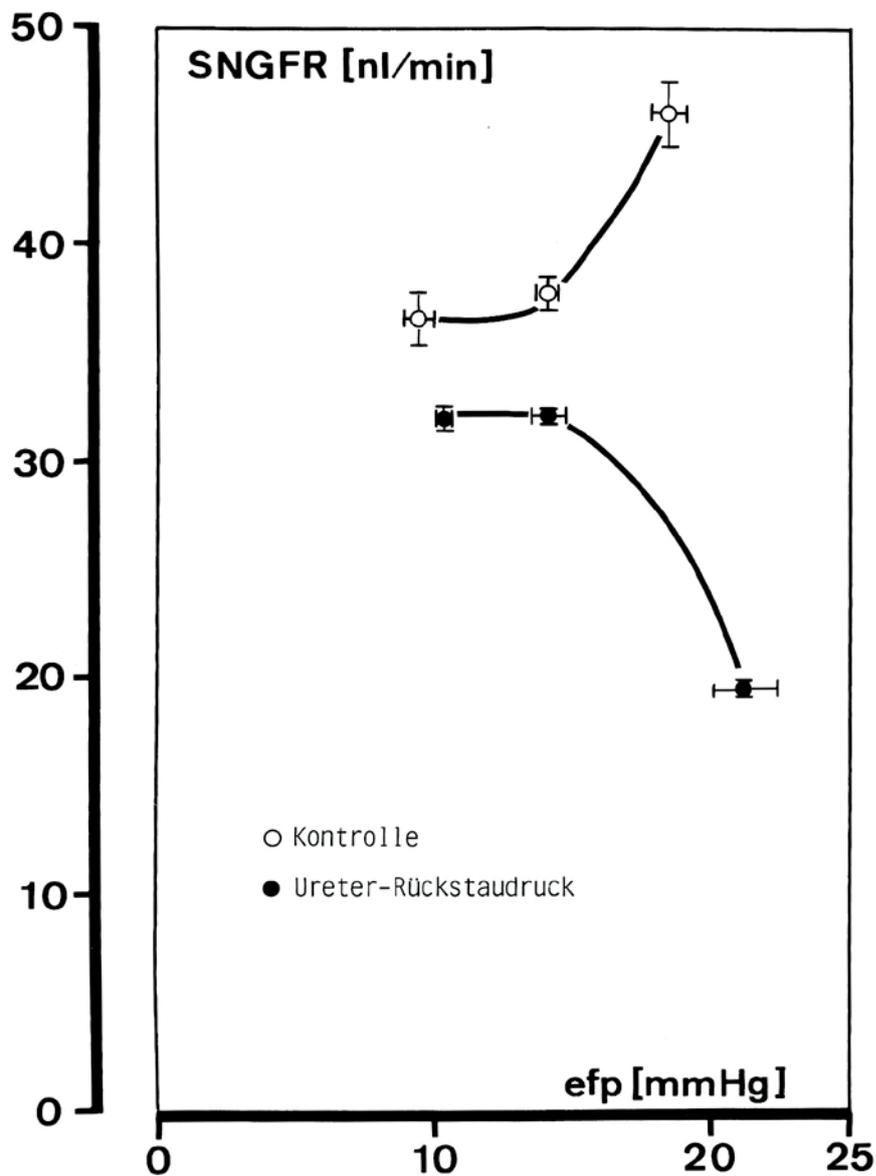


Abb. 11.2.: Effekt inadäquater Ureterkatheter auf das Einzelnephronfiltrat. Die stärksten Auswirkungen auf die Einzelnephron gfr finden sich bei kolloidfreiem Perfusionsmedium und ureteralem Rückstaudruck bedingt durch einen zu engen Ureterkatheter. Dieses Phänomen war unter dem Begriff „erratic behavior of GFR“ gleich von zwei Arbeitsgruppen beschrieben worden (33, 145) und war retrospektiv auf zu enge Ureterkatheter zurückzuführen (240, 241). Die Basisdaten sind in den Tabellen 11.1.3. und 11.1.5. enthalten. Dieser Befund bedeutet, dass bei kolloidfreiem Medium eine postrenale Abflußbehinderung zu einer starken Reduktion der hydraulischen Leitfähigkeit führt bei vergleichbar effektivem Filtrationsdruck. S.a. Abb. 10.1.4.: bei einem COP zwischen 10 und 20mmHg steigt der Ultrafiltrationskoeffizient deutlich an, d.h. die hydraulische Leitfähigkeit der glomerulären Kapillaren nimmt deutlich zu (240).

Tabelle 11.1.6.: Funktionsparameter der isoliert perfundierten Rattenniere nach 50 und 100min Dauer, nach Zugabe verschiedener Zusätze wie **Glutathion & Cystein** und gewaschene **Humanerythrozyten** (5% Hkt) zum Perfusionsmedium. Perfusion im Modus 3 mit Regeneration des Perfusats durch Dialyse, 5g/dl BSA, Basisrezeptur R1 (Tabelle 4.2.) und R2 (Tabelle 4.3). Der Perfusionsdruck lag bei 100mmHg in den Gruppen 1-3, 90mmHg in der 4. Gruppe, um vergleichbare Filtrate zu erhalten.

*Signifikanz gegenüber der Kontrolle (ungepaarter t-Test nach Student), aus (253).

Parameter	Gruppe1 Kontrolle n = 8		Gruppe2 Glutathion n = 3 & Cystein		Gruppe3 & Erythrozyten n = 5		Gruppe 4 wie Gr 2 mit n= 5 Erythrozyten	
	50min	100min	50min	100min	50min	100min	50min	100min
Perfusionsrate (ml/min·g)	25±2	28±2	25±2	26±2	21±2	22±3	21±1	23±1
Urinfluss \dot{V} (μ l/min·g)	142±20	225±33	153±13	198±46	77±29*	115±27*	80±12*	134±19*
Inulin-Clearance (ml/min·g)	0,96±0,04	0,98±0,07	0,91±0,09	0,81±0,02	0,76±0,09	0,77±0,08	1,04±0,05	0,94±0,07
TNa (μ mol/min·g)	123±7	112±8	116±11	96±5	99±10	95±9	143±7	119±8
Na-Resorption %	90±2	81±2	90±1	83±3	94±2	89±3	95±1	88±2*
Glukose-Resorption %	95±1	90±2	96±1	92±1	96±1	95±1*	96±1	96±1*
K_{UP}/Inulin_{UP}	1,59±0,07	1,22±0,09	1,62±0,012	1,35±0,01	1,12±0,007	1,04±0,008	1,17±0,023	1,49±0,008
\dot{Q}_{O_2} (μ mol/min·g)	8,2±0,4	7,9±0,6	6,7±0,5	6,3±0,3	7,6±0,5	7,3±0,4	7,8±0,2	7,3±0,5
TNa/ \dot{Q}_{O_2}	17,3	14,2	17,3	15,2	13,0	13,0	18,3	16,3

Kontrollnieren zeigten eine stabile GFR im Unterschied zu reiner Rezirkulation (s.a. Tabelle 10.1.). Glutathionzusatz mit Cystein zeigte keine Veränderungen zur Kontrolle bis auf den auffällig geringeren Sauerstoffverbrauch. Zugabe von Erythrozyten erhöhte die Natrium- und Wasserresorption und führte zu einer konstanten fraktionellen Glukoseresorption, was darauf zurückgeht, dass morphologisch keine Schäden an proximalen S3-Segmenten und TAL-Segmenten (253) mehr nachweisbar waren. Ein weiterer überraschender Befund ist in Gruppe 4 der Quotient **TNa/ \dot{Q}_{O_2}** von 18 in der ersten Stunde nach Perfusionsbeginn, der vergleichbar ist zu in vivo Verhältnissen. Die Tabelle ist der obigen Arbeit von 1985 entnommen (253).

12. Anhang

12.1. Biochemische Untersuchungen zum Energiestoffwechsel der IPRK

In den frühen single-pass Experimenten mit Haemaccel (harnstoffvernetzte Polygelatine) als Kolloid wurden Kontrollnieren und kurzzeitperfundierte Nieren unter verschiedenen Substratzusätzen mit einer modifizierten Wollenberger-Technik (301) gefriergestoppt und verschiedene Substrate analysiert. Um den Nierenhilus und die Papille auszuschließen wurde eine modifizierte Technik des Gefrierstopps eingesetzt.

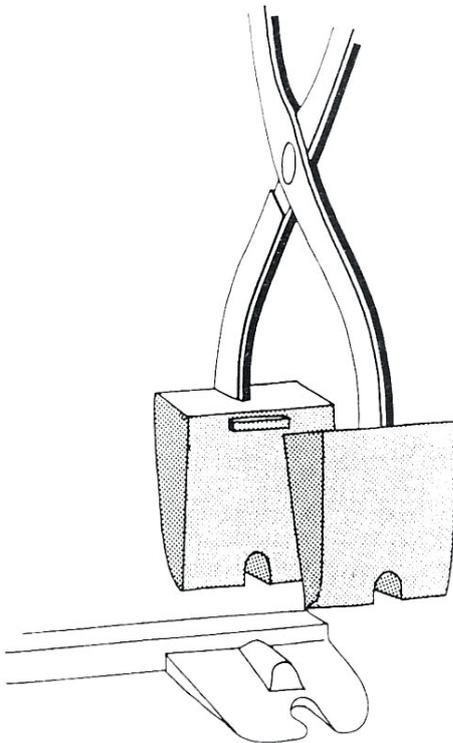


Abb. 12.1.: Gefrierstoppzange (Blocks: Kupfer) mit Abstandsnocke (243) (modifiziert nach Wollenberger), Nierenstütze aus Plexiglas mit zur Führung angebrachter Schiene; die Aussparung an der Zange dient zur Aufnahme von Papille und Nierenhilus. Die Gefrierzange nach Wollenberger (301) wurde so modifiziert, dass mit Hilfe der Abstandsnocke gleich dicke Gewebescheiben der senkrecht aufgerichteten Niere erhalten werden. Die aus der Fettkapsel gelöste Niere wird von der Nebenniere kranial getrennt und mit der Nierenstütze aufgerichtet. So kann sowohl in situ ein Gefrierstopp bei intakter Durchblutung erfolgen oder am isoliert perfundierten Organ nach Umlagerung auf die Nierenstütze. Hilus und Papille bleiben ausgespart.

Beim Vergleich der in vivo Daten mit den Daten der IPRK muss man berücksichtigen, dass die isolierte Niere schon nach kurzer Perfusionszeit ein höheres Feuchtgewicht hat (Anstieg um 16,8-24,4% der in vivo Kontrolle). So ist z.B. der Abfall des ATP nur 33% vom in vivo-Wert. Berücksichtigt man auch den ATP-Gehalt von Blut für die in vivo Situation gegenüber dem blutfreien Perfusat ist der Abfall noch geringer und ist vergleichbar den Werten, die unter Mikropunktionsbedingungen in vivo gemessen werden (Roland Kirsten, persönliche Mitteilung, FU Berlin).

Tabelle 12.1.: Metabolitkonzentrationen in gefriergestopptem Nierengewebe (246) (10^{-9} mol/g Feuchtgewicht). Die Succinatdaten wurden im Rahmen der Dissertation von Ingrid Krause erweitert und in 3 verschiedenen Konzentrationen erneut gemessen (s. Tab. 12.2.).

Substrat	in vivo		in vitro		
	Kontrolle	Blut	Kontrolle	Oxalazetat 1mmol/l	Succinat 10mmol/l
G6P	58,3 ± 2,3		34,0 ± 11,2	32,1 ± 3,1	17,8 ± 4,05
F6P	16,1 ± 0,2		13,5 ± 4,0	9,5 ± 1,7	
2-P-Glycerat	7,2 ± 2,1		8,1 ± 5,7	25,0 ± 7,2	
3-P-Glycerat	78,7 ± 4,8		58,6 ± 3,4	112,0 ± 20,2	
PEP	29,0 ± 2,2		27,8 ± 10,4	120,0 ± 37,3	
Pyruvat	88,5 ± 5,3	74,8	43,5 ± 10,1	208,0 ± 3,6	35,9 ± 11,3
Laktat	828,0 ± 82,8	1728,0	523,5 ± 66,8	580,0 ± 45,7	410,4 ± 47,1
L/P	9,4	23,1	12,0	2,8	11,4
ATP	1734,0 ± 34,1		972,8 ± 50,7	734,0 ± 64,6	475,2 ± 85,4
Zitrat	209,0 ± 13,7		42,0 ± 6,6	94,2 ± 10,7	45,0 ± 11,2
Malat	123,8 ± 16,9			78,1 ± 10,9	
MW ± SEM	n = 6	n = 6	n = 6	n = 4	n = 6

Tabelle 12.2.: Stoffwechseleffekt ansteigender Succinatkonzentrationen im Perfusat auf den Metabolitgehalt in gefriergestopptem Gewebe (123)(10^{-9} mol/g Feuchtgewicht), n = 6.

Substrat	Kontrolle	Succinat	Succinat	Succinat
		1mmol/l	4mmol/l	10mmol/l
ATP	806 ± 67	1025 ± 23*	754 ± 83**	507 ± 38***
ADP	590 ± 29	467 ± 17	455 ± 35	553 ± 38
AMP	414 ± 42	299 ± 28	313 ± 26	1145 ± 226****
ATP/ADP	1,37	2,19	1,66	0,92
∑ Adenin-Nukleotide	1840	1790	1522	2205
2-PG	71 ± 6	405 ± 30	78 ± 4	50 ± 5
PEP	162 ± 13	177 ± 18	189 ± 15	84 ± 15
Pyruvat	27 ± 3	50 ± 6	55 ± 2	37 ± 5
Lactate	907 ± 111	838 ± 205	632 ± 107	870 ± 95
L/P	33,6	16,8	11,5	23,5
Malat	122 ± 8	148 ± 119	357 ± 25	415 ± 44

*p<0,025

**p<0,02

***p<0,005

****p<0,0025

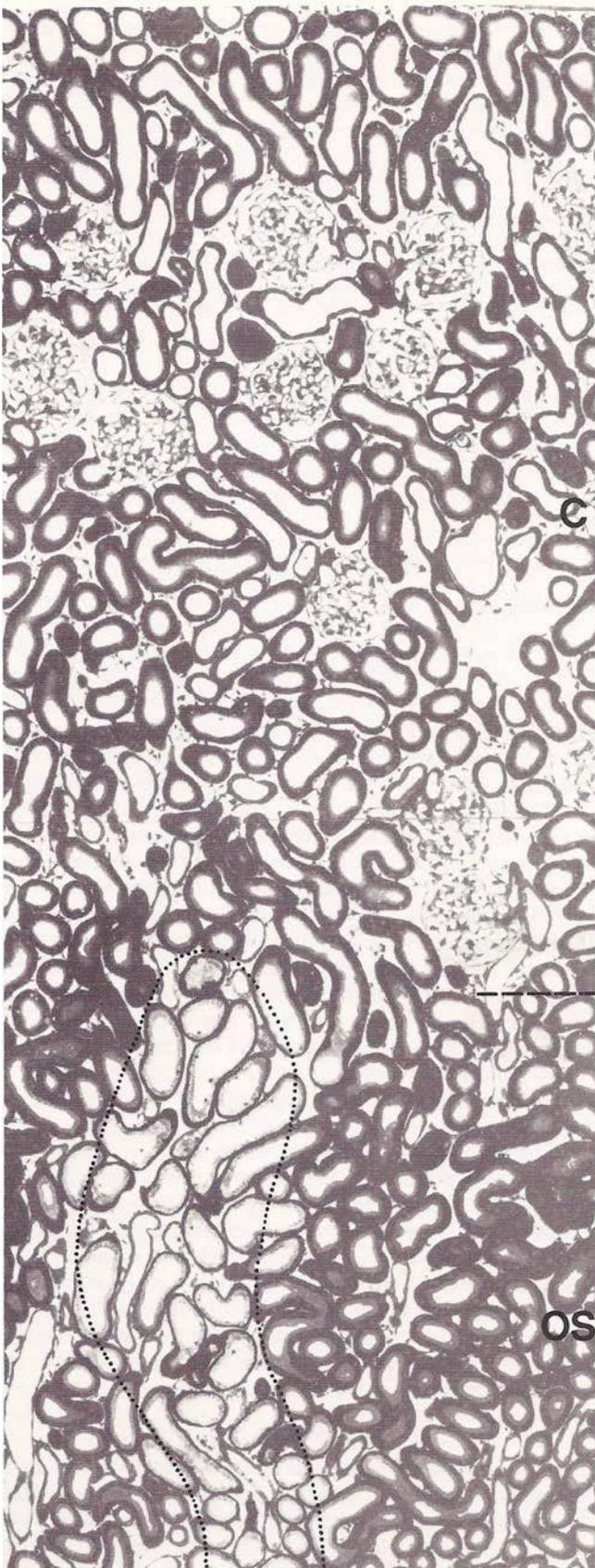
Der Metabolitgehalt in gefriergestopptem Gewebe ist auf Feuchtgewicht bezogen. Würde man auf Trockengewicht beziehen würden, wie oben diskutiert, die Unterschiede zu den in vivo Kontrollen geringer werden, wie aus den Elektrolytanalyse von Petra Brandt an in vivo Nieren und isoliert perfundierten Nieren bekannt ist (35). Das Trockengewicht der in vivo Nieren lag bei $20,0 \pm 0,31\%$, das der isoliert perfundierten Nieren bei $16,85 \pm 0,21\%$, was

einen Umrechnungsfaktor von 1,187 ergibt. Damit läge z.B. das ATP in den in vitro Kontrollen bei $1155 \cdot 10^{-9}$ mol/g Feuchtgewicht anstatt $973 \cdot 10^{-9}$ mol/g Feuchtgewicht. Dabei ist nicht berücksichtigt, dass isolierte und zellfrei perfundierte Nieren im Gefäßbett keine Zellen enthalten wie in vivo Präparate (ATP ist z.B. enthalten in Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten).

Funktionelle und morphologische Hinweise für einen Sauerstoffmangel an der zellfrei perfundierten Rattenniere.

In den frühen Arbeiten von Weiss und seiner Arbeitsgruppe in Hamburg und Kiel (135, 294) und der Arbeitsgruppe von Ochwad (64) sind deutliche Hinweise für einen relativen Sauerstoffmangel der zellfrei perfundierten Niere beschrieben worden. 1976 fanden De Mello und Maack durch Mikropunktionsstudien an der isolierten Niere einen funktionellen Defekt (60), den sie auf die TAL-Segmente beziehen konnten. Venkatachalam hat 1978 die für O₂-Mangel empfindlichen Areale in den Markstrahlen der Nierenrinde und dem äußeren Mark morphologisch beschrieben und 3 Jahre später war es die Arbeit von Alcorn, in der dies auch an der isolierten Niere beschrieben wurde. Wir haben uns parallel zu der Arbeitsgruppe von Franklin Epstein in Boston (36-40) mit dem Thema beschäftigt (111, 233, 240, 249, 250, 251, 253) und konnten eigene Vorstellungen dazu entwickeln auch im Vergleich mit in vivo Untersuchungen an der exponierten Niere. Durch die Kooperation mit Wilhelm Kriz in Heidelberg sind die morphologischen Schäden in einen funktionellen Kontext gebracht worden (253) der auch Anregung gab für die weiteren Untersuchungen. Ein Spaziergang und eine Gespräch mit Christian Bauer am Ufer der Moldau 1982 hat zu der Frage geführt, ob Glomeruli arterielles Blut sehen so wie man das damals gesehen hat. Dies hat mich dann dazu gebracht, mit Unterstützung von Horst Baumgärtl und Dietrich W. Lübbers im MPI Dortmund die technischen Voraussetzungen zur Messung von pO₂ an oberflächlichen Glomeruli und Tubuli im Labor in Hannover zu etablieren. Neben den in Glas eingeschmolzenen Platindraht-Mikroelektroden von Horst Baumgärtl haben wir von Herrmann Metzger in Hannover auch die Goldmehdrahtelektrodenteknik adaptieren können. Dies hat zu mehreren Arbeiten geführt (111, 249, 250, 251) mit dem Nachweis einer präglomerulären Shunt diffusion. Uwe Jost und Harald Bertram waren zwei Doktoranden, die wesentlich dazu beigetragen haben. Harald Bertram hat seine Dissertation 1991 an der Medizinischen Hochschule Hannover abgeschlossen mit dem Thema: Die Bedeutung der präglomerulären Shunt diffusion für Blutgase in der Nierenrinde für die intrarenale Lokalisation der Erythropoietinsynthese. Ein Vergleich experimenteller Befunde an der Rattenniere mit einem mathematischen Shunt diffusionsmodell. In den Publikationen (250, 251) sind beide Doktoranden vertreten. Das folgende Bildmaterial stammt aus der Arbeit von 1985 und ist im Labor von Wilhelm Kriz in Heidelberg entstanden von den in Hannover im Modus 3 perfundierten und perfusionsfixierten Nieren. Modus 3 = Rezirkulation mit Begasung und Regeneration durch Dialyse.

12.2. Morphologisches Bildmaterial der isoliert zellfrei oder mit Erythrozyten perfundierten Niere (240) (253).



Die Abb. wurden von Wilhelm Kriz angefertigt, ein Bild von Karlwilhelm Kühn (Abb. 12.2.08.) Das Bildmaterial stammt von 4 Versuchsgruppen:

Gruppe 1: Kontrollgruppe mit dem Basismedium aus Glukose, Oxalazetat, Pyruvat, Laktat, Glutamat und den 8 Aminosäuren aus dem Protokoll von De Mello und Maack (s.a. R2 Tabelle 4.3.) sowie 10mU AVP (Pitressin®).

Gruppe 2: Protokoll wie Gruppe 1, dazu reduziertes Glutathion 0,2mmol und Cystein 0,5mmol/l in Perfusat und Dialysat.

Gruppe 3: Protokoll wie Gruppe 1, dazu 5% gewaschene Humanerythrozyten ohne obligatorisches inline Filter.

Gruppe 4: Protokoll wie Gruppe 2, dazu 5% gewaschene Humanerythrozyten und ein auf 90mmHg reduzierter Perfusionsdruck um eine vergleichbare GFR zu erreichen (s.a. Tab. 11.1.6.).

Abb. 12.2.01.: Longitudinalschnitt durch Nierenrinde und Außenstreifen des äußeren Marks. Gruppe 2, zellfreie Perfusion mit Glutathion und Cystein, Fixierung nach 2h. Innerhalb der Nierenrinde (C) sind Glomeruli, Tubuli und Blutgefäße strukturell intakt. Im Aussenstreifen (OS) sind Nekrosen von P₃-Segmenten des proximalen Tubulus in Säulen (gepunktetes Areal) angeordnet. Dies beginnt im Basalbereich der Markstrahlen und reicht bis zur Grenze zwischen Außen- und Innenstreifen des äußeren Marks. Details in Abb. 12.3. Epon 1µm Schnittdicke, Methylenblau und Azur II, Vergrößerung: LM x 100. Erst in der höheren Vergrößerung wird sehr deutlich, wie ausgeprägt diese S₃-(P₃)-Segment Veränderungen sind (Abb. 12.2.03.).

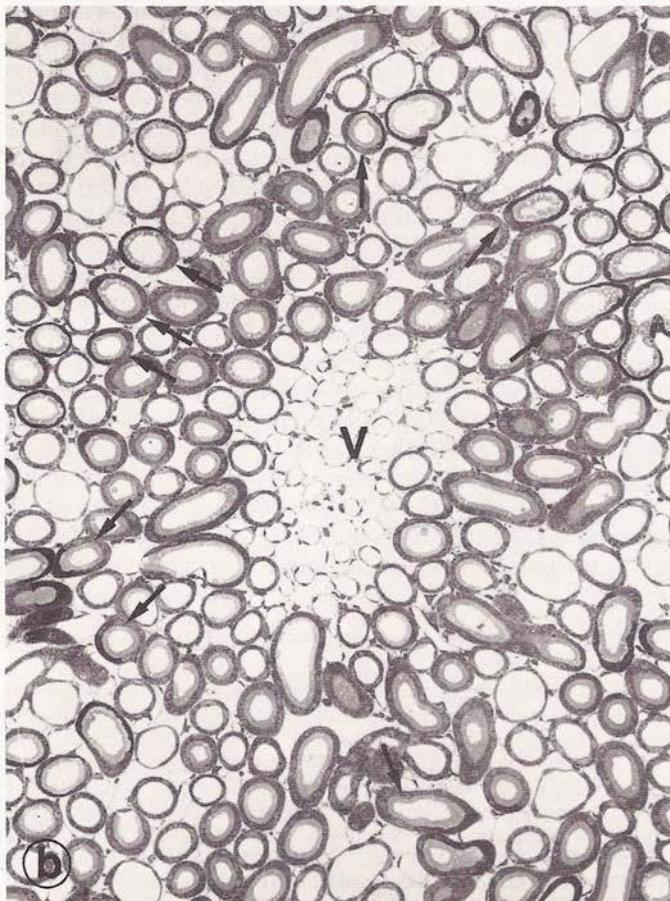
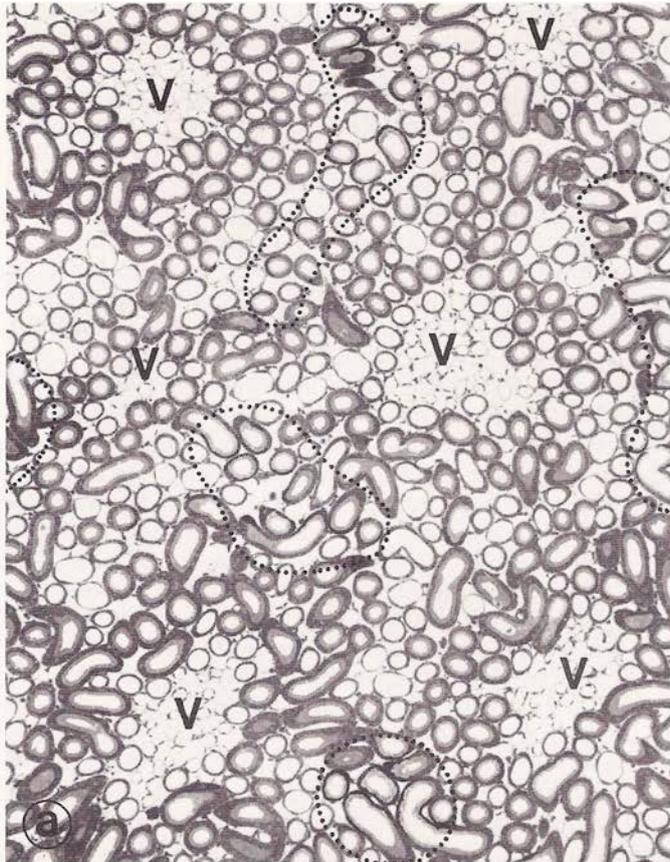


Abb. 12.2.02.: Querschnitte durch den Außenstreifen des äußeren Marks. Niere der Gruppe 1, zellfreie Perfusion über 2h.

a) Verteilung der Areale mit degenerierten P_3 -Segmenten (gepunktetes Areal), die systematisch am weitesten von den Gefäßbündeln der Vasa recta entfernt liegen (V). Tubulusschäden sind an dem dunklen, kondensierten Zytoplasma zu erkennen.

Epon $1\mu\text{m}$ Schnittdicke

Vergrößerung a) LM x 100

b) Geschädigte P_3 -Segmente um die Gefäßbündel herum sind oft mit der einen Hälfte intakt und mit der dem Gefäßbündel abgewandten Seite degeneriert. Epon $1\mu\text{m}$ Schnittdicke

Vergrößerung b) LM x 160

Die Gefäßbündel tragen durch Radiärdiffusion von Sauerstoff zur Versorgung der Tubuli bei, die geringe Sauerstoffkapazität der zellfreien Medien hat zur Folge, daß gefäßbündelferne Areale unterversorgt sind. Das Charakteristische der Nekrosen der P_3 -Segmente ist die Koagulationsnekrose, bei der es zum Wasserverlust der Zellen kommt mit Schrumpfung von Zytoplasma und Zellkern und zudem verdichten und verdünnen sich die Mikrovilli, bevor sie ins Lumen abgestossen werden.

Verschiedene Stadien dieser Prozesse lassen sich beobachten und dies sogar im gleichen Tubulus, indem Zellen einer Seite oft intakt, auf der gegenüberliegenden Seite aber defekt sind (s. folgende Abb.).

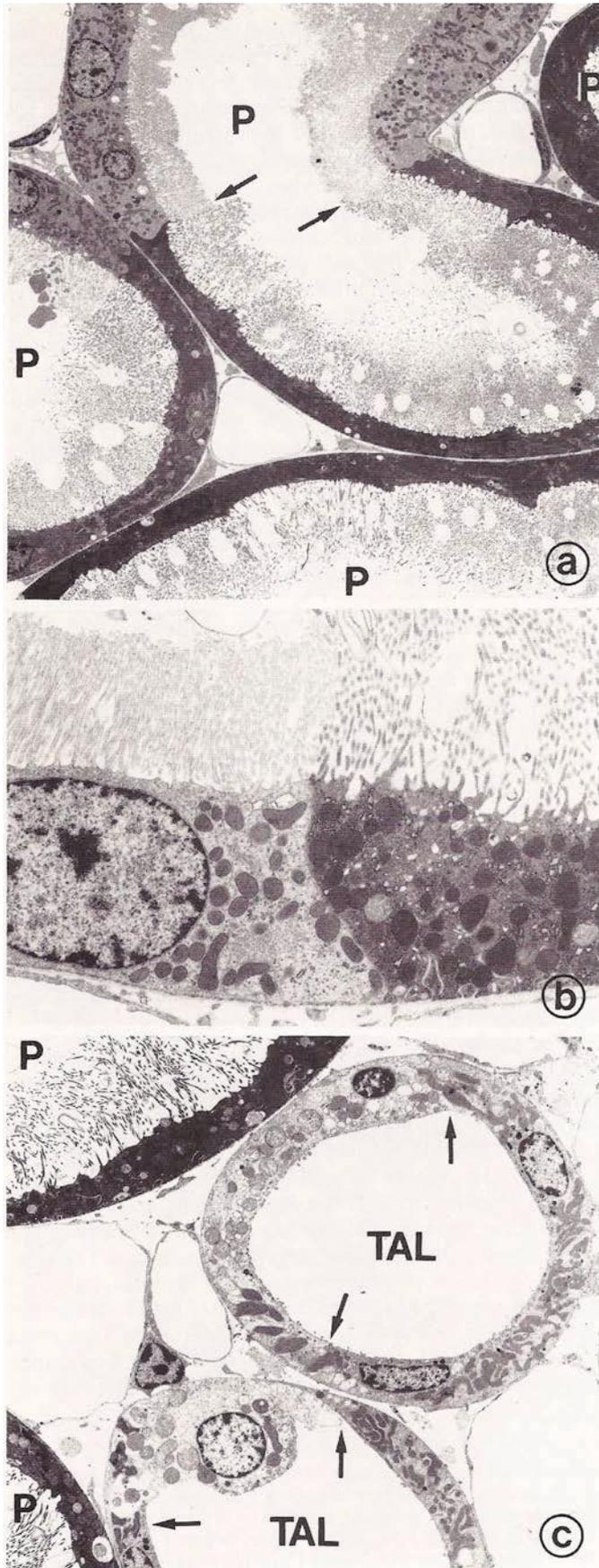


Abb. 12.2.03.: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Struktur-schäden. Niere der Gruppe 1 (a und b) und der Gruppe 2 (c). Zellfreie Standardperfusion über 2h.

a) zu sehen sind 4 geschädigte S_3 -(P_3)-Segmente des proximalen Tubulus. Die Zellen sind geschrumpft im Sinne einer Koagulationsnekrose. Die Grenzen zu intakten Zellen sind scharf (s. Pfeile).

Vergrößerung: EM x 1200.

b) Detail der Grenze zwischen intakter und geschädigter P_3 Zelle (frühe Phase). Alle Zellkomponenten incl. der Mikrovilli werden dunkel. Die Mikrovilli beginnen sich abzulösen.

Vergrößerung: EM x 5000.

c) Im Zentrum der geschädigten Tubuli im Außenstreifen. Neben den nekrotischen S_3 -(P_3) Zellen finden sich dicke aufsteigende Henlesche Schleifen – TAL-Segmente, die auch degenerierte Zellen enthalten und diese sind von den intakten Zellen wiederum scharf abgegrenzt (s. Pfeile).

Vergrößerung: EM x 2000.

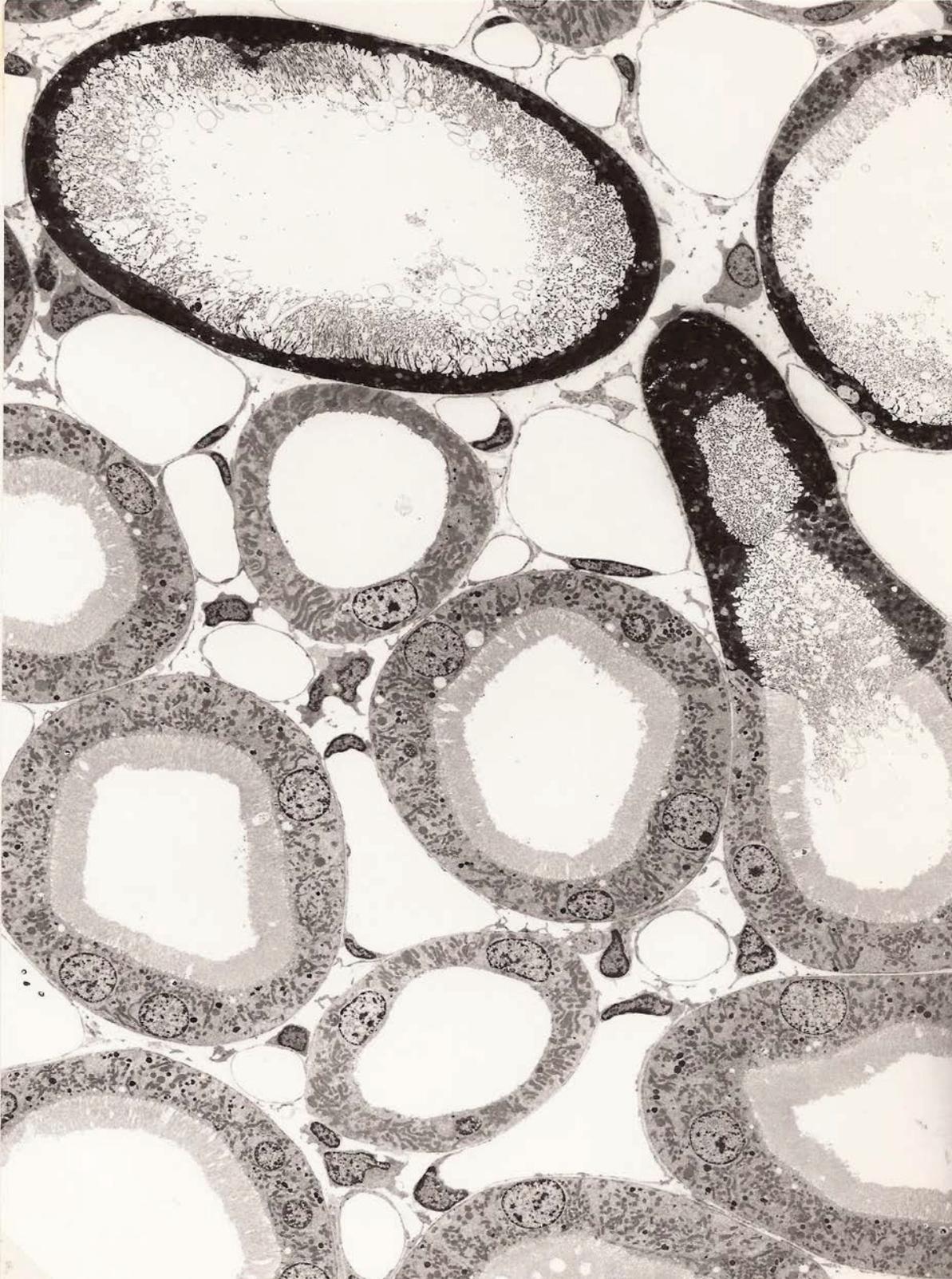


Abb.12.2.04.: Querschnitt im Außenstreifen des äußeren Marks. Koagulationsnekrosen von proximalen S_3 -(P_3)-Segmenten. Rechts im Bild ein Tubulus mit sehr dunklen Zellen, davor Übergangsphase etwas weniger dunkel. Losgelöste Bürstensäume, die z.T. schon ins Lumen abgestossen wurden. Vergrößerung: EM x 3575.

Die folgenden Abb. 12.2.05. – 12.2.08. zeigen intakte Strukturen.

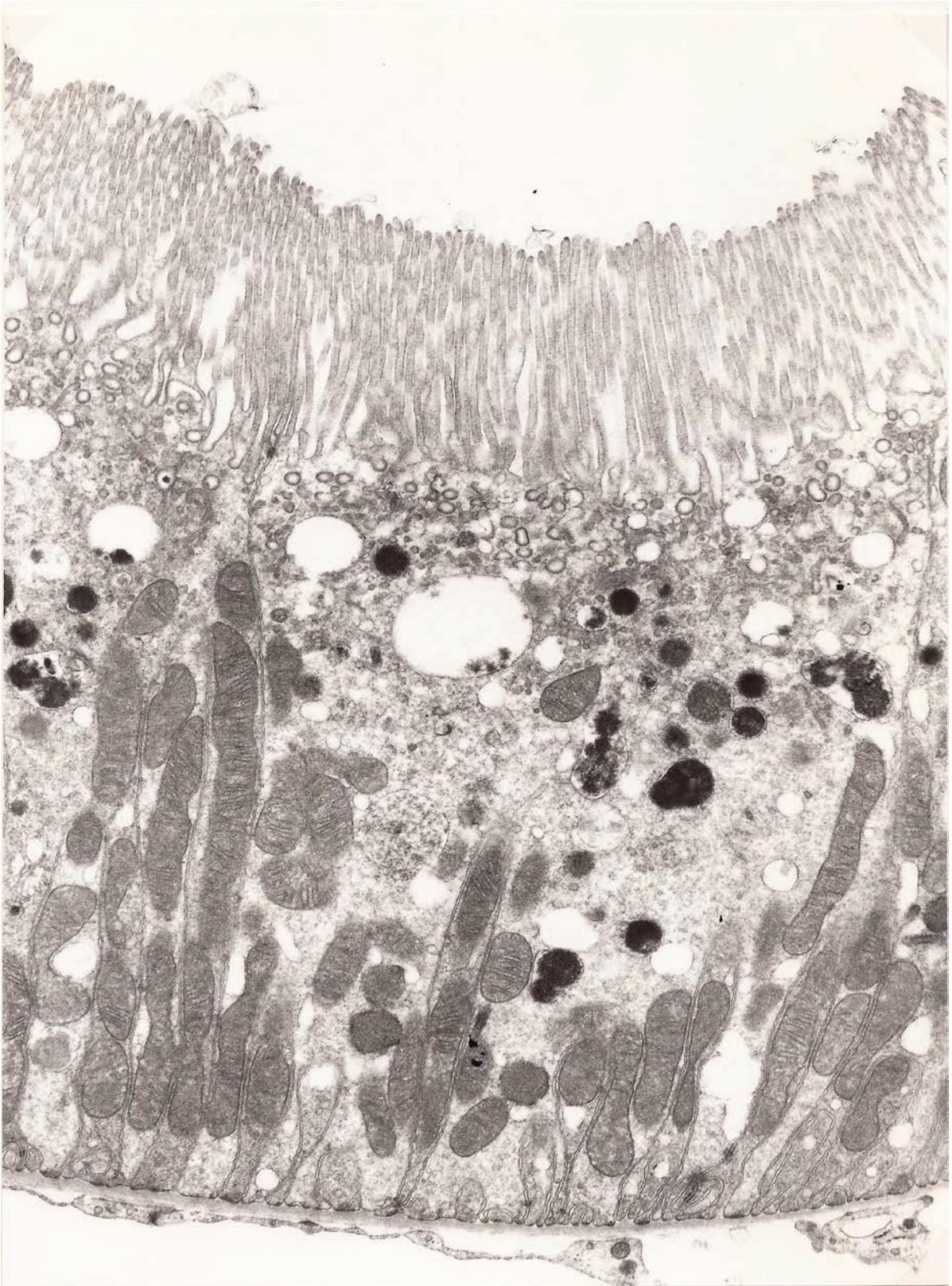


Abb. 12.2.05.: Längsschnitt einer proximalen Tubuluszelle (P₁, P₂-Segment). Intakte Ultrastruktur nach 120 min Perfusionszeit (5g% Albumin, Standardperfusat entsprechend Gruppe 1). Perfusionsfixation, Vergrößerung: EM x 28125.



Abb. 12.2.06.: Längsschnitt distaler Tubulus. Intakte Ultrastruktur. Vergrößerung: EM x 28125

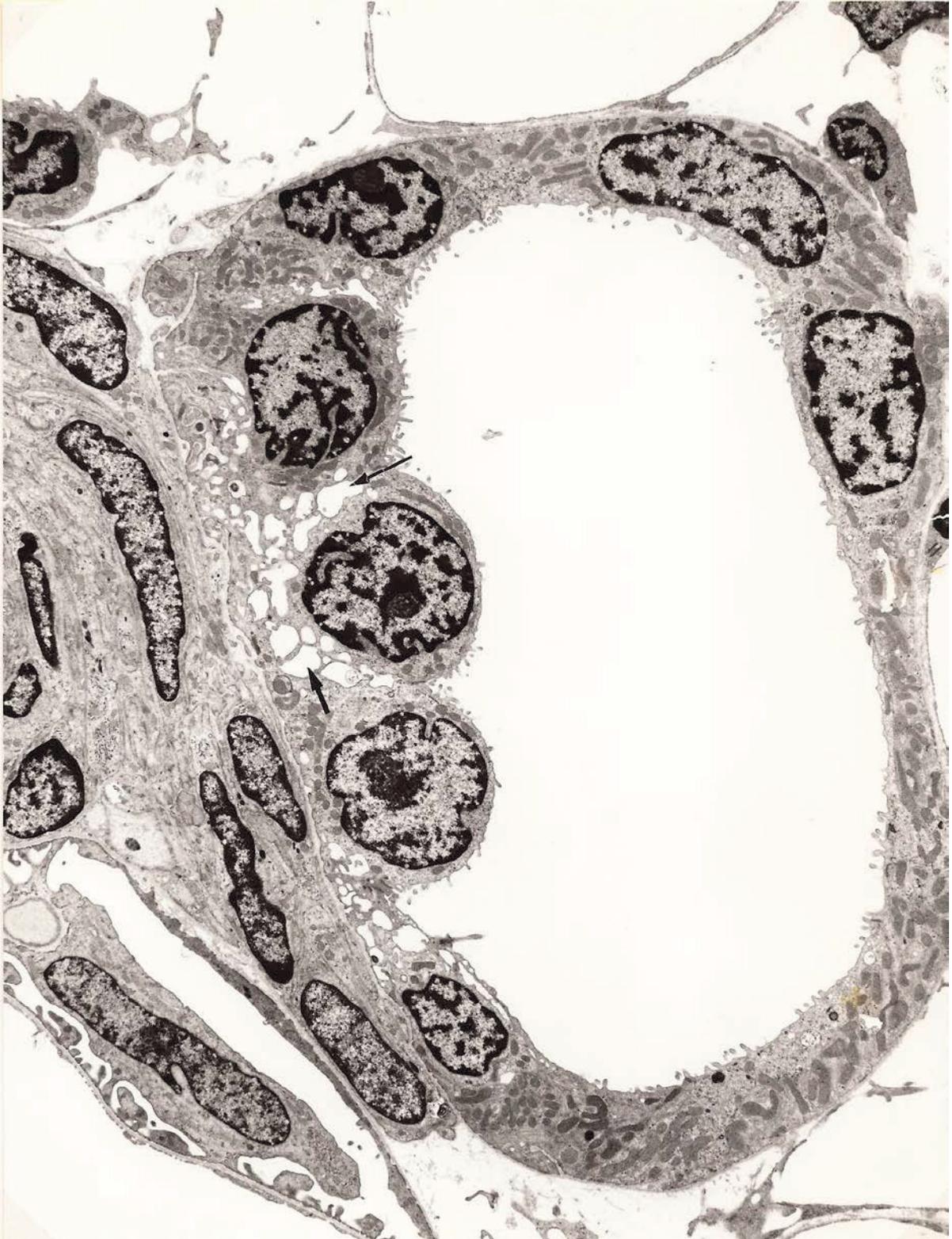


Abb. 12.2.07.: Distaler Tubulus, Macula densa Zellen. Perinukleär finden sich die typischen Vakuolen, die z.B. bei Transporthemmung mit Schleifendiuretika verschwinden. Vergrößerung: EM x 11875.

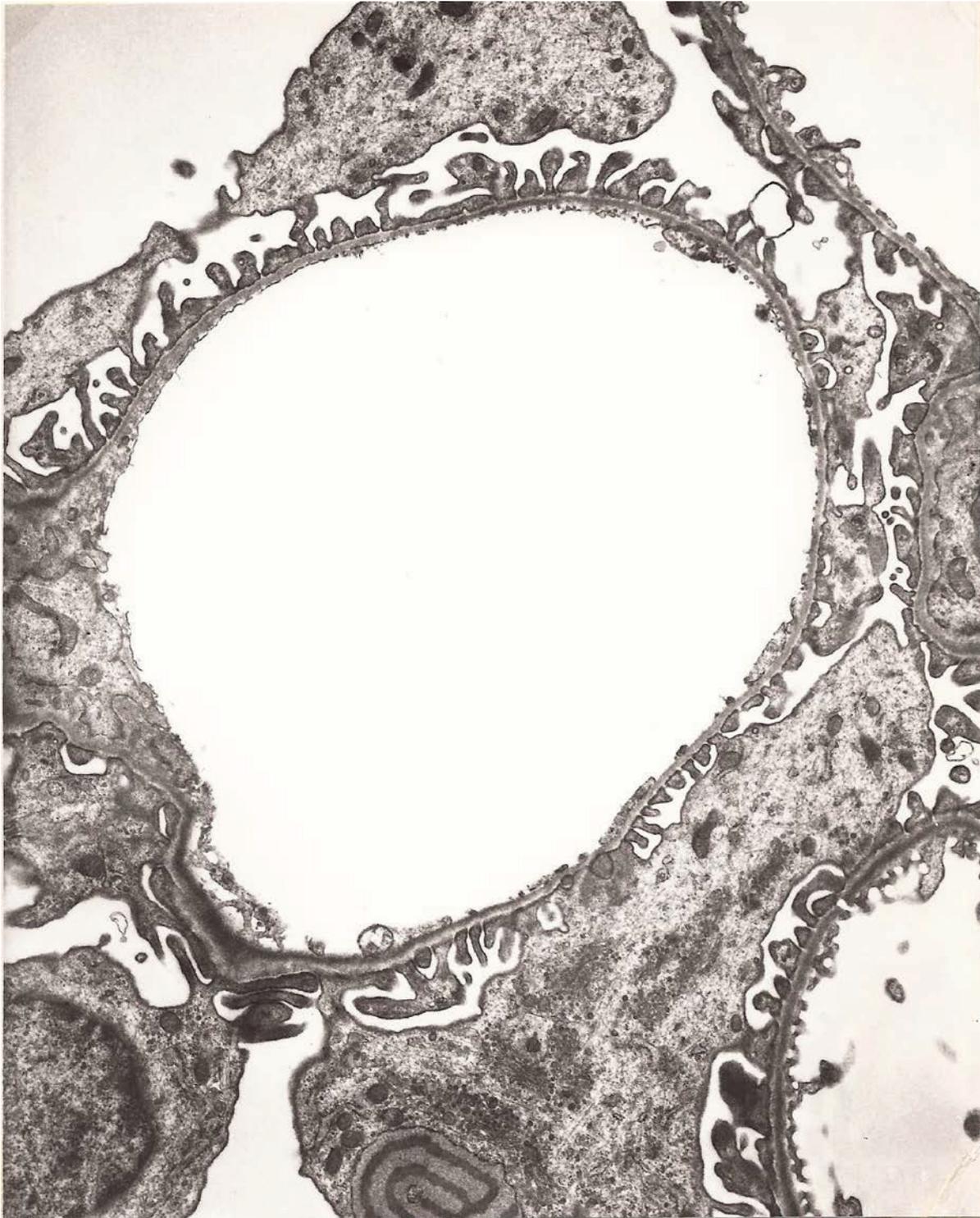


Abb. 12.2.08. Detailbild einer Glomeruluskapillare. Perfusionsfixation nach 2-stündiger Perfusion. Intakte Ultrastruktur. Am unteren Bildrand erkennt man eine Ringstruktur, quasi die Produktionslinie von neuer Basalmembran. Das Bild wurde von Karlwilhelm Kühn angefertigt. Vergrößerung: EM x 24000.

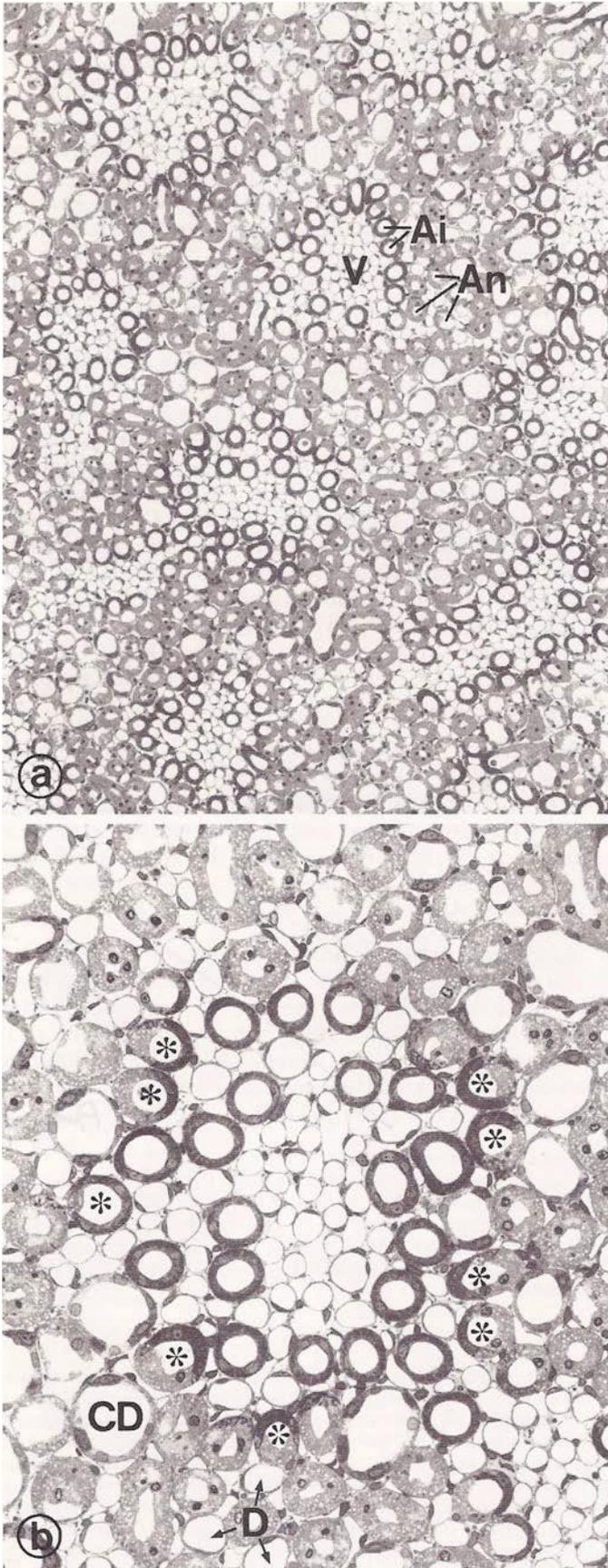


Abb. 12.2.09.: Querschnitte im unteren Drittel des Innenstreifens des äußeren Marks. Niere aus der Gruppe 2, nach 2h zellfreier Perfusion.

a) Sichtbar ist die regelmäßige Anordnung der defekten TAL-Segmente um die Gefäßbündel (V) herum. Die TAL-Segmente in unmittelbarer Umgebung der Gefäßbündel sind intakt (Ai), die am weitesten davon entfernt sind zeigen Nekrosen (An). Im Unterschied zu den Koagulationsnekrosen der P3-Segmente sind die defekten Zellen hell mit Schwellung der Mitochondrien. Alle anderen tubulären Segmente sind intakt.
Vergrößerung: LM x 100.

b) Gefäßbündel von intakten TAL-Segmenten umgeben (dunkler), in der zweiten Reihe zeigen die mit Sternchen markierten TAL-Segmente eine intakte Halbseite zum Gefäßbündel hin und die bündelferne Seite ist nekrotisch. Sammelrohre (CD) und absteigende dünne Schleifensegmente (D) sind strukturell intakt.
Vergrößerung: LM x 300.

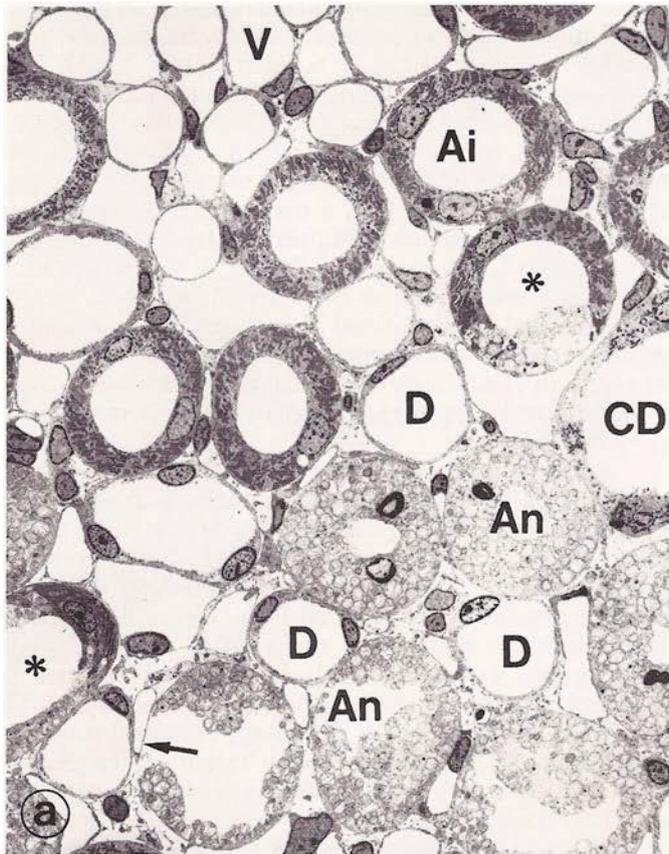


Abb. 12.2.10.: Elektronenmikroskopische Querschnitte im Innenstreifen des äußeren Marks. Niere aus der Gruppe 2, nach 2h zellfreier Perfusion.

a) TAL-Segmente in unmittelbarer Nähe des Gefäßbündels (V) sind intakt (Ai), die am weitesten von V entfernt liegen sind nekrotisch (An).

Dazwischen liegen TAL-Segmente mit Halbschaden (*), geteilt in eine intakte und eine defekte Hälfte. Der Nekrosentyp ist eine hydropische Degeneration mit ausgeprägter Schwellung von Zytoplasma und Mitochondrien; die Zellkerne sind pyknotisch. In den am stärksten geschädigten Tubuli ist die äußere Begrenzung nur noch durch die Basalmembran erhalten (Pfeil).

Sammelrohre (CD) und absteigende dünne Schleifensegmente sind intakt.

Vergrößerung: EM x 750.

b) Profil einer dicken aufsteigenden Henleschen Schleife (TAL) mit einer intakten und einer nekrotischen Hälfte, Grenze durch Pfeile markiert. Man sieht die geschwollenen Mitochondrien und den kleinen pyknotischen Zellkern.

Vergrößerung: EM x 2300.

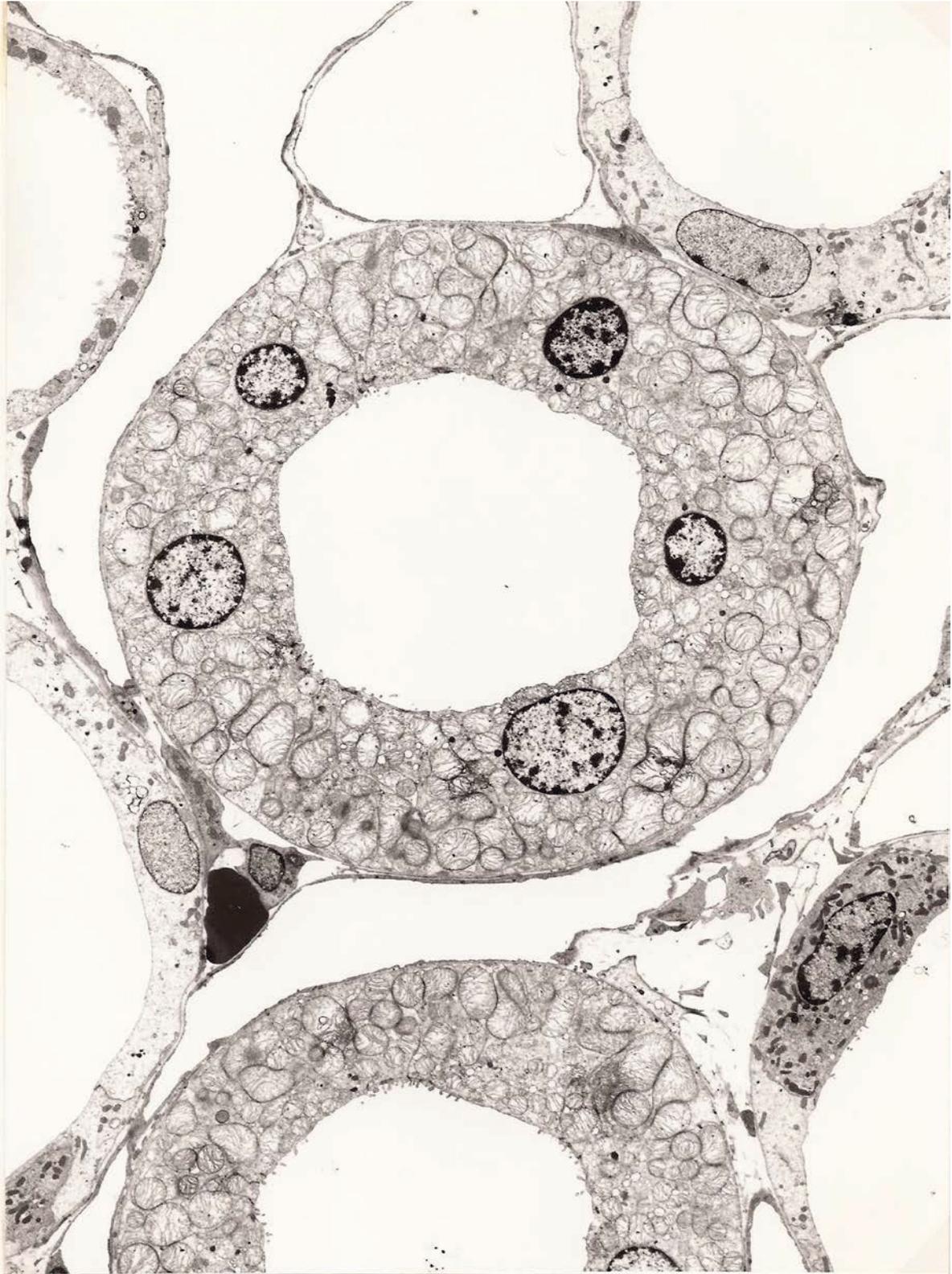


Abb. 12.2.11.: Elektronenmikroskopische Detailaufnahme von defekten TAL-Segmenten. Die angeschwollenen Mitochondrien füllen nahezu den ganzen Zelleib aus, es bleiben nur noch kleine Zytoplasmazwickel übrig. Zellkernpyknose in verschiedenen Stadien. Rechts und links intakte Sammelrohrzellen. Vergrößerung: EM x 6875.

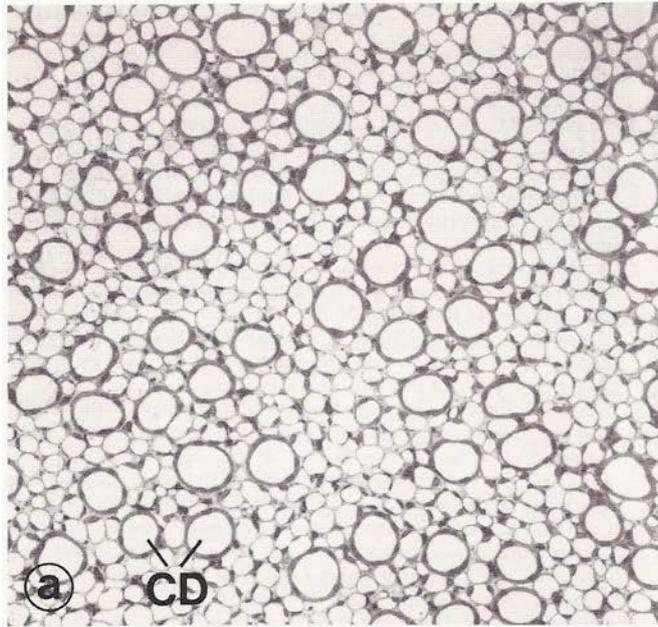
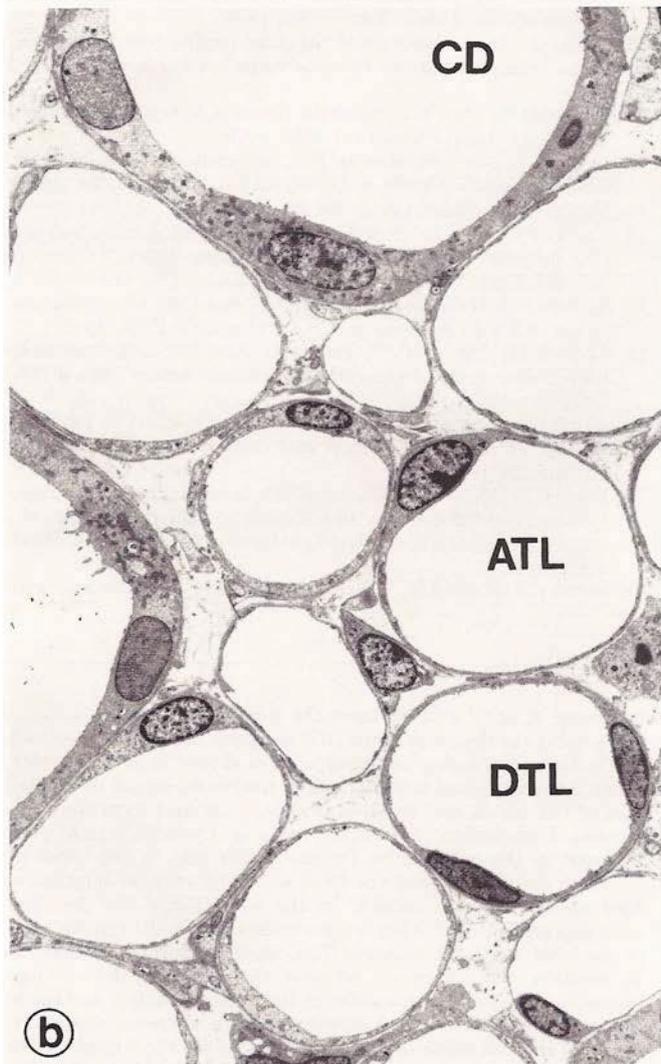


Abb. 12.2.12.: Querschnitt inneres Mark. Niere der Gruppe 1 nach 2h zellfreier Perfusion.

a) Übersichtsbild lichtmikroskopisch. Sammelrohre (CD) sind morphologisch intakt. Vergrößerung: LM x 170.



b) Details elektronenmikroskopisch. Alle Tubuli und Sammelrohre (CD) sind morphologisch intakt. Aufsteigende dünne Henlesche Schleife (ATL), absteigende dünne Henlesche Schleife (DTL). Vergrößerung: EM x 1600.

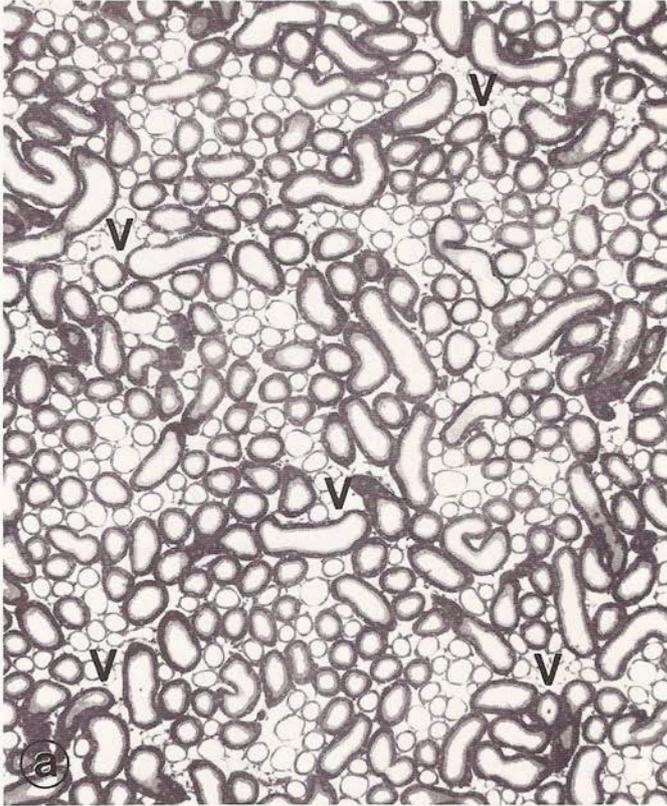
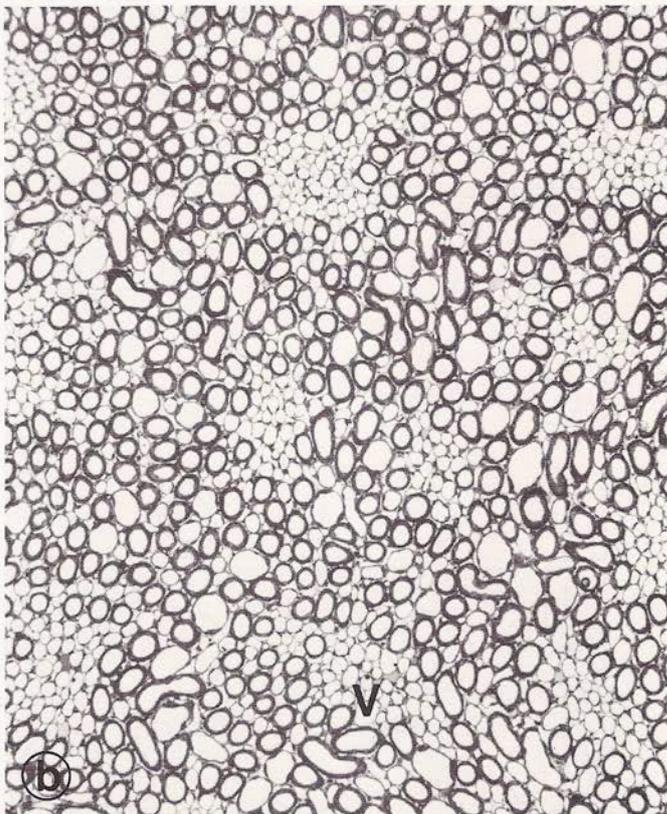


Abb. 12.2.13.: Querschnitt durch den Außenstreifen und den Innenstreifen des äußeren Marks. Niere der Gruppe 4 nach 2h Perfusion mit Zusatz von 5% Erythrozyten.

a) Außenstreifen

Nekrosen wie bei zellfrei perfundierten Nieren finden sich hier nicht.

Vergrößerung: LM. x 75



b) Innenstreifen:

Alle Tubuli erscheinen strukturell intakt. Gefäßbündel (V).

Vergrößerung: LM x 60.

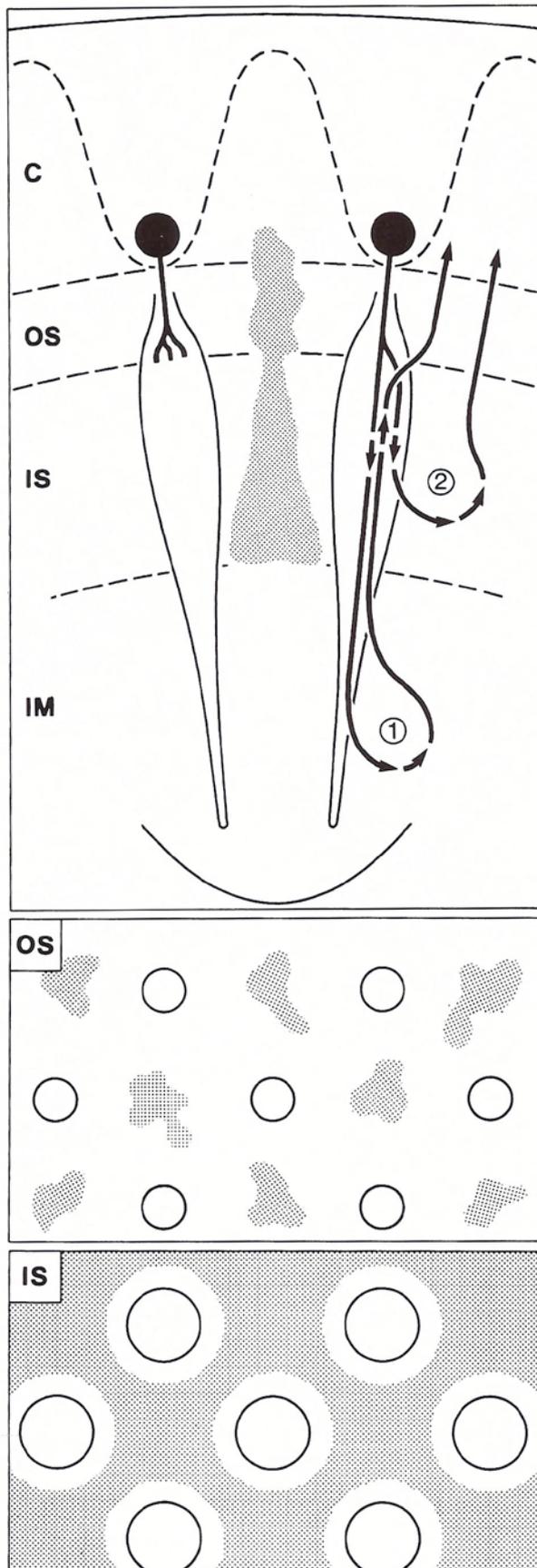


Abb. 12.2.14.: Schematische Darstellung zur Verteilung der Sauerstoffmangelschäden (schraffiert). Oben (*Longitudinalschnitt*) sind zwei Gefäßbündel dargestellt beginnend mit dem zugehörigen Glomerulus in der Nierenrinde (C), durchdringen sie dann den Außenstreifen (OS) und den Innenstreifen (IS) des äußeren Marks und dann das Innere Mark (IM). Die Areale mit geschädigten Tubuli erstrecken sich von der Grenze zwischen innerem und äußerem Mark bis hoch in den basalen Bereich der Markstrahlen in der Nierenrinde und sind immer am weitesten von den Gefäßbündeln entfernt. Die Verteilung und Anordnung der Defektareale im *Querschnitt* unterscheiden sich in Höhe des Außenstreifens (OS, Bildteil Mitte) von denen im Innenstreifen (IS, Bildteil unten). Die Kreise stellen das Gebiet der Gefäßbündel dar, die Defektareale sind schraffiert. Im Außenstreifen sind die defekten P_3 -Segmente auf das Zentrum des Interbündelareals beschränkt, während die defekten TAL-Segmentareale im Innenstreifen konfluieren.

Zusätzlich: Die Durchblutung des Nierenmarks ist postglomerulär. Im Bildteil oben ist der Versorgungskreislauf der absteigenden und aufsteigenden Vasa recta für die Perfusion von innerem Mark und äußerem Mark skizziert.

Pathway 1 zeigt die Durchblutung des Inneren Marks, in dem die aufsteigenden Vasa recta innerhalb des Gefäßbündels aufsteigen, sich dabei mit Sauerstoff wieder beladen und im Bereich des Außenstreifens ausschwärmen.

Pathway 2 zeigt die Durchblutung des Innenstreifens des äußeren Marks in dem die im Gefäßbündel absteigenden Vasa recta Sauerstoff abgeben, aus dem Gefäßbündel austreten und als aufsteigende Vasa recta meist individuell zwischen den Gefäßbündeln an Sauerstoff vorentsättigt bis zur Nierenmarkgrenze aufsteigen. Die Blutversorgung des Außenstreifens ist hauptsächlich durch die aus den Gefäßbündeln austretenden Vasa recta gewährleistet (124, 125).

12.3. Hypothese zum Sauerstoffmangel der zellfrei perfundierten Niere

Die Vermutung, daß eine Perfusion ohne Sauerstoffträger, also ein zellfreies Medium nicht ausreicht ein Organ wie die Niere ausreichend mit Sauerstoff zu versorgen geht auf die Vorstellung zurück, daß es in der Niere Regionen gibt wie das äußere Nierenmark, die schon unter Normalbedingungen in vivo eine hohe Sauerstoffausschöpfung zeigen, bis 80% (37, 54). In dieser Region ist auffällig, daß die TAL-Segmente eine sehr hohe Mitochondriendichte aufweisen und parallel eine hohe Enzymaktivität für die Glykolyse, die um Faktor 10 höher liegt als in proximalen Tubuli (17). Diese hohe Glykolysekapazität kann nur entstehen, wenn es Phasen des Sauerstoffmangels gibt, die zu einer Genaktivierung führen. Inzwischen kennt man das vermittelnde HIF-System (Hypoxie induzierter Faktor, hypoxia-inducible-factor 1 α) (263-265), das auch für die Aktivierung des Erythropoietin-Gens verantwortlich ist. Die beschriebenen morphologischen Schäden im Kapitel 12.2 könnten ihre Erklärung darin finden, daß der tubuloglomeruläre Feedback (TGF) an der zellfrei perfundierten Rattenniere nicht funktioniert (nicht publizierte Daten von Ullrich Gutsche und Reinhard Brunkhorst in meinem Labor in Hannover im Juni 1979), an der mit Blut perfundierten Hundeniere konnte Schnermann einen TGF dagegen nachweisen (229). In vivo ist der TGF in der Lage, die SNGFR zu reduzieren, wenn das TAL-Segment im Sauerstoffmangel seine Energie anaerob durch Glykolyse schöpfen muß, dadurch unzureichend NaCl resorbiert und in der Folge an der Macula densa eine zu hohe NaCl-Konzentration erscheint. Ein Äquivalent dieser Umschaltung von aerob zu anaerob könnte in den Oszillationen tubulärer Drucke gesehen werden, die Leyssac 1983 erstmals beschrieben hat (136), ein Befund, der von Holstein-Rathlou weiterverfolgt wurde (107, 108). Hans-Ulrich Gutsche hat mit einer von ihm entwickelten Mikro-Leitfähigkeitssonde (90) parallel zu den Oszillationen des Tubulusdrucks phasenverschobene aber frequenzgleiche Oszillationen der NaCl-Konzentration in der vorbeifließenden Tubulusflüssigkeit am frühdistalen Tubulus nachgewiesen. Die Oszillationen wurden in leichter Halothan-Narkose (89, 113) erhoben, in Barbituratnarkose sind sie nicht nachweisbar (89).

Ein Äquivalent dieser Oszillation im Tubulusdruck und der distalen Natriumkonzentration fand sich bei der Messung von Sauerstoffdrücken über Tubuli und oberflächlich liegenden Glomeruli, wie weiter unten gezeigt wird.

Die Durchblutung des Nierenmarks erfolgt postglomerulär über die Gefäßbündel von absteigenden und aufsteigenden Vasa recta, eine Voraussetzung für den Aufbau von osmotischen Gradienten durch die Shuntdiffusion von Soluten wie Harnstoff. Hier kommt es auch zur Shuntdiffusion von Blutgasen mit kontinuierlichem Abfall des pO₂ zur Papille hin und Anstieg des pCO₂ (trapping). Zwischen den Gefäßbündeln liegen wechselnd engmaschige individuelle Kapillarnetze, die aus den Gefäßbündeln mit mehr oder weniger vorausgeschöpftem pO₂ gespeist werden. Bastin hat in einer bemerkenswerten Arbeit den Unterschied herausgearbeitet zwischen dem Energiepool von ATP im proximalen Tubulus und dem TAL-Segment und andererseits dem Glukosebestand zwischen beiden Tubulusabschnitten Sekunden nach Start einer Ischämie/Hypoxie. Der proximale Tubulus verliert seinen ATP-Vorrat sehr rasch, während der Glukosebestand lange stabil bleibt.

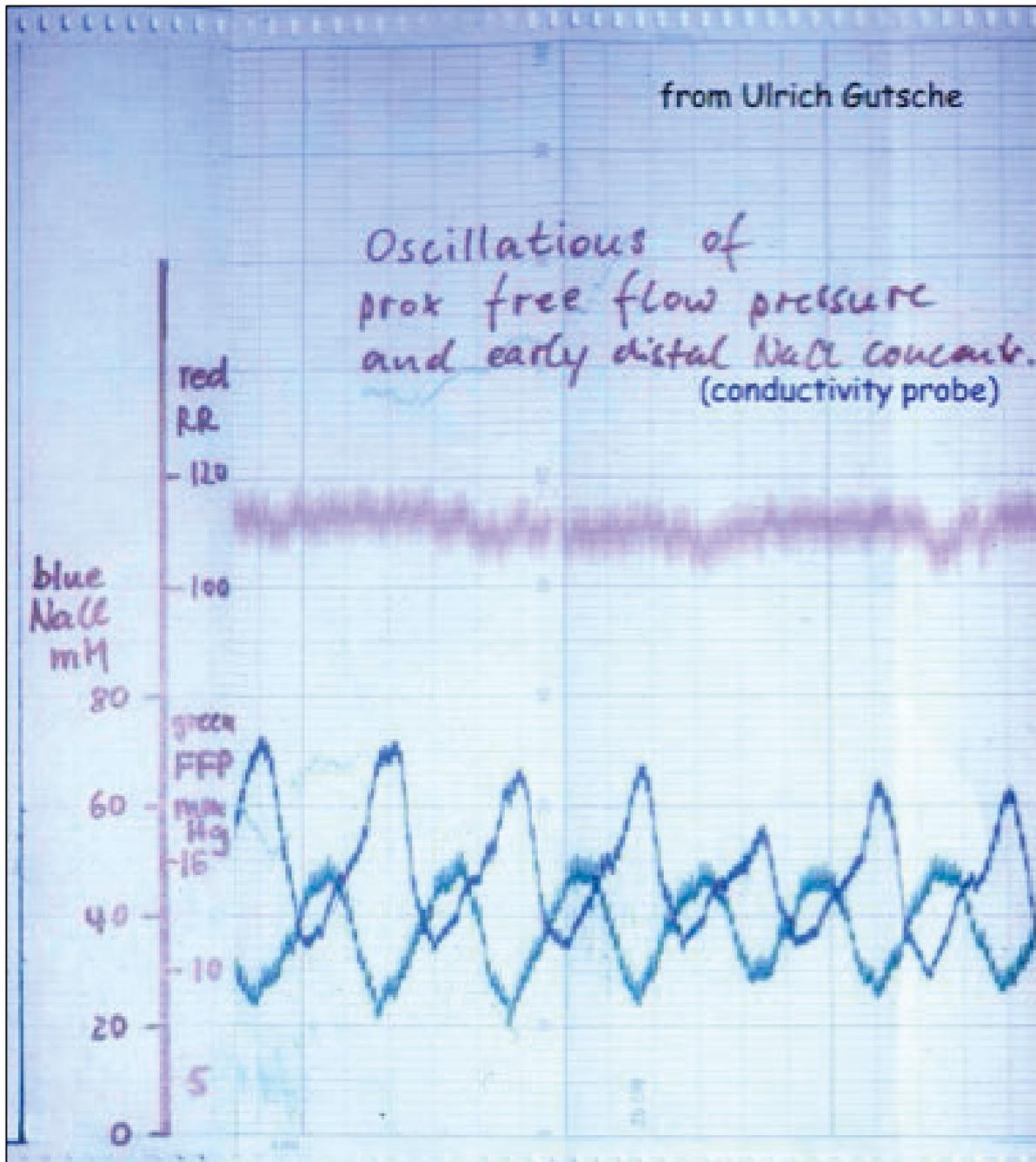


Abb. 12.3.1.: Original-Registrierung der Oszillationen des Freiflußdrucks im proximalen Tubulus und der frühdistalen NaCl-Konzentration (gemessen als elektrische Leitfähigkeit) (90). Die rote Linie oben entspricht dem registrierten Blutdruck in der Art. carotis, die grüne Linie dem Druck im proximalen Tubulus (8-16mmHg), die blaue Linie der Leitfähigkeit als NaCl-Äquivalent (30-75mmol/l). Das Bild wurde mir von Hans Ulrich Gutsch zur Verfügung gestellt. Der Befund entstand in Kooperation im Laboratorium von Paul Leyssac in Kopenhagen (89).

Das TAL-Segment braucht durch anaerobe Glykolyse seinen Glukosebestand innerhalb von 2 min auf, kann damit aber seinen ATP-Bestand über fast 60 Sekunden hoch halten. Die Graphik der Abb. 12.3.2. habe ich aus den Tabellen dieser Arbeit extrahiert (17).

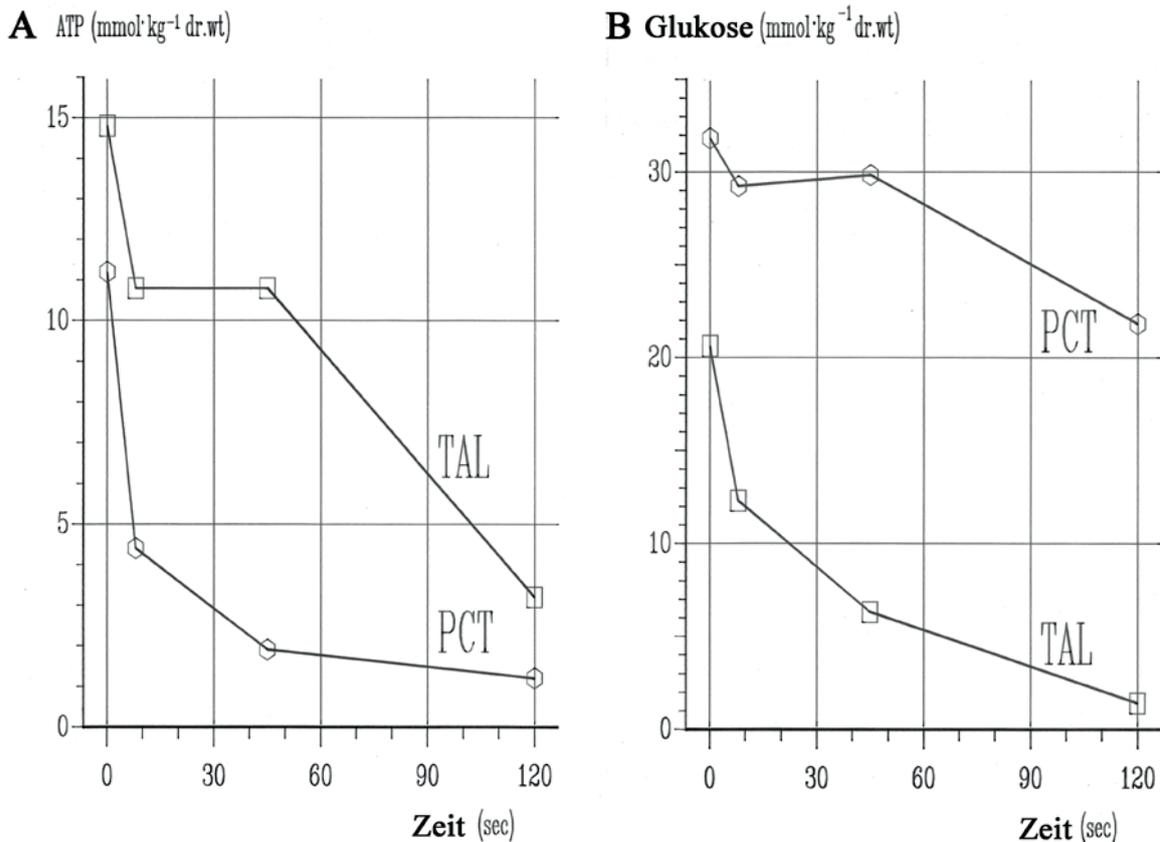


Abb. 12.3.2.: ATP-Bestand (A) und Glukose-Bestand (B) nach Hypoxie im proximalen Tubulus und TAL-Segment im Vergleich. Der proximale Tubulus (PCT) verliert sehr schnell seine Energiereserven in Form von ATP, ohne daß sich der Glukosebestand drastisch verändert, dagegen kann das TAL-Segment in Hypoxie durch Glykolyse seinen Glukosebestand innert 2 min aufbrauchen, damit aber seinen Energiepool an ATP über gut 60 Sekunden aufrechterhalten. Dies reflektiert das hohe Glykolyse-Potential der TAL-Segmente im Unterschied zum proximalen Tubulus (Graphik aus den Daten von Bastin erstellt (17)).

Dieser Zeitgang ist mit der Generation der Oszillationsfrequenz für diejenigen Nephrone kompatibel, deren Filtrat die Resorptionskapazität des zugehörigen TAL-Segmentes überschreitet. Damit kann der TGF auch den proximalen Tubulus vor Sauerstoffmangelschäden schützen. Nicht nur im Nierenmark kommt es zur Shunt diffusion von Blutgasen, sondern auch in der Nierenrinde, was lange vermutet worden war, aber durch Messungen an oberflächlich erreichbaren Glomeruli bei Munich-Wistar-Frömter Ratten definitiv belegt werden konnte (250). Dem entspricht der Befund, daß ein erheblicher Teil der Nierenrinde nicht so gut mit Sauerstoff versorgt ist wie die hohen venösen pO_2 Werte mit dem optisch eher hellrotem Nierenvenenblut vermuten lassen. Dies war die Ausgangslage mit der wir weitere Untersuchungen zum pO_2 an der Nierenoberfläche in vivo mit Mehrdrahtgold-Mikroelektroden durchgeführt haben und in einem Teil der Nephrone Oszillationen des Sauerstoffdrucks finden konnten. Wie bei Leyssac gelang dies nur in leichter Halothannarkose. Die folgenden Abb. zeigen Ableitungen von glomerulären und tubulären pO_2 Drücken an der Nierenoberfläche von Munich-Wistar-Frömter Ratten.

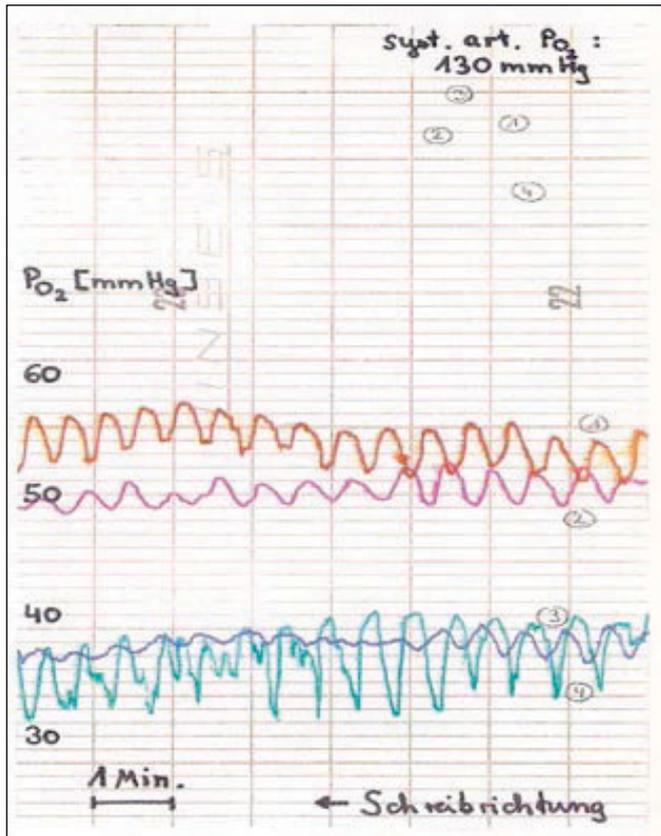
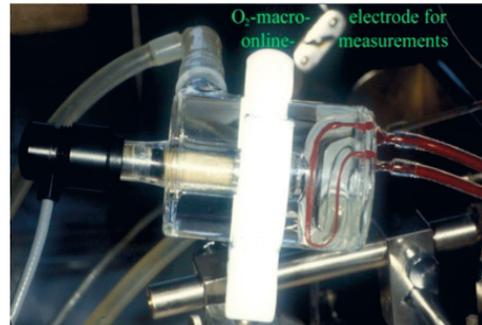


Abb. 12.3.3.: Original-Registrierung des pO_2 an der Nierenoberfläche einer Munich-Wistar-Frömter Ratte in vivo & in situ. Der mit einer Makro- O_2 -Elektrode (unten) gemessene systemarterielle pO_2 lag unter Beatmung mit 25% O_2 hier bei 130 mmHg; femoro-femorale AV-Shunt mit kontinuierlichem Durchfluss.



Die Drähte 1 & 2 der Mehrdraht (8)-Mikrogolddelektrode lagen unmittelbar über dem Glomerulus (oker/ rot), die Drähte 3 und 4 (blau/grün) über proximalen Tubuli. Die Frequenz der Oszillation lag im Mittel bei 2/min bzw 33mHertz. Die pO_2 Drücke über Glomeruli und Tubuli sind in der Höhe deutlich abgrenzbar. Die Abb. ist der Dissertation von Oliver Johns entnommen (111, 249), ebenso die folgende Abbildung.

Die Frequenz der Oszillation lag im Mittel bei 2/min bzw 33mHertz. Die pO_2 Drücke über Glomeruli und Tubuli sind in der Höhe deutlich abgrenzbar. Die Abb. ist der Dissertation von Oliver Johns entnommen (111, 249), ebenso die folgende Abbildung.

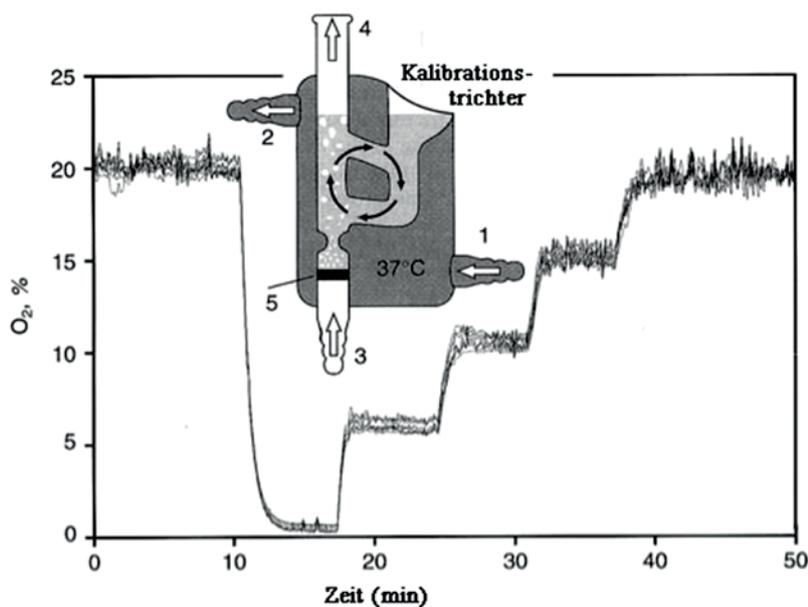


Abb. 12.3.4. Schema der Eintauchkalibrierkammer mit Wasserbad-Temperatur (1, 2). Das Kalibriergas steigt – in einer Fritte (5) fein verteilt – im Schlot 3/4 nach oben und bringt die Kalibrierflüssigkeit wie in einer Ussing-Kammer zur Rotation, ohne dass Gasblasen in den Kalibrations-trichter gelangen. In der Abbildung stammt die Kalibration aller 8 Golddrähte aus einer Originalkalibration. Mehr Details finden sich in der Originalpublikation. (111, 249).

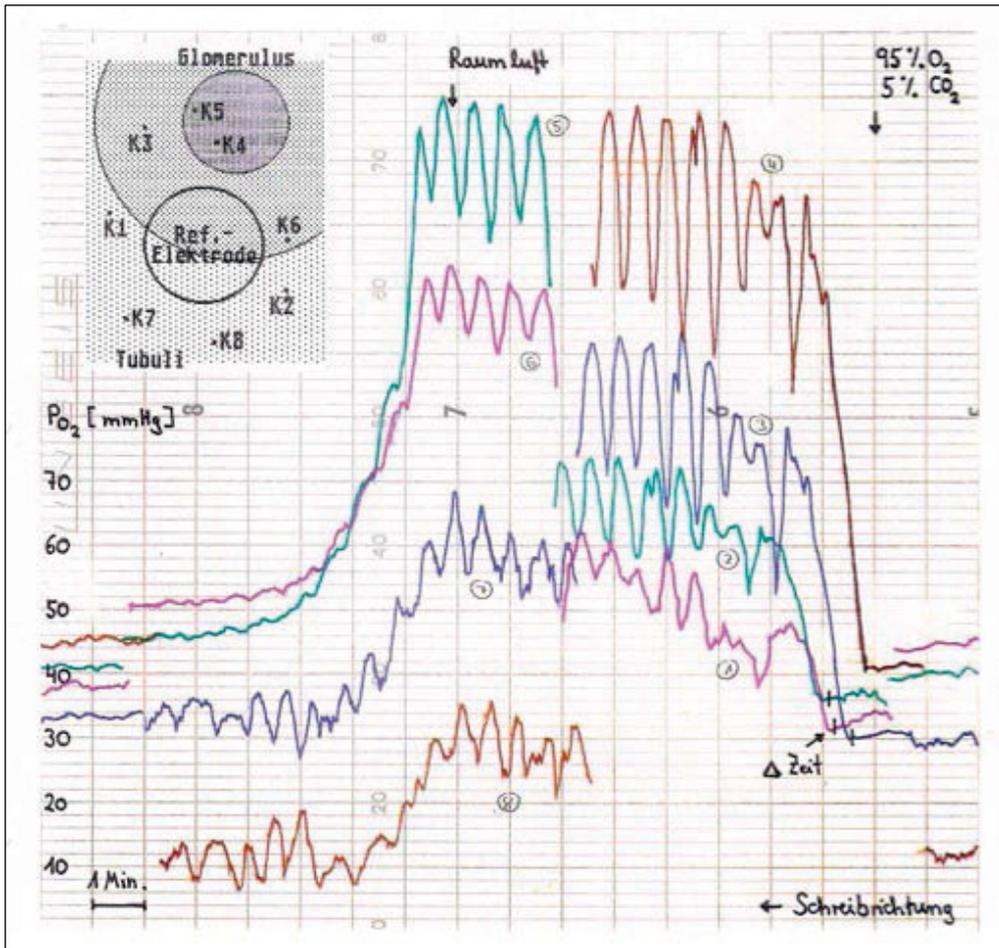


Abb.12.3.5.: Original-Registrierung von allen 8 Drähten der Goldelektrode beim Übergang von Raumluft zu 95% O₂ und zurück. Links oben die geometrische Position der Ableitungsdrähte der Elektrode in Beziehung zum Glomerulus. K4 und K5 liegen direkt über dem Glomerulus. Ausgangspunkt ist auf der rechten Bildseite. Man sieht nur geringe Oszillationsamplituden, die jedoch gleich nach Umschaltung der Beatmung auf 95% O₂ stark oszillieren bis auf den Höchstwert von 130mmHg. Der entsprechende systemarterielle pO₂ erreicht dabei 600mmHg unter Beatmung (251). K3 und K6 liegen im tubuloglomerulären Zwischenbereich, K1, K2 und K7, K8 sind supratubuläre Ableitungen. Da der Kompensationsschreiber nur 4 Kanäle hatte, wurde in der Mitte dieser Registrierung von den ersten 4 auf die nächsten 4 Drähte umgeschaltet. Weitere Details finden sich in den Originalpublikationen (111, 249).

Die Oszillationen betreffen nur einen kleinen Teil der Nephrene unter „Normalbedingungen“. Die meisten Nephrene arbeiten auf konstantem Niveau. Eine Störung wie z.B. in Abb. 12.3.5. oder auch in die Gegenrichtung einer Hypoxie ist in der Lage, mehr Nephrene ins Schwingen zu bringen. Bevorzugt für die Oszillation sind kortikale, subkortikale und midkortikale Nephrene, deren TAL-Segmente einen grösseren Abstand von den Gefäßbündeln des Nierenmarks haben als juxtamedulläre Nephrene. Die TAL-Segmente letzterer profitieren von der Radialdiffusion von Sauerstoff, weil Ihre TAL-Segmente die Gefäßbündel unmittelbar umgeben. Das ermöglicht dieser Nephrogruppe auch ihre SNGFR am stärksten zu ändern. Holstein-Rathlou hat Hinweise dafür gefunden, dass Nephrene die zur einer Interlobararterie gehören als ganze Gruppe synchron oszillieren können (107).

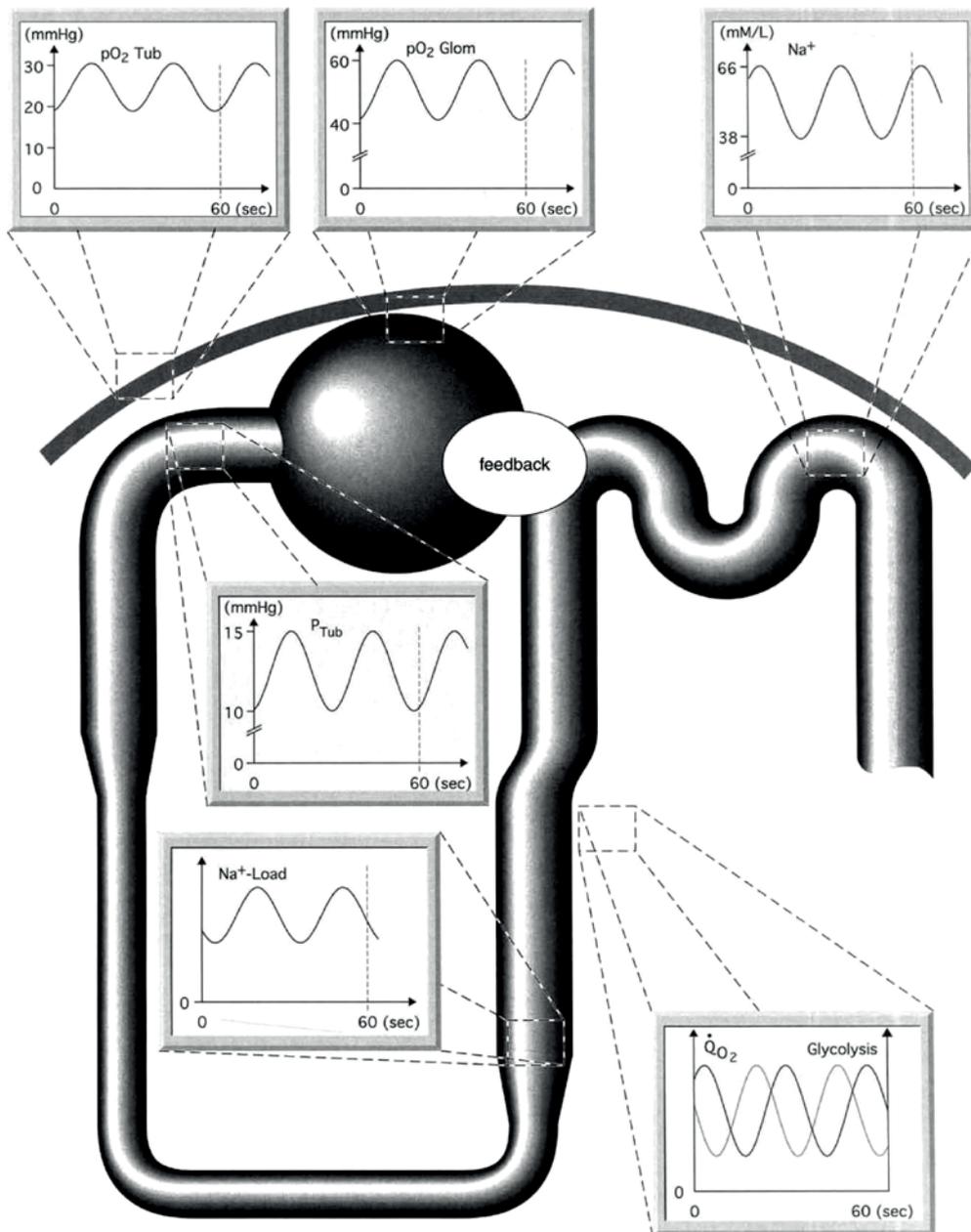


Abb.12.3.6.: Synopsis eines oszillierenden Nephrons. Frequenzgleiche Oszillationen finden sich beim Tubulusdruck (proximal), phasenverschoben bei der fröhdistalen Natriumkonzentration (Leitfähigkeit) und dem Sauerstoffdruck an der Nierenoberfläche sowohl supraglomerulär als auch supratubulär. Folglich wird die Natriummenge am Eingang zum TAL-Segment in der gleichen Frequenz oszillieren wie der tubuläre Fluss, und das TAL-Segment wandelt das Flusssignal in eine Änderung der Konzentration von Natrium um, wenn der Stoffwechsel des TAL-Segments von der aeroben zur anaeroben ATP-Gewinnung umschaltet. Die oszillierende Natriumkonzentration an der Macula densa kann den TGF dazu benutzen, den tubulären Transport an die Sauerstoffversorgung anzupassen und ist damit der Motor und die Quelle dieses regulatorischen Oszillationsphänomens (249). Das Schrittmachernephron übernimmt dann die Synchronisation der ganzen Gruppe Nephrone um ein Interlobulärgefäßpaar herum (107).

Zusammenfassung der Komponenten zur Hypothese

In vivo werden in der Warmblüterniere nur 8% des angebotenen Sauerstoffs genutzt und verbraucht, dennoch gibt es Areale in der Niere, die am Rande des Sauerstoffmangels existieren und das ist der Grund, warum die Erythropoetinproduktion beim erwachsenen Organismus in die Niere verlegt wurde. Hier kann sowohl eine Reduktion der Sauerstofftransportkapazität des Blutes (z.B. durch Blutverlust) registriert werden als auch eine Reduktion des Sauerstoffdrucks wie z.B. in großer Höhe (über dem Meer). Ein weiterer Grund mag sein, dass sich die Nierenfunktion in etwa proportional zum Gesamtstoffwechsel verhält und somit den Gesamtstoffwechsel repräsentiert (s. z.B. Leistungs-Adaptation der Nieren bei Schwangerschaft).

1. Untersuchungen in vitro an der normotherm perfundierten Rattenniere zeigen eine Aufnahme von 40-50% des angebotenen Sauerstoffs, wenn ein zellfreies Perfusat verwendet wird bei Äquilibration mit 95% Sauerstoff. Unter diesen Bedingungen finden sich physiologische Zeichen der Minderfunktion von S3-Segmenten des proximalen Tubulus und von TAL-Segmenten, die ein morphologisches Korrelat haben in Form von Nekrosen, bedingt durch Sauerstoffmangel. Betroffen sind Strukturen, die von der Radiärdiffusion aus den Gefäßbündeln des Nierenmarks nicht erreicht werden unter zellfreiem Perfusat. Diese spezielle Architektur der Gefäße des Nierenmarks ermöglicht der Niere in vivo zwar den Aufbau von Konzentrationsgradienten bis zur Papille hin und damit ihre Konzentrierfähigkeit durch die Shunt diffusion in den Gefäßbündeln von Soluten; in Kauf genommen wird damit aber die Shunt diffusion von Blutgasen. Dies führt zu einem stark reduzierten pO_2 und erhöhtem CO_2 („trapping“) im Nierenmark. In vivo kann die Niere das handhaben, bei zellfreier Perfusion nicht.

2. In vivo Untersuchungen an MWF-Ratten, die eine große Zahl an oberflächlich liegenden Glomeruli aufweisen zeigen, dass die Hälfte des Sauerstoffs auf dem Weg von der Nierenarterie zum oberflächlich liegenden Glomerulus verschwindet über eine hocheffiziente Shunt diffusion innerhalb der Nierenrinde, speziell der Vasa interlobularia. Dies hat zur Folge, dass es auch in der Nierenrinde Mangelareale für Sauerstoff gibt trotz hoher Durchblutungsraten.

3. In vivo Untersuchungen in leichter Halothannarkose haben Oszillationsphänomene gezeigt im hydrostatischen Druck des proximalen Tubulus, phasenverschoben der Natriumkonzentration frühdistal und ergänzend war ein oszillierender Sauerstoffdruck an oberflächlich liegenden Glomeruli und Tubuli nachweisbar, der zeigt, daß die Nephronfunktion oszilliert in Abhängigkeit von seiner Transportkapazität und das kritische Areal ist dabei v.a. die Transportkapazität der TAL-Segmente je nach Sauerstoffverfügbarkeit. Das TAL-Segment schaltet bei Sauerstoffmangel seine Energiegewinnung von aerob auf anaerob um. Das dient aber nicht als Notreserve sondern als metabolischer Schalter und triggert damit eine oszillierende Anpassung an die funktionelle Transportkapazität des Nephron. Dem tubuloglomerulärem Feedback kommt damit eine entscheidende Funktion zu, die Nekrosen vermeiden hilft nicht nur für die TAL-Segmente. Auch der proximale Tubulus mit seiner geringen Kapazität an Glykolyse kann so bei Sauerstoffmangel geschützt werden, indem das Einzelnephronfiltrat reduziert und angepaßt wird. Persson und Mitarbeiter haben gezeigt,

daß der onkotische Druck die Feedbackantwort wesentlich beeinflusst, d.h. dass ein hoher kolloid-osmotischer Druck (COP) im Vas efferens, wie er bei einer hohen Filtrationsfraktion entsteht eine hohe Feedbackantwortrate garantiert und ein niedriger COP eine deutliche Abschwächung zur Folge hat (192, 193). An der zellfrei perfundierten Niere liegt die Filtrationsfraktion immer unter 10%, das könnte die Erklärung sein, dass der fehlende Feedback das Filtrat nicht – angepasst an die O₂-Versorgung – drosselt und damit O₂-Mangelschäden entstehen. In diesem Zusammenhang ist die Beobachtung von **Zoltan Endre (66)** und Mitarbeitern interessant, dass eine isoliert perfundierte Niere mit 2% Erythrozytenzusatz und leichter Hypoxie nur Schäden an proximalen Tubuli zeigt, nicht aber an TAL-Segmenten. Das kann bedeuten, dass der Erythrozytenzusatz die TAL-Segmente zwar schützt aber gleichzeitig bei defektem tubuloglomerulärem Feedback das Problem an die überforderten proximalen Tubuli verschiebt mit dem zu hohen Natriumload bei ungenügend verfügbarem Sauerstoff und ihrer zudem ungenügenden Glykolysekapazität.

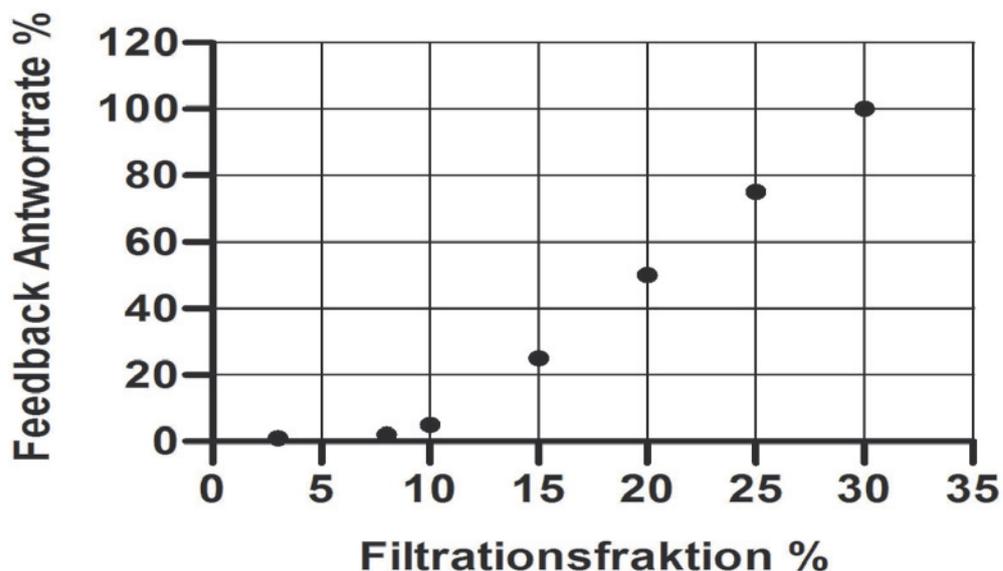


Abb. 12.3.7.: Hypothetische Beziehung an der IPRK zwischen Filtrationsfraktion und Feedback-Antwort. Die Filtrationsfraktion an der IPRK liegt im Bereich zwischen 1,5 und 8% gegenüber der in vivo Situation der Ratten-Niere von im Mittel 30%.

Kurzum:

Was in vivo so gut funktioniert, daß die Niere den Spagat zwischen Konzentrierfähigkeit, Sauerstoffversorgung und Erythropoietinproduktion schafft, ist am isolierten, zellfrei perfundierten Organ nicht zu schaffen. Die Konzentrierfähigkeit ist durch die hohe Mark-perfusion stark eingeschränkt, es kann sich dadurch kein ausreichender kortikomedullärer Konzentrationsgradient aufbauen bzw. erhalten.

Der in vivo nachweisbare oszillierende Sauerstoffdruck an Glomeruli und Tubuli der Oberfläche der Niere verbunden mit Druckschwankungen proximal und distalen Leitfähigkeitsschwankungen zeigt eine oszillierende Funktion des Nephrons in Relation zu seiner Transportkapazität. Kritischer Punkt ist die Transportkapazität der dicken aufsteigenden Henleschen Schleife (TAL-Segment) bei Sauerstoffmangel: Es verwundert nicht, dass dieses

TAL-Segment sowohl eine hohe Zahl an Mitochondrien aufweist und parallel dazu eine hohe Glykolyseaktivität besitzt. Dadurch kann dieses Segment als Stoffwechselschalter fungieren und mit seiner Umschaltkinetik die oszillierende Anpassung eines betroffenen Nephrons an sein Sauerstoffangebot triggern.

An der isolierten, zellfrei perfundierten Niere (IPRK) ist die Sauerstoffkapazität trotz hoher Partialdrücke nicht ausreichend für das Interbündelareal des äußeren Nierenmarks, das in vivo schon 80% des Angebots an Sauerstoff extrahiert. Da der TGF an der zellfrei perfundierten Niere zu unempfindlich ist und nicht funktioniert, kann die GFR nicht angepasst werden an die reduzierte Transportkapazität von TAL-Segmenten und proximalen Tubulusarealen. Das Ergebnis sind die bekannten morphologischen Schäden an den benachteiligten Strukturen des Interbündelareals wie den S₃-Segmenten des proximalen Tubulus und den TAL-Segmenten. Demgegenüber profitieren gefäßbündelnahe Strukturen aus der Radiärdiffusion von Sauerstoff und bleiben deshalb morphologisch intakt.

In vivo ist die Arbeit von Nephronen an der Grenze zum Sauerstoffmangel ein idealer Ort um die Sauerstoffkapazität und den Sauerstoffdruck zu messen und in eine Steuerung der Synthese von Erythropoietin umzusetzen. Zwar kann auch die IPRK Erythropoietin synthetisieren, was aber nicht gelingt ist der obengenannte Spagat zwischen Konzentrierfähigkeit, ausreichender Versorgung mit Sauerstoff und angepasster Erythropoietinsynthese.

Wer die Ursache des Mangels an Langzeitstabilität der isolierten Niere sucht, wird den Schlüssel für den Funktionsverlust isolierter Nieren darin finden, daß die Integrität des Endothels unter den künstlichen Perfusionsbedingungen verlorengelht, weil die Komplexität von zirkulierendem Vollblut und seine permanente Rekonditionierung eine wesentlich Voraussetzung ist für die Integrität der endothelialen Barriere. Ein weiterer Gesichtspunkt könnte sein, dass die Spanne zwischen Sauerstoffmangel und Sauerstoffintoxikation an der isolierten Niere ungünstig ist und nur dann in den optimalen Bereich zu verschieben ist, wenn Verhältnisse angestrebt werden, wie sie in vivo mit einer hohen Sauerstoffkapazität bei niedrigem, d.h. normalem Sauerstoffdruck vorherrschen. An der isolierten Leber ist dieses Prinzip vor längerer Zeit schon etabliert worden mit dem Erfolg, daß z.B. der Sauerstoffverbrauch höher lag als mit reduziertem Hb und hohen pO₂ Partialdrücken (1, 2, 161) und dass Lysosomen wesentlich länger (bis 8h) intakt geblieben sind als mit der konventionellen Perfusionstechnik (niedriges Hb, hoher O₂-Partialdruck). Ein weiterer Ansatzpunkt wäre, die Funktion von Albumin für längere Zeit stabil zu halten. In vivo hat das Molekül eine begrenzte Halbwertszeit und wird ständig nachgebildet. Eine Silikonisierung der inneren Oberflächen der Perfusionsapparatur wäre ebenso ein Ziel, wie es ein Ziel wäre, offene Grenzen Perfusat/Luft möglichst gering zu halten und Schaum möglichst zu vermeiden. Für dieses letztere Ziel hatten wir früher eine Sensorik im Ablauftrichter, die ein Schlauchventil gesteuert hat, damit Perfusat als Flüssigkeitssäule ohne Luftblasen dazwischen portionsweise zurückfließen kann. Dies kann eine unnötige zusätzliche Denaturierung verringern. Im Labor in Münster hatten wir dieses Prinzip der Vereinfachung halber aufgegeben, das war möglicherweise ein Fehler.

12.4. Übersicht über die Beiträge der Arbeitsgruppe zu den 4 verschiedenen Techniken der Nierenperfusion

- 1 **Single pass Perfusion** (mit & ohne Kolloid, z.B. Polygelatine wie Haemaccel)
 - 2 **Rezirkulation** mit bovinem Serumalbumin (BSA), mit und ohne Erys
 - 3 **Rezirkulation mit Dialyse** und BSA, mit und ohne Erys
 - 4 **Reperfusion der fixierten Niere**

1a **Single pass Perfusion mit Haemaccel als Kolloid**

Natrium-Transport und Metabolismus (FU Berlin)

- 1970 Na-Resorption an der IPRK, Abhängigkeit von Substratangebot und Na-Load (254).
- 1971 Na-Resorption und O₂-Verbrauch an der IPRK unter Ethacrynsäure (245).
- 1972 Substrate action on transport and metabolism of the IPRK (pyruvate, oxaloacetate, butyrate and succinate) (246).
- 1975 The basic requirements for the function of the isolated cell free perfused rat kidney (247).
- 1975 Influence of ouabain and ethacrynic acid on sodium transport and sodium-potassium ATPase in the IPRK (244).
- 1976 The effect of Ca-ion antagonist verapamil on ouabain inhibition of renal sodium transport (243).
- 1976 **In vivo Studie:** Acute and reversible inhibition of tubuloglomerular feedback mediated afferent vasoconstriction by the calcium-antagonist verapamil (166).
- 1984 Der Einfluss von Succinat auf die Natriumresorption und den Metabolismus der isoliert perfundierten Rattenniere (123).

1b **Single pass Perfusion ohne Kolloid** (MH Hannover)

Der Effekt von Albumin auf die Funktion der IPRK im Vergleich zu „ohne Kolloid“

- 1981 Effect of albumin on the function of perfused rat kidney (241).

Die renale Clearance von Schilddrüsenhormonen an der IPRK

- 1978/1980 The renal clearance of thyroid hormones in the IPRK (3).

Der Effekt von AVP und dDAVP auf die Freiwasser-Resorption der IPRK

- 2011 The analysis of aquaporin-2 regulation by means of the IPRK (252).
(Labor der Experimentellen Nephrologie in Münster)

2 Rezirkulation mit bovinem Serumalbumin, BSA (mit & ohne Erythrozyten)

Konversion von Thyroxin zu Trijodthyronin an der IPRK (mit gewaschenen Erys)

- 1986 Zur Konversion von Thyroxin zu Trijodthyronin an der IPRK (302).
- 1988 Die Konversion von Thyroxin zu Trijodthyronin mit Bestimmung von FT4 über ein Äquilibriumsdialyse-System (94).

Renale Behandlung von Peptidhormonen und urämischen Mittelmolekülen

- 1979/1980 Renal handling of polypeptide hormones (insulin, C-peptide, h-PTH) as studied in the IPRK (258).
- 1980/1982 Renal handling of homologous and heterologous insulin in the IPRK (225, 226).
- 1980/1982 Renal handling of uremic middle molecules (151, 222, 223).

Renaler Metabolismus von Leukotrienen

- 1991 Metabolism of cysteinyl leucotrienes by the IPRK (mit und ohne BSA) (69).

3 Rezirkulation mit BSA, Perfusatregeneration und Begasung durch Dialyse

Glomeruläre Permeabilität für Albumin an der IPRK, funktionelle Charakterisierung. *Mikropunktionsstudien sind kursiv und fett geschrieben*

- 1977** *Direct assessment of the glomerular sieving coefficient for albumin in the rat Kidney* (281)
- 1978** *Micropuncture experiments on albuminuria in the IPRK* (242).
- 1979** *A comparison of micropuncture studies in the IPRK with the in vivo experimental conditions* (283).
- 1980 The glomerular permeability for water and albumin in the IPRK (248).
- 1984** *Glomerular albumin leakage and morphology after neutralization of polyanions I* (11).
- 1984 Glomerular albumin leakage and morphology after neutralization of polyanions II. Discrepancy of protamin induced albuminuria and fine structure of the glomerular filtration barrier (274).
- 1986** *The „repaired defect“ hypothesis of the glomerular capillary wall. Analysis in the IPRK* (234).
- 1992** *The physiological and pathophysiological basis of glomerular permeability for plasma proteins* (256).
- 1994 Mechanisms of glomerular proteinuria and hematuria (238).

Verschiedene Aspekte der Nierenfunktion, die an der IPRK studiert werden konnten – *Mikropunktionsstudien sind kursiv und fett*

- 1981 Effect of albumin on the function of perfused rat kidney (241).
Die damals miterhobenen Mikropunktionsdaten wurden nur in der Habilitationsarbeit publiziert (240)
- 1984** *Single nephron function after unilateral nephrectomy in rats treated with Cyc A* (257).
- 1984** *Untersuchungen zur Pathophysiologie der glomerulären Wasserpermeabilität* (172).
- 1985 Morphologic and functional evidence for oxygen deficiency in the IPRK (253).
- 1986** *Effective hydraulic permeability of the glomerular capillary wall in rats after uninephrectomy* (175).
- 1986** *Influence of Cyc A on adaptive hypertrophy after unilateral nephrectomy in the rat* (110, 257).
- 1989 Renal mesangium is a target for calcitonin gene-related peptide (129).
- 1990 Role of erythropoietin in adaptation to hypoxia (230).
- 1991 Oxygen dependent erythropoietin production by the IPRK (231).
- 1991 Effect of arginine depletion on glomerular and tubular kidney function. Studies in the IPRK (197).
- 1992 Importance of NO/EDRF for glomerular and tubular function. Studies in the IPRK (198).
- 2004** *Age-dependent thickening of glomerular basement membrane has no major effect on glomerular hydraulic conductivity* (173).
- 2015 Untersuchungen zur “repaired defect” Hypothese der glomerulären Kapillarwand (207).

4 Das perfusionsfixierte Modell einer Rattenniere

Untersuchungen zur Bedeutung der elektrischen Ladungen an der glomerulären Filtrationsbarriere

- 1990 Die Bedeutung der negativen Ladungen in der glomerulären Basalmembran für die Proteinurie (74) .
- 1994 Zur glomerulären Permeabilität geladener und ungeladener Makromoleküle (305).
- 1999 Role of size, charge and conformation of dissolved molecules and of fixed charges of the filtration barrier in glomerular permselectivity (48).
- 1999 Role of albumin and glomerular capillary wall charge distribution on glomerular permselectivity. Studies on the perfused-fixed rat kidney model (51).
- 2001 The “fixed” charge of glomerular capillary wall as determinant of permselectivity (49).
- 2003 Dynamic alterations of glomerular charge density in fixed rat kidneys suggest involvement of endothelial cell coat. Studies in the IPRK (50).

Klaus Hinrich Neumann

13. Besonderheiten und Erfordernisse der Mikropunktions- technik an der IPRK

13.1. Untersuchungen an der isoliert perfundierten Rattenniere

Untersuchungen zur tubulären und glomerulären Funktion oberflächlich gelegener Nephrone mittels Mikropunktionstechniken können am Modell der isoliert perfundierten Rattenniere in ähnlicher Weise wie bei der Untersuchung kortikaler Nephrone in vivo durchgeführt werden. Bedingt durch den Versuchsaufbau ergeben sich für den Mikropunkteur einige Besonderheiten für die Durchführung der Mikropunktionsexperimente. Ein Vorteil für die Mikropunktionsstechnik ist die bewegungsfreie Nierenoberfläche durch das völlige Fehlen der atmungsbedingten Nierenbewegungen, die sich in vivo bei der in-situ-Präparation nicht immer verhindern lassen. Ein Nachteil ist das kontrastarme Bild der Nierenoberfläche, da bei zellfreier Perfusion sich die peritubulären Kapillaren und damit auch die Tubuli schlechter kontrastieren.

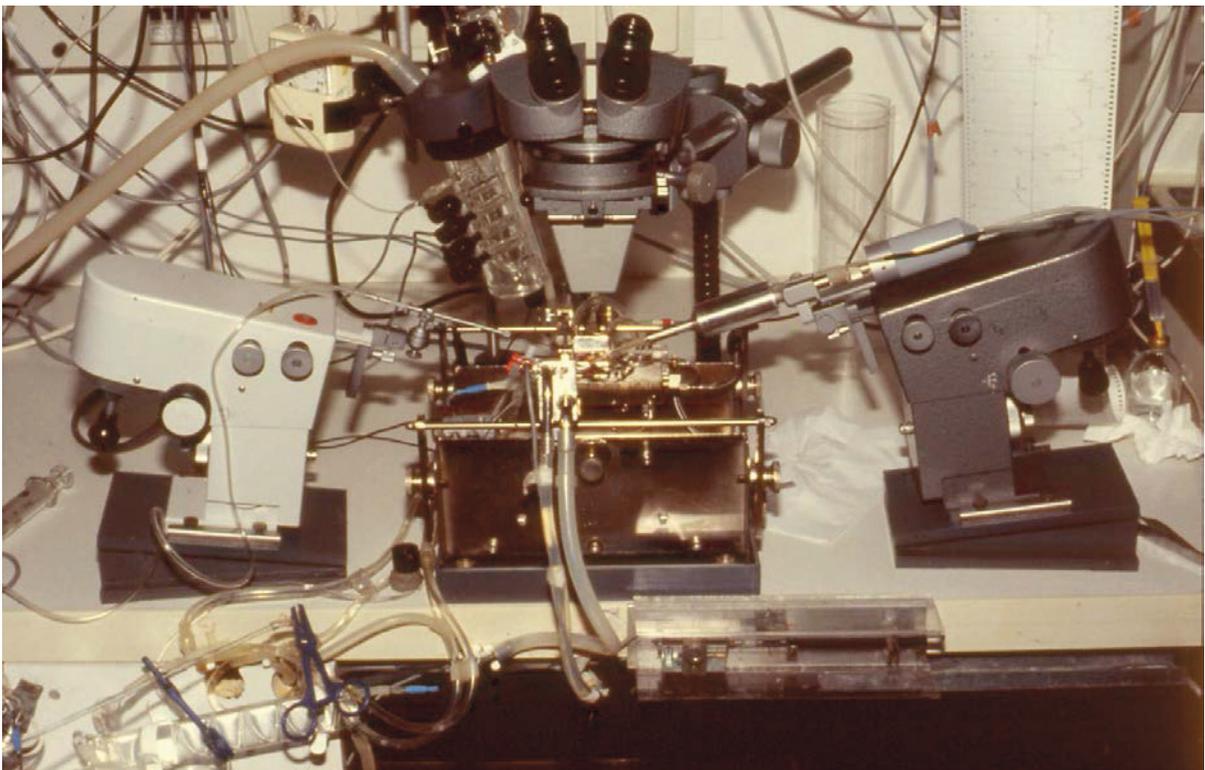
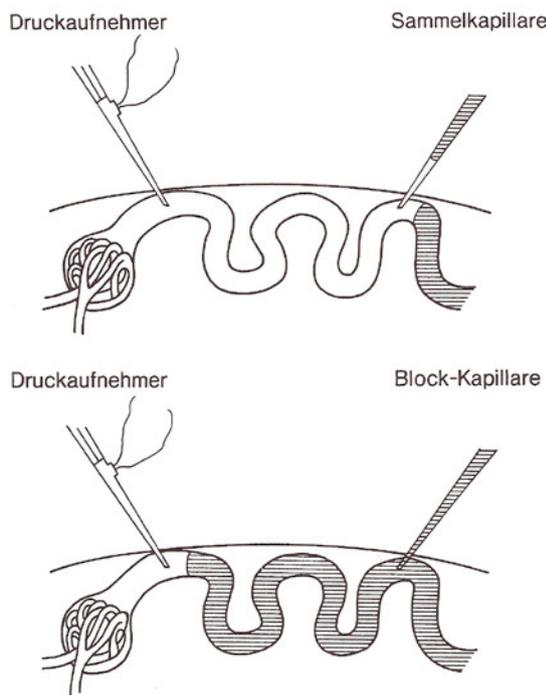


Abb. 13.1.: Ensemble IPRK mit der Versuchsanordnung für die Mikropunktion. Beidseits der Niere sind zwei Leitz Mikromanipulatoren entgegengesetzt positioniert zur Bestimmung der Einzelnephron-Filtrationsrate, der Messung der tubulären Drucke sowie der indirekten Bestimmung des glomerulären Kapillardrucks mit der Stoppflusstechnik nach Gertz (81). Rechts die Mikroperfusionspumpe mit Druckaufnehmer, links die ölgefüllte Sammelkapillare. Im Hintergrund rechts das Registrierpapier vom Kompensationschreiber zur kontinuierlichen Druckregistrierung. Leitz Auflicht-Stereomikroskop, Objektiv x 4, Okular x 10.



Um eine möglichst kontrastreiche Darstellung der kortikalen Tubuli zu erreichen, wird die Oberfläche der isolierten Niere mit Kaltlichtquellen tangential beleuchtet. Bei senkrecht auffallendem Licht ist die Oberfläche der Niere bei zellfreiem Perfusat extrem kontrastarm.

Abb. 13.2.: Position der Mikropunktions-Kapillaren zur zeitkontrollierten Sammlung von Tubulusflüssigkeit für die Bestimmung der Einzelnephron GFR (SNGFR) über die Bestimmung des TF/P_{Inulin} und zur Messung von Freiflussdruck P_{FF} und Stoppflussdruck P_{SF} . Die obere Bildhälfte zeigt links die Druckmesskapillare, rechts die Sammelkapillare zur Bestimmung der SNGFR. Die untere Bildhälfte stellt schematisch die anschließende Messung des Stoppflussdrucks dar (172).

Proximale Konvolute oberflächlich gelegener Nephrene werden mit Glaskapillaren mit ausgezogenen, angeschliffenen Spitzen (Spitzendurchmesser 8-10 μm) punktiert. Die Kapillaren werden mit isotoner Kochsalzlösung gefüllt, die zur besseren Sichtbarkeit mit 0,1% Lissamingrün (Serva, Heidelberg) angefärbt wird. Für die tubuläre Druckmessung wird die Glaskapillare im silikonölgefüllten (AK 35 Wacker Chemie, München) Dom einer Mikroperfusionspumpe (Wolfgang Hampel Apparatebau, Frankfurt/Main) montiert. Der Dom ist über eine hydraulische Seitenarmverbindung mit einem Mikrodruckaufnehmer bestückt (Typ EPI-080-25, Entran Devices, Little Falls, N.J., USA), dessen Signal mit einem Kompensationschreiber (Linseis Messgeräte GmbH, Selb, Deutschland) registriert wird. Die Mikroperfusionspumpe einschließlich Druckaufnehmer wird auf einem Mikromanipulator (Leitz, Wetzlar, Deutschland) fixiert und für die Punktation in Position gebracht (in Berlin an der FU im Institut für klinische Physiologie am Klinikum Steglitz entwickeltes System nach Lohfert et al. (147)). Nach Punktation einer oberflächlichen proximalen Tubulusschlinge unter stereomikroskopischer Sicht wird mit der Mikroperfusionspumpe kurzfristig die gefärbte isotonische Kochsalzlösung injiziert. Falls nach der Zahl der sich nach distal anfärbenden Tubulusschlingen eine frühproximale Punktionsstelle anzunehmen ist, wird die Druckmesskapillare in situ belassen und nach Abstellen der Mikroperfusionspumpe der proximale tubuläre Freiflussdruck (P_{TF}) registriert s. Abb. 13.3. Anschließend wird die letzte zugängliche proximale Tubulusschlinge mit einer angeschliffenen 2. Glaskapillare (gefüllt mit Sudanschwarz gefärbtem Paraffinöl, Spitzendurchmesser 10 μm), die auf einem zweiten Mikromanipulator montiert ist, punktiert. Es wird eine kurze Ölsäule (2-3 Tubulusdurchmesser) injiziert. Durch die Tubulusblockade kommt es zu einem kurzen Anstieg des intratubulären Drucks. Anschließend wird mit der 2. Glaskapillare Tubulusflüssigkeit zeitkontrolliert gesammelt (5-6 min). Die Sammelrate wird so eingestellt, dass sowohl der fortlaufend registrierte

Tubulusdruck dem zuvor gemessenen Freiflussdruck entspricht, als auch die Ölsäule im Tubulus in der ursprünglichen Position gehalten wird. Nach Beendigung der Sammlung wird die Sammelkapillare zurückgezogen und die Probe durch Nachziehen einer kleinen Paraffinölmenge verschlossen. Das Sammelvolumen wird ausgemessen und die Inulinkonzentration wird mikroanalytisch bestimmt um die Einzelnephronfiltrationsrate zu ermitteln (172). Mit einer weiteren Glaskapillare wird durch Injektion von Paraffinöl der Tubulus distal der Druckmesskapillare blockiert und nach Ausbildung eines Druckplateaus der sogenannte Stoppflussdruck (P_{SF}) registriert, s. Abb.13.3.

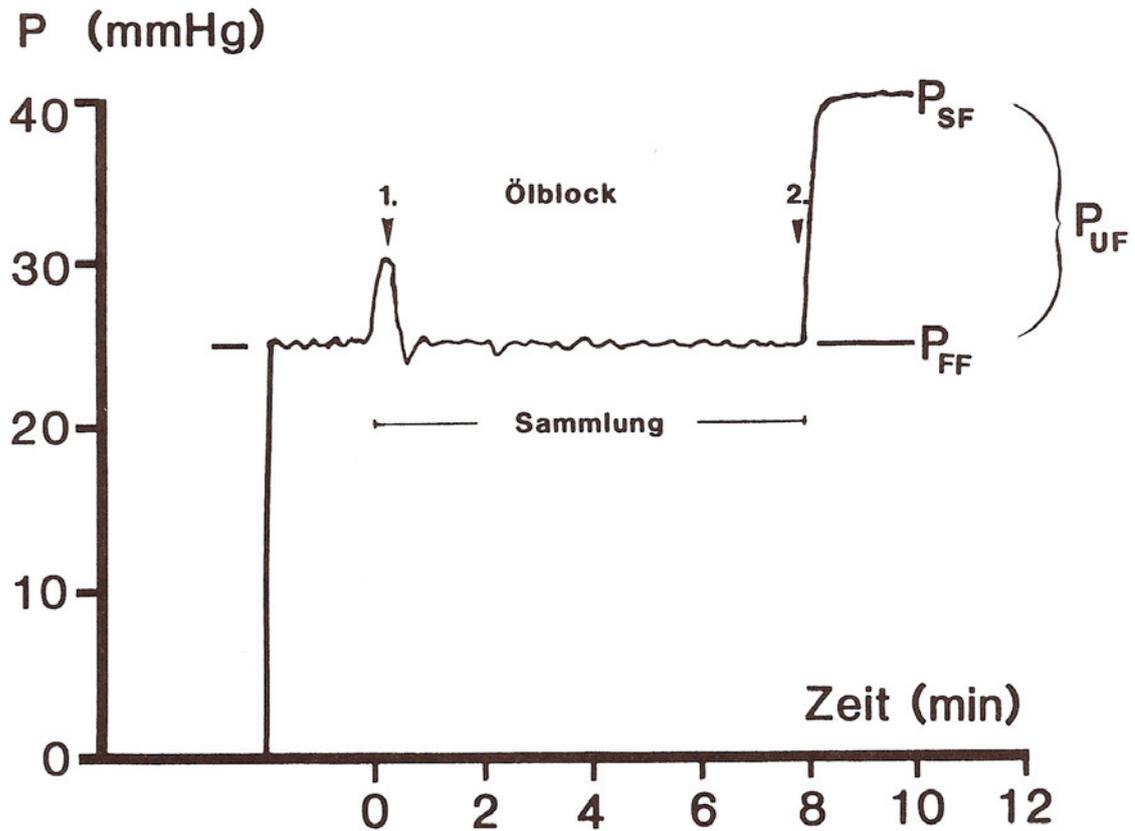


Abb. 13.3.: Schematische Darstellung der kontinuierlichen Druckregistrierung zur Messung der SNGFR. Zunächst wird der Freiflussdruck registriert, in Position 1. wird mit der ölgefüllten Sammelkapillare endproximal punktiert und der Tubulus nach distal blockiert. Durch Ansaugen von Tubulusflüssigkeit kann dann auf dem Niveau des Freiflussdrucks gesammelt werden. In Position 2. beginnt die Stoppflussdruckmessung durch frühproximale Ölblockade (172).

Der glomeruläre Ultrafiltrationsdruck (P_{UF}) ergibt sich aus der Differenz aus tubulärem Stoppflussdruck und tubulärem Freiflussdruck (P_{FF}).

Herleitung:

$$\begin{aligned} (1) \quad & P_{UF} = (P_{GC} - P_{FF}) - (\pi_{GC} - \pi_{TF}), \quad \pi_{TF} = 0 \\ (2) \quad & P_{SF} = P_{GC} - \pi_{GC} \quad \quad \quad P_{GC} = P_{SF} + \pi_{GC} \\ (2) \text{ in } (1) \quad & P_{UF} = P_{SF} + \pi_{GC} - P_{FF} - \pi_{GC} \\ & P_{UF} = P_{SF} - P_{FF} \end{aligned}$$

P_{UF} : effektiver Filtrationsdruck,
 P_{GC} : hydrostatischer glomerulärer Kapillardruck,
 P_{FF} : tubulärer Freiflussdruck,
 P_{SF} : tubulärer Stoppflussdruck,
 π_{GC} : kolloidosmotischer Kapillardruck,
 π_{TF} : kolloidosmotischer Tubulusdruck

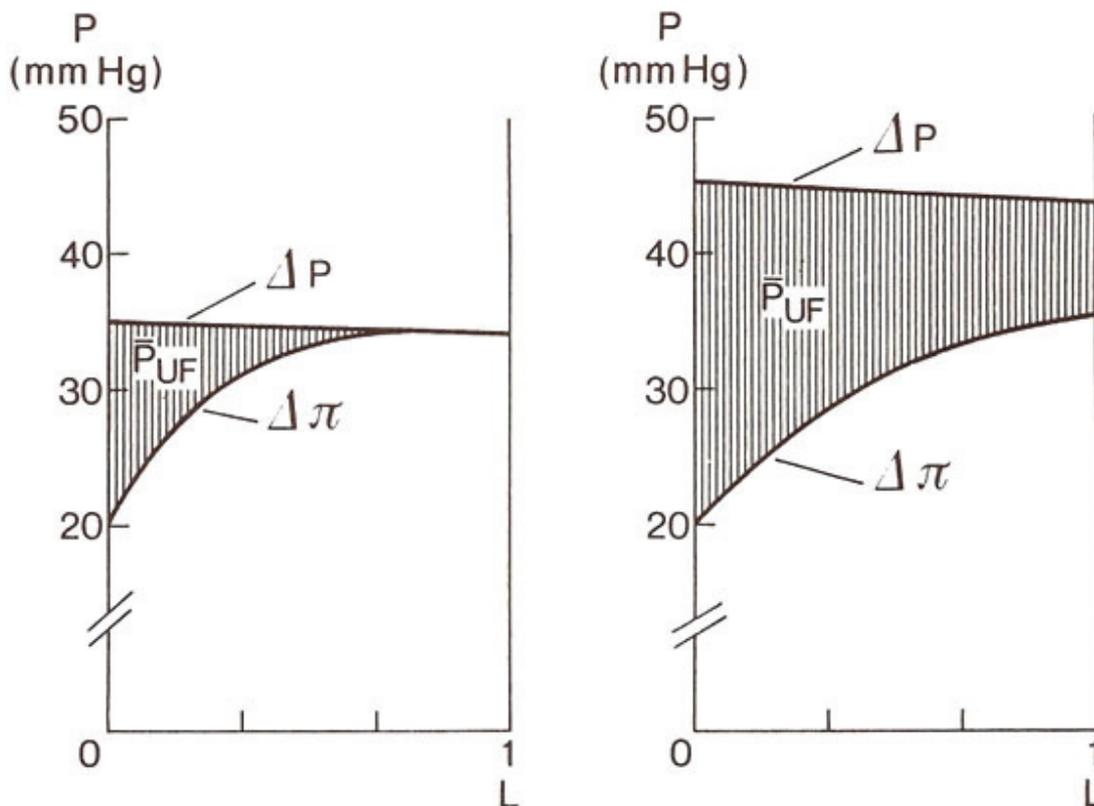


Abb.13.4.: Glomeruläre Drücke in vivo, schematisch: Einstellung eines Filtrationsdruck-äquilibrium ($P_{UF} = 0$) entlang der Kapillarstrecke unter hydropenischen Versuchsbedingungen, linke Bildseite; rechts Dysäquilibrium unter euvolämischen Versuchsbedingungen mit positivem Filtrationsdruck auch noch am Ende der Kapillarstrecke. Die Fläche von P_{UF} entspricht dem effektiven Filtrationsdruck. ΔP entspricht dem gering abfallenden hydrostatischen Druck, $\Delta \pi$ dem kolloid-osmotischen Druck (172).

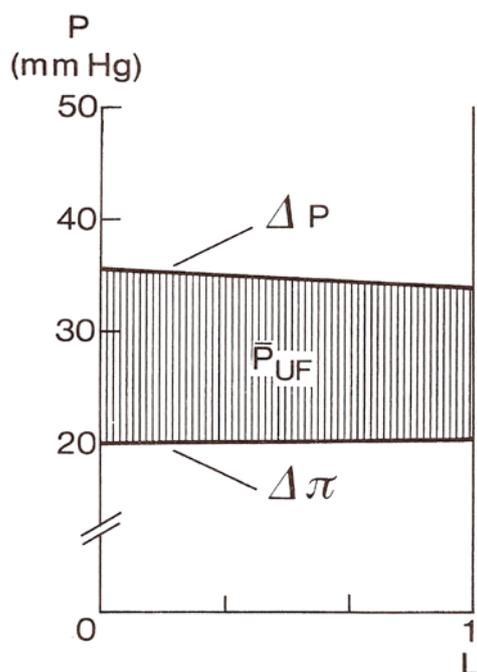


Abb. 13.5.: In vitro Verhältnisse schematisch. Durch die hohen Perfusionsraten bei normaler GFR ist die Filtrationsfraktion sehr niedrig mit 2 bis maximal 8% und dadurch steigt der kolloidosmotische Druck ebenso gering wie der hydrostatische Druck in den Glomeruluskapillaren abfällt. Das sind mathematisch sehr einfach zu erfassende Filtrationsbedingungen, wenn man den Freiflußdruck, den Stoppflußdruck und den kolloidosmotischen Druck kennt (172).

Bei hohem kolloidosmotischen Druck (z.B. Albumin 7g%) ist die Filtrationsfraktion klein um 2%, bei kolloidfreiem Perfusat steigt sie bis auf ca. 8% v.a. wegen der sehr hohen Filtrationsraten (bis 1,6ml/g·min).

Mit den Möglichkeiten der einfach zu erfassenden Filtrationsbedingungen an der IPRK bot es sich an, die hydraulische Leitfähigkeit der glomerulären Kapillaren quantitativ zu erfassen. Ohne die quantitative Erfassung der filtrierenden Fläche konnte man damit zwar den glomerulären Ultrafiltrationskoeffizienten K_f errechnen ($K_f = \text{nl/s} \cdot \text{mmHg}$), nicht aber die effektive hydraulische Permeabilität k . Um diese zu erfassen ist es erforderlich die zu Verfügung stehende filtrierende Oberfläche zu messen ($k = \text{nl/s} \cdot \text{mmHg} \cdot \text{cm}^2$). Aeikens hatte sich 1982 in Hannover in der Medizinischen Hochschule mit dem Thema der Morphometrie des Glomerulus habilitiert (4) und die in seinem Labor vorhandene morphometrische Meßanlage konnte von unserer Arbeitsgruppe mitgenutzt werden. Durch Anwendung beider Verfahren am selbem Glomerulus konnten wir erstmals die hydraulische Leitfähigkeit der glomerulären Kapillaren bestimmen.

Angewandt wurde das Verfahren für folgende Fragestellungen:

- effektive hydraulische Permeabilität in Abhängigkeit vom Alter (115, 172),
- bei der Anpassungshypertrophie nach unilateraler Nephrektomie (115, 175) und
- der Unterdrückung der Anpassungshypertrophie unter dem Einfluß von Cyclosporin A (110, 257).

13.2. Morphometrische Untersuchungen

Im Anschluss an die Mikropunktion wurde eine Skizze des untersuchten Tubulus angefertigt und eine kleine subkapsuläre Tuschemarke gesetzt, um die Punktionsstelle nach der Perfusionfixierung der Niere wieder auffinden zu können. Die zuvor untersuchten Tubuli wurden dann vorsichtig mit synthetischem, gefärbtem Silikonkautschuk retrograd gefüllt, sodass die untersuchten Glomeruli anhand von Mikrofil-Partikeln in den frühproximalen Tubulusschlingen und teilweise in den Bowmanschen Kapselräumen auf den histologischen Schnitten identifiziert werden konnten (Abb. 13.6.) Nach der Fixierung

und Aushärtung (24 h) wurden jeweils Blöcke mit einem markierten Glomerulus abgeteilt und in Araldit (Serva, Heidelberg) eingebettet. Pro Block wurden bis zu 600 0,9µm dicke Serienschritte angefertigt (Ultramikrotom MT-2-B, Sorvall Dupont Instruments, Miami, FL, USA), gefärbt (Methylenblau) und eingedeckt. Ein Pol der Niere wurde für die Elektronenmikroskopie vorbereitet.

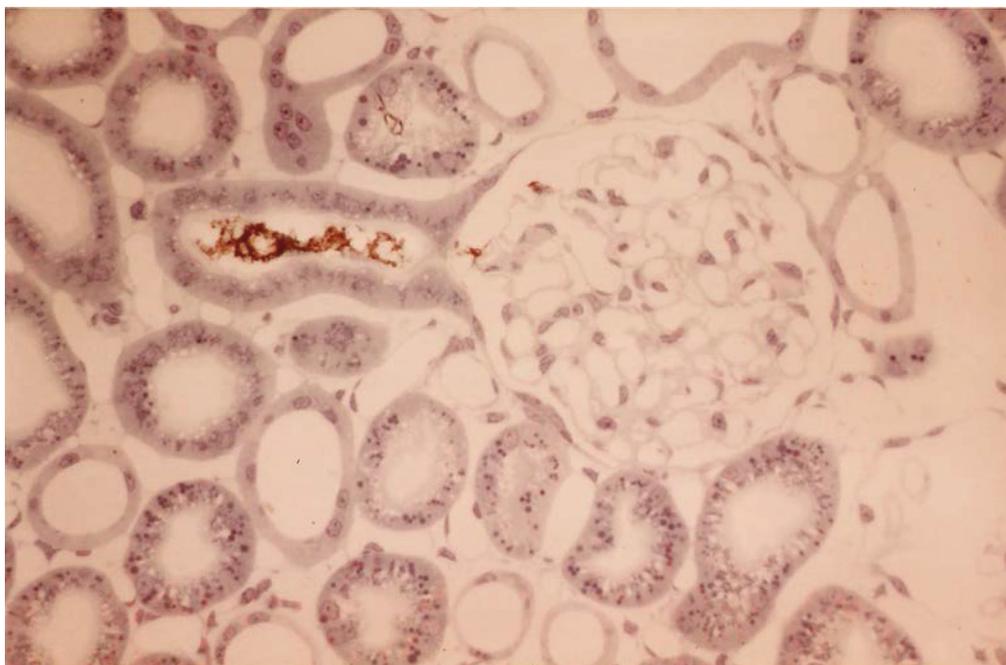


Abb.: 13.6.: Lichtmikroskopische Darstellung eines Glomerulus einer isoliert perfundierten Niere einer 2 Monate alten Ratte. Microfilpartikel in der Bowmanschen Kapsel und im proximalen Tubulus (Methylenblaufärbung), aus (172). Mehr Details finden sich in der Arbeit von Kellner (115).

Die Bestimmung der glomerulären Kapillaroberfläche (nach Aeikens, (5)) erfolgte an den lichtmikroskopischen Serienschritten, von denen zur vollständigen Erfassung eines Glomerulus etwa 120-150 nötig waren. Die Ausmessung der glomerulären Strukturen erfolgte mit einem ASM-Bildanalysesystem (Leitz, Wetzlar). Dieses System besteht aus einem Digitalisierer und einer elektronischen Datenverarbeitungsanlage. Die schematische Darstellung eines Messplatzes zeigt die Abb. 13.7. Die zu vermessende Struktur wird auf einem Induktionstisch mit einem elektronischen Griffel, der an der Spitze mit einer Leuchtdiode versehen ist, umfahren. Bei Berührung des Tisches mit dem elektronischen Griffel werden die Koordinaten des Kontaktpunktes durch Induktion dem Rechner übertragen, welcher nach entsprechender Programmierung Strecken und Flächen der umfahrenen Strukturen berechnet. Die Messwerte werden mit Hilfe eines Mikroprozessors (LSI11, Digital Equipment Corporation) gebildet und durch den angekoppelten Rechner (PDP/8, Digital Equipment Corp., Maynard, Ma, USA) verarbeitet. Die morphometrische Erfassung von mikroskopischen Objekten mit Hilfe des Bildanalysators wird dadurch möglich, dass die Bewegungen der Leuchtdiode an der Spitze des elektronischen Griffels auf dem Induktionstisch über ein Prismensystem in den Lichtgang des Mikroskops projiziert werden, mit dem die histologischen Schnitte betrachtet werden. Aus den auf dem Induktionstisch bei der

Umfahrung der Kapillaranschnitte zurückgelegten Strecken wird dann durch den Rechner der Kapillarumfang berechnet. Um den bei der Umfahrung des mikroskopischen Objektes mit dem elektronischen Griffel entstehenden Fehler möglichst gering zu halten, musste eine optimale mikroskopische Vergrößerung gewählt werden. Aeikens (5) konnte zeigen, dass bei der Vermessung eines Objektes von der Größe eines Glomerulus bei einem Vergrößerungsfaktor von 1:680 der Fehler unter 1% (S.D.) liegt. Bei einer stärkeren Vergrößerung konnte der Messfehler nur unwesentlich verringert werden. Das bei histomorphometrischen Untersuchungen entscheidende Problem, inwieweit durch die Fixierung und Einbettung des Untersuchungsmaterials Größenveränderungen auftreten, wurde von Aeikens ebenfalls untersucht (4, 5). Bezogen auf Gefrierschnitte von Nierengewebe ergab sich eine Flächenzunahme nach Perfusionsfixierung von 6% und nach Einbettung eine Flächenabnahme um 9%. Diese Größenveränderungen wurden bei unseren Untersuchungen, die mit den gleichen Verfahren durchgeführt wurden, berücksichtigt.

Im Einzelnen erfolgte die Bestimmung der Kapillaroberfläche folgendermaßen: Von jedem 2. histologischen Schnitt wurde mit dem ASM-Bildanalysator der Umfang des Kapillarkonvolutes gemessen. Die pro Glomerulus gemessenen Konvolutumfänge wurden addiert und mit der doppelten Schnittdicke multipliziert. Bei 5 kortikalen Glomeruli jeder Versuchsgruppe wurde an jeweils 10 Schnitten der Gesamtumfang aller Kapillaren gemessen und durch den Umfang der Konvolute geteilt. Dieser Quotient aus Kapillarumfang und Konvolutumfang ist für jede Altersstufe konstant. Durch Multiplikation des für jedes untersuchte Glomerulus bestimmten Gesamtumfangs mit dem Quotienten wurde dann die Kapillaroberfläche ermittelt.

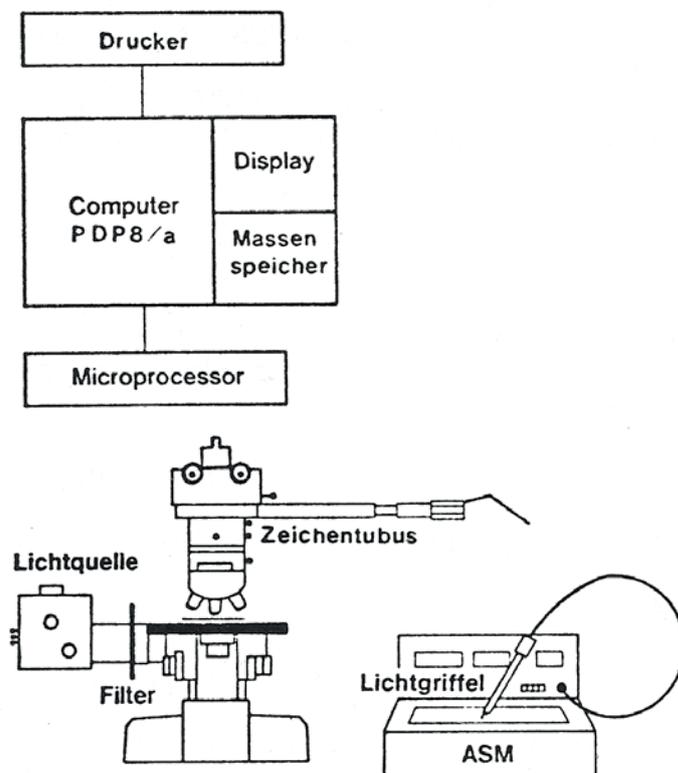


Abb. 13.7.: Schematischer Aufbau der Meßanlage zur Bestimmung der Kapillaroberfläche durch Morphometrie an Serienschnitten.

Der Lichtgriffel am Induktionstisch wurde in das Mikroskopbild übertragen und die Bewegung des Lichtgriffels wurde über einen Microprocessor aufbereitet für das Programm des damals genutzten großen PDP8 Computers. Der Microprocessor war mit ASM-Bildanalysator und dem Zeichentubus des Mikropes verbunden (172).

Frank Schweda

14. Die isoliert perfundierte Mäuseniere

Nachdem das Modell der isoliert perfundierten Niere schon lange in der medizinischen Forschung, vor allem mit Rattennieren, angewendet wurde, ergab sich Anfang der 2000er Jahre der Wunsch, dieses Verfahren auch mit Mäusenieren anzuwenden. Hintergrund war die zunehmende Etablierung und Verbreitung der Transgen- und Knockout-Technologie bei Mäusen, die es ermöglichte, gezielt die Funktion einzelner Genprodukte zu untersuchen. Hieraus ergaben sich ganz neue experimentelle Möglichkeiten auch für die Nierenforschung, da beispielsweise nun auch solche Signalwege untersucht werden konnten, für die keine spezifischen pharmakologischen Inhibitoren oder Aktivatoren verfügbar waren. Neben vielen anderen Problemen der Untersuchung gentechnisch veränderter Mäuse, war die Aussagekraft dieser Experimente bezüglich des Effektes auf die Nierenfunktion häufig durch den begleitenden systemischen Phänotyp stark eingeschränkt. Als Beispiele seien hier nur Mäuse mit genetischer Deletion der endothelialen NO-Synthase (eNOS) oder des Rezeptors der kardialen natriuretischen Peptide (Guanylatzyklase-A, GC-A) genannt, die beide aufgrund der kardiovaskulären Effekte der eNOS, bzw. der GC-A eine ausgeprägte arterielle Hypertonie haben (46, 62, 82, 148). Da dieser systemische Phänotyp die Nierenfunktion beeinflusst, ist eine gezielte Untersuchung der direkten renalen Effekte der eNOS, bzw. der GC-A in diesen Knockoutmäusen in vivo nicht möglich. Hier ergibt sich eine ideale Einsatzmöglichkeit der isoliert perfundierten Niere, da dieses Modell, wie schon in den vorhergehenden Kapiteln ausführlich dargestellt, die Untersuchung der Nierenfunktion ex situ (ex vivo), d.h. ohne störende Einflüsse des systemischen Phänotyps der Mäuse ermöglicht. Dabei sollte bei solchen Untersuchungen immer in Betracht gezogen werden, dass systemische Effekte einer genetischen Manipulation indirekt zu funktionellen (z.B. Veränderungen von Rezeptorexpression, Gefäßreagibilität, etc.) und strukturellen (z.B. Fibrose) renalen Veränderungen führen können, die dann auch Konsequenzen am isolierten Organ mit sich bringen, die nicht auf eine direkte Nierenwirkung des untersuchten Genprodukts zurückzuführen sind.

14.1. Perfusionstechniken

Die bisher verwendeten Perfusionstechniken, die bei publizierten Experimenten an isoliert perfundierten Mäusenieren zur Anwendung kamen, entsprechen prinzipiell den oben beschriebenen Techniken bei anderen Mammalia-Nieren. So kommt als Perfusionsmedium ein modifizierter Krebs-Henseleit-Puffer zur Anwendung welcher mit 95% O₂ und 5% CO₂ begast wird (199, 260, 279). Während in einigen Studien auf den Zusatz von Albumin und Erythrozyten zum Perfusionsmedium verzichtet wurde (278, 279, 291), setzen andere Arbeitsgruppen bovines Serumalbumin (BSA) und Erythrozyten ein (46, 105, 260). Bisher wurde lediglich in einer publizierten Arbeit der Effekt von BSA und Erythrozyten auf die Nierenfunktion und -integrität isoliert perfundierter Mäusenieren systematisch untersucht (199). Es zeigte sich hier, dass es mit abnehmender BSA Konzentration im Perfusat zu einer starken Zunahme der Urinausscheidung (bei 4% BSA ca. 40 µl / min pro g Nierengewicht, d.h. mehr als das 10-fache der in vivo Diurese) und der fraktionellen Natriumausscheidung (FE_{Na}

bei 4% BSA 11,6%) kam, wie es von der isoliert perfundierten Rattenniere (IPRK) bekannt war (241). Zudem war die glomeruläre Filtrationsrate deutlich gegenüber der in vivo Situation vermindert. Da in dieser Arbeit eine BSA Konzentration von 6,7g% die Urinausscheidung so stark verminderte (bei Übertragung der in vivo Situation auf die isoliert perfundierte Niere würde man ein Urinvolumen von weniger als 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ erwarten), dass eine ausreichende Urinsammlung in vertretbaren Versuchsintervallen nicht möglich war, legten die Autoren eine BSA Konzentration von 5,5g% als besten Kompromiss zwischen Erhalt der Nierenfunktion und ausreichender Urinausscheidung fest. Hierunter wurden deutlich physiologischere Werte für Urinvolumen (22 $\mu\text{l}/\text{min} \cdot \text{g}$ Nierengewicht), GFR (400 $\mu\text{l}/\text{min} \cdot \text{g}$ Nierengewicht) und FE_{Na} (1,5%) gemessen. Während der Zusatz von Rattenerythrozyten (Hämatokrit 1%) zur 5,5% BSA Lösung die Urinausscheidung und die GFR nicht signifikant veränderte, nahm die fraktionelle Natriumausscheidung weiter auf 0,3% und damit physiologische Werte ab. Dieser Befund unterstreicht eindrücklich den hohen Energiebedarf des tubulären Transports und die Notwendigkeit, dem Perfusat bei Untersuchungen zur Tubulusfunktion Erythrozyten als Sauerstoffträger zuzusetzen. Diese Notwendigkeit wird durch die Tatsache, dass es bei erythrozytenfreier Perfusionslösung zu einem deutlich verstärkten Zellschaden von Tubuluszellen des Innenstreifens der äußeren Medulla kommt, nochmal unterstrichen (199). Da es allerdings auch bei Perfusion mit einer erythrozytenhaltigen Perfusionslösung (5,5% BSA) bei einem Hämatokrit von 1% zu deutlich erkennbaren strukturellen Tubuluschäden kam, scheint die Verwendung einer höheren Erythrozytenkonzentration angebracht. Unter keiner der verwendeten Perfusionslösungen konnte ein halbwegs physiologischer renaler Gefäßwiderstand eingestellt werden (199), was am ehesten auf das Fehlen vasokonstriktorischer Hormone zurückzuführen ist.

Die Erythrozytendurchmesser von Menschen und Ratten sind mit je ca. 7,5 μm recht ähnlich, so dass es durch die Verwendung von menschlichen Erythrozyten zur Perfusion von Rattennieren zumindest zu keinen wesentlichen mechanischen Alterationen der renalen Strombahn kommen sollte. Da Mäuseerythrozyten allerdings erheblich kleiner sind (mittlerer Durchmesser 5,6 μm (199)), könnte die Verwendung von Erythrozyten von Ratte oder Mensch, die entsprechend relativ zu groß für die glomerulären Kapillaren der Mäuseniere sein könnten, mit Störungen der renalen Durchblutung und folglich der Nierenfunktion einhergehen. In Pilotexperimenten konnte Rahgozar (Arbeitsgruppe Z. Endre) allerdings zeigen, dass die Verwendung von Erythrozyten von Ratten, Mäusen oder Schafen (Durchmesser 4 μm) keinen erkennbaren Einfluss auf die renale Durchblutung haben (199). Diese Ergebnisse decken sich gut mit unveröffentlichten Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe, die den Einfluss der Erythrozytengröße (Maus vs. Mensch) auf den renalen Gefäßwiderstand und die Endothelfunktion untersucht haben. Abgeleitet aus den oben aufgeführten Untersuchungen, die einerseits zeigen, dass ein erythrozytenhaltiges Perfusionsmedium die Nierenfunktion deutlich verbessert, ein Hämatokrit von 1% allerdings nicht ausreichend ist, um die Integrität der Nierenhistologie über eine Stunde aufrecht zu erhalten und andererseits der möglichen Verwendung von speziesfremden, größeren Erythrozyten, führen wir die Perfusion von Mäusenieren mit menschlichen Erythrozyten (Erythrozytenkonzentrate, Verfallsdatum gerade überschritten) mit einem Hämatokrit von 7 – 10% durch. Aufgrund der relativ großen notwendigen Erythrozytenmenge ist die Verwendung von Mäuseblut weder praktikabel und ethisch vertretbar.

Wie bei der isolierten Perfusion von Nieren anderer Spezies besteht auch bei der isoliert perfundierten Mäuseniere die Möglichkeit der flusskonstanten (279) oder druckkonstanten Perfusion (199, 260), wie bereits in Kapitel 3.1. ausführlich dargelegt. Im Gegensatz zur Perfusion von Nieren größerer Tiere, bei der der hohe Perfusatfluss bei der Verwendung eines aufwendigen BSA- und erythrozytenhaltigen Perfusionsmediums die Verwendung eines Rezirkulationssystems erforderlich macht, kann die Perfusion von Mäusenieren aufgrund des geringen Perfusatflusses auch im single-pass Modus durchgeführt werden (siehe Kap. 2).

Verwendung der isoliert perfundierten Mäuseniere zur Untersuchung der Reninfreisetzung und des renalen Gefäßwiderstandes

Am Institut für Physiologie der Universität Regensburg und dem Regensburger Sonderforschungsbereich 699 beschäftigen sich mehrere Arbeitsgruppen mit der Kontrolle der Reninsekretion und der Steuerung der renalen Durchblutung. Da, wie oben angeführt, die Verwendung genetisch veränderter Mäuse oftmals neue Einblicke in diese Thematiken erlaubt, wurde die Technik der isoliert perfundierten Rattenniere, die in den vorangegangenen Kapiteln ausführlich beschrieben wurde, auf die Maus übertragen und vielfach erfolgreich zur Untersuchung der Reninfreisetzung und der renalen Durchblutung angewendet (7, 86, 96, 105, 130, 131, 159, 183, 227, 259, 260, 292). Obwohl auch die Untersuchung der glomerulären Filtrationsrate und der Tubulusfunktion mit dieser Methode erfolgreich durchführbar ist, ist das von uns angewendete Verfahren (direkte Kanülierung des Ureters mit PE Katheter oder Glaskapillare, Verwendung von FITC-markiertem Sinistrin zur Messung der GFR) noch nicht völlig ausgereift, so dass uns eine detaillierte Darstellung des Verfahrens an dieser Stelle nicht sinnvoll erscheint. Bei Interesse sei der Leser auf die Arbeit von Rahgozar verwiesen (199) oder es wird eine direkte Kontaktaufnahme mit dem Autor dieses Kapitels gerne angeboten.

14.2. Perfusionsmedium

Als Perfusionsmedium kommt ein modifizierter Krebs-Henseleit-Puffer (siehe Tab. 4.1.) zum Einsatz dem Substrate gemäß Rezeptur R2, Tabelle 4.2. zugesetzt werden. Aminosäuren werden dem Medium in Form einer Aminosäurelösung (Aminoplasmal AS10, Braun AG, Melsungen, siehe Tab. 4.3.) zugeführt. Butyrat kommt nicht zum Einsatz. Die Lösung (5Liter) wird am Versuchstag frisch angesetzt und durch einen druckluftbetriebenen Filter (2Liter, siehe Abb. 4.3.1., 4.3.2.) sterilfiltriert. Dieses Medium wird verwendet um bovines Serumalbumin aufzulösen (Magnetrührer, 6 g pro 100 ml), die Albuminlösung wird ebenfalls sterilfiltriert. Um die an das Albumin gebundenen Substanzen, wie z.B. Hormone, zu entfernen, kann eine Dialyse der Albuminlösung durchgeführt werden (siehe Kap. 4.1.4.), wir verzichten im Normalfall darauf. Um eine ausreichende Sauerstoffversorgung der Niere zu gewährleisten, fügen wir der Albuminlösung menschliche Erythrozyten zu (Hämatokrit 7 – 10%). Hierzu verwenden wir Erythrozytenkonzentrate, deren Haltbarkeitsdatum unmittelbar abgelaufen ist. Diese werden so oft mit dem Perfusionsmedium (modifizierter Krebs-Henseleit Puffer ohne Albumin) gewaschen, bis der Überstand nach Zentrifugation klar ist, mindestens jedoch dreimal (siehe auch Kapitel 4.1.6.3.). Für die Perfusion einer Niere im single pass Modus benötigen wir für ein Experiment von 2 Stunden Dauer etwa 250 ml Perfusat.

14.3. Perfusionsapparatur

Wir führen die Perfusion druckkonstant (90 oder 100 mmHg) im single pass Modus durch. Um die Zusammensetzung des Perfusats (modifizierter Krebs-Henseleit-Puffer + BSA + Erythrozyten) über die Perfusionsdauer konstant zu halten (z.B. mögliche Freisetzung von Kalium durch Hämolyse) und zur Begasung des Perfusats erfolgt eine kontinuierliche Dialyse des Perfusats (siehe Kap. 4.4.5. Dialysator als „kidney lung“). Als Dialysat kommt dabei der modifizierte Krebs-Henseleit-Puffer (ohne Albumin, ohne Erythrozyten) zur Anwendung, der kontinuierlich mit einem Gasgemisch aus 5% CO₂ und 95% O₂ begast wird.

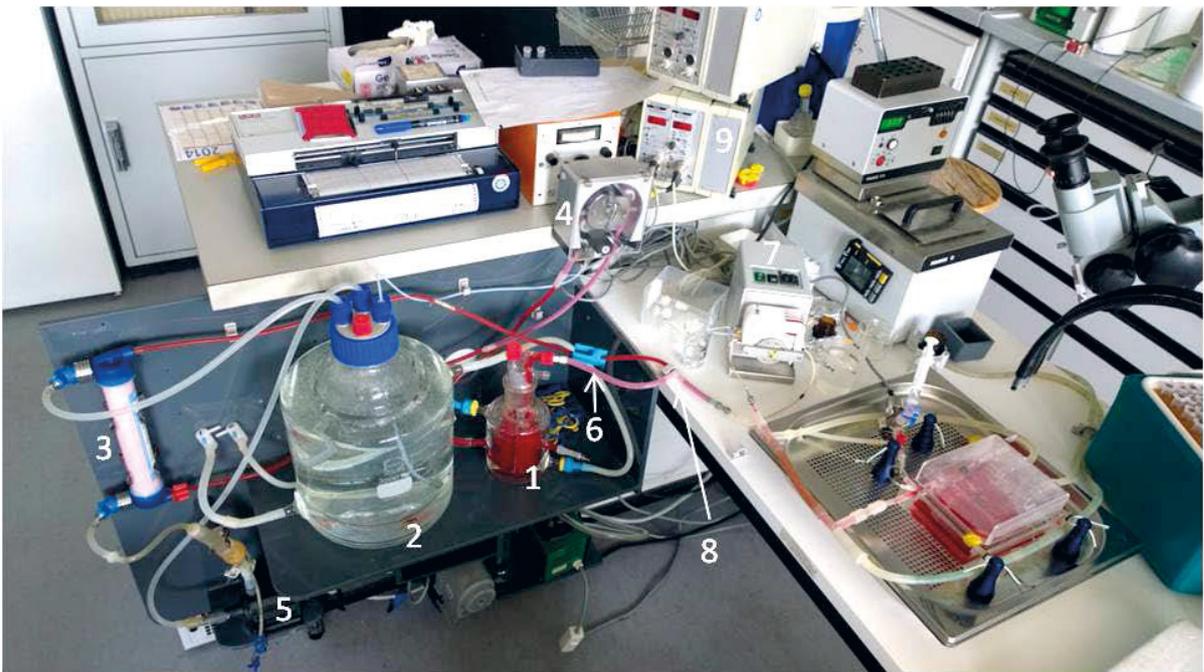


Abb. 14.1.: Aufbau einer Apparatur zur Perfusion von Mäusenieren mit konstantem Druck im Single-Pass Modus : Übersicht. Mit 5 ist hier die Kreislumpumpe für den Dialysatkreislauf codiert, wie auch in Abb. 14.2. Rechts im Bild ist die temperierte Perfusionskammer und der Druckaufnehmer zu sehen (detaillierte Darstellung in Abbildung 14.3.).

Die in den Abb. 14.1 – 14.3 beschriebenen Komponenten Perfusionspumpe (7), elektronische Steuerungseinheit (9) und die Perfusionskammer (5 in Abb. 14.3) wurden bezogen von Hugo Sachs Elektronik – Harvard Apparatus GmbH, Gruenstr. 1, D-79232 March-Hugstetten.

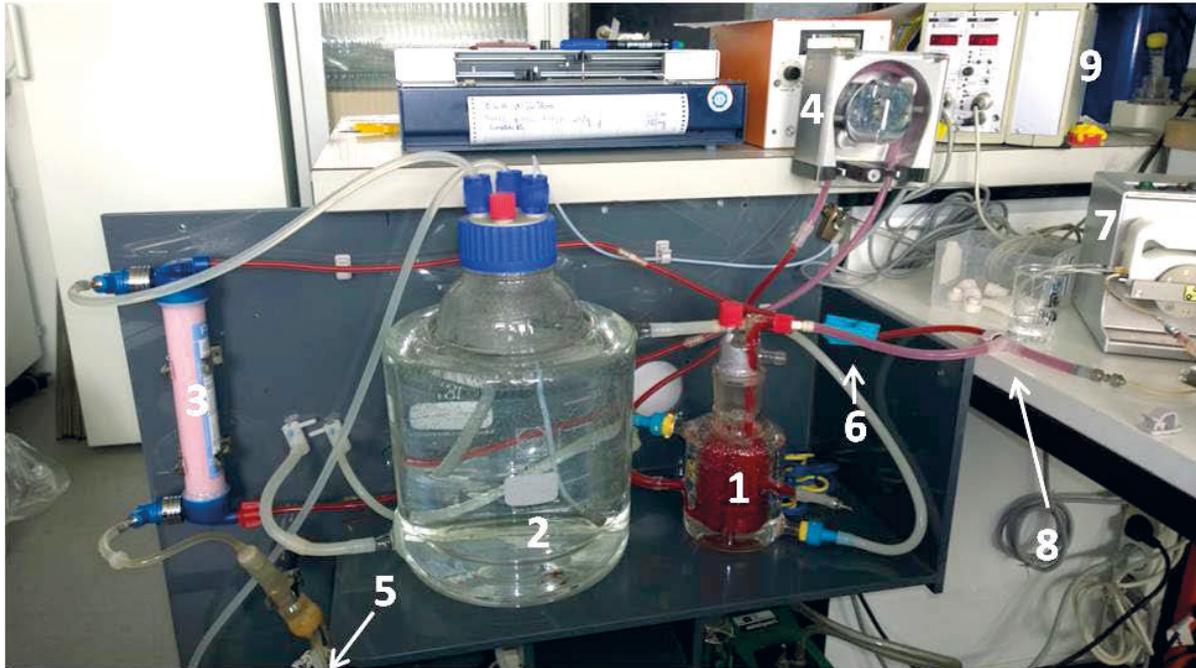


Abb. 14.2.: Detaillierte Darstellung des Dialysat- und Perfusatkreislaufs.

Kodierung der Zahlen zu den Abbildungen 14.1. und 14.2.:

1. Thermostatisiertes Gefäß mit Perfusate,
2. Thermostatisiertes Gefäß mit Dialysat,
3. Dialysator zum Stoff-/Gasaustausch zwischen Perfusate und Dialysat,
4. Rollerpumpe zur Zirkulation des Perfusats,
5. Kreiselpumpe zum Betrieb des Dialysatkreislaufs,
6. variable Klemme zur Anpassung des Drucks im Perfusatekreislauf,
7. elektronisch gesteuerte Rollerpumpe zur Perfusion der Niere. Die Regulation erfolgt druckabhängig durch die elektronische Steuereinheit (9),
8. Abzweigung des Perfusats zur Perfusion der Niere aus dem Perfusatekreislauf,
- 9: Elektronische Steuereinheit zur druckabhängigen Kontrolle der Perfusionspumpe (7),

Perfusate und Dialysat befinden sich in ummantelten Gefäßen (1 und 2 in Abb. 14.1. und 14.2.) und werden durch temperiertes Wasser erwärmt. Zusammen mit einer weiteren Erwärmung des Perfusats unmittelbar vor dem Eintritt in die Niere sowie der temperierten Nierenschale (siehe unten) wird dadurch eine Perfusatemperatur von 37°C beim Austritt des Perfusats aus der Perfusionskanüle erzielt. Perfusate (250 ml) – und Dialysat (3500 ml) stehen über einen Dialysator in Verbindung (3 in Abb. 1+2) und werden von einer Rollerpumpe (Perfusate, 4 in Abb. 14.1. und 14.2.) und einer Kreiselpumpe (Dialysat, 5 in Abb. 14.1. und 14.2.) angetrieben (Kreiselpumpe Typ 1022 Eheim GmbH, Delzschau). Nach dem Befüllen der Lösungen und vor Beginn des Experimentes ist der Druck im Perfusionskreislauf, entweder durch Änderungen der Förderrate der Rollerpumpe (4 in Abb. 14.1. und 14.2.) oder durch eine variable Schlauchklemme (6 in Abb. 14.1. und 14.2.) so einzustellen, dass es zu keiner Nettoverschiebung von Flüssigkeit zwischen Perfusate und Dialysat kommt.

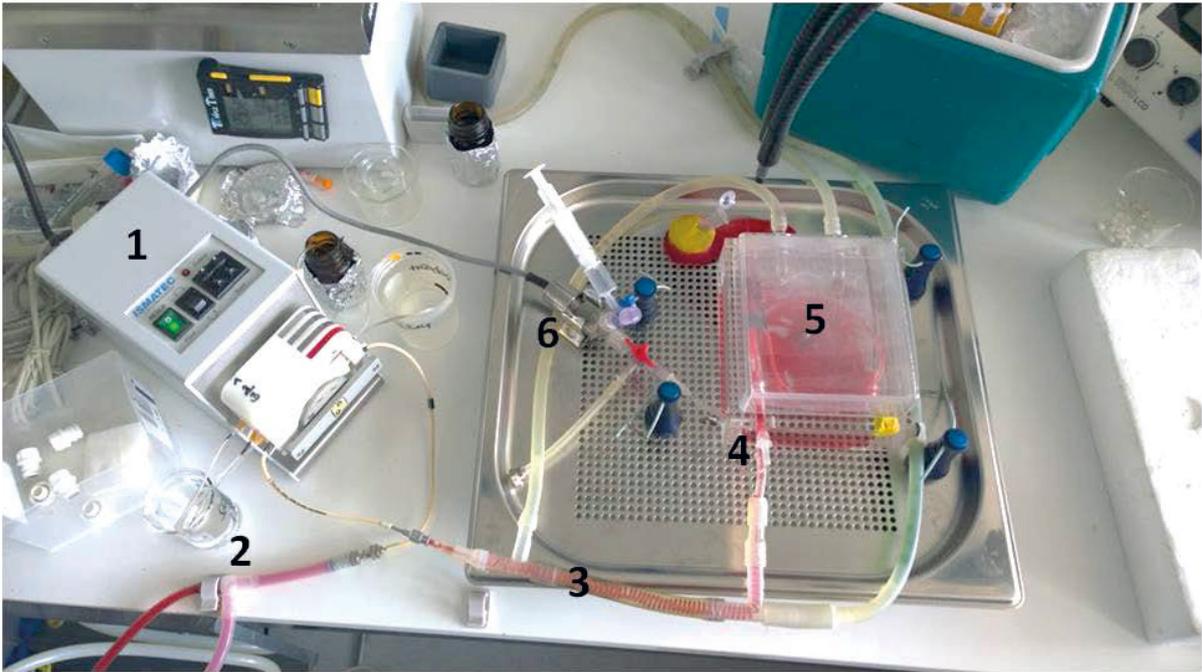


Abb. 14.3.: Aufbau einer Apparatur zur Perfusion von Mäusenieren mit konstantem Druck im Single-Pass Modus. 1. Elektronisch gesteuerte Rollerpumpe zur Perfusion der Niere, die Regulation erfolgt druckabhängig durch eine elektronische Steuereinheit, 2. Abzweigung des Perfusats zur Perfusion der Niere aus dem Perfusatkreislauf, 3: temperierte Schlauchwendel, 4. T-Stück zur Messung des Drucks im Perfusatzufluss zur Niere, 5. temperierte Nierenkammer mit Niere (detaillierte Darstellung mit geöffnetem Deckel in Abb. 14.4.), 6. Druckaufnehmer (Statham) zur Messung des Drucks im Perfusatzufluss zur Niere.

Die Perfusion der Niere wird durch eine Rollerpumpe (4-Kanal, 8 Rollen; 7 in Abb. 14.1. und 14.2.; 1 in Abb. 14.3.) angetrieben, die das Perfusat aus dem Perfusatkreislauf über ein T-Stück (8 in Abb. 14.1. und 14.2.; 2 in Abb. 14.3.) entnimmt. Auf dem Weg zur Niere wird das Perfusat durch eine weitere temperierte Schlauchwendel befördert (3 in Abb. 14.3.) und durch ein T-Stück (4 in Abb. 14.3.) in die temperierte Perfusionskammer geleitet (5 in Abb. 14.3.). Über das T-Stück wird der Druck im Perfusatkreislauf gemessen (Druckaufnehmer 6 in Abb. 14.3.). Dieser Druck dient als Signal für die elektronische Steuereinheit (9 in Abb. 14.1. und 14.2.) der Perfusionspumpe zur Konstanthaltung des Perfusionsdrucks. Zu beachten ist hier, dass es wegen der nachgeschalteten Perfusionskanüle zu einem Druckaufbau im Perfusatkreislauf kommt, der gemessene Druck daher höher als der reale Druck in der Nierenarterie ist. Gemäß Hagen-Poiseuille Gesetz nimmt dieser systematische Fehler mit abnehmendem Innendurchmesser der Perfusionskanüle überproportional zu, so dass immer die größtmögliche Kanüle verwendet werden sollte. Zudem muss für jede Kanüle der Druckaufbau im Perfusatkreislauf, d.h. ohne Niere, bestimmt und bei der korrekten Einstellung des Perfusatdrucks berücksichtigt werden. Bei der von uns verwendeten Kanüle (0,6 – 0,9 mm Durchmesser) ergibt sich bei unserem Perfusat und normalen Flussraten ein Druckabfall in der Kanüle von 8 – 10 mmHg.

14.4. Operation und Kanülierung der Nierenarterie

Die Operation der Maus erfolgt im Wesentlichen wie für die Ratte in Kapitel 8.2. beschrieben. Zur Operation wird die narkotisierte Maus in die thermostatisierte Perfusionskammer gelegt. Die Narkose erfolgt intraperitoneal mit einer Kombination aus Ketamin und Xylazin. Anschließend mediane Laparotomie, Verlagerung des Darms nach links und Freipräparation der abdominalen Aorta. Vorlegen von Fäden für die spätere Ligatur, bzw. das Einbinden der Perfusionskanüle. Abdominale Aorta: distal der linken Nierenarterie für die Fixierung der Kanüle, distal der rechten Nierenarterie für die Fixierung der Kanüle, proximal der rechten Nierenarterie für die Ligatur nach Start der Perfusion. Ligatur der A. mesenterica und der V. cava inferior distal der rechten Nierenvene. Vorlegen eines Fadens um die V. cava inferior proximal der rechten Nierenvene für die spätere Fixierung der venösen Kanüle. Anschließend wird die Aorta distal des Abgangs der rechten Nierenarterie mit einer Gefäßklemme abgeklemmt und die Aorta knapp oberhalb der Teilung in die Aa. iliacae eingeschnitten. Die Perfusionskanüle (abgestumpfte Venenverweilkanüle aus Metall, Durchmesser 0,6 – 0,9 mm) wird in die Aorta eingeführt, bis unter den distalen vorgelegten Faden vorgeschoben und durch diesen leicht in dieser Position fixiert. Nach Öffnung der Gefäßklemme auf der Aorta wird die Perfusion mit einer sehr niedrigen Förderrate (100 μ l pro Minute) gestartet, um ein Verstopfen der Kanüle durch gerinnendes Blut zu vermeiden. Die Kanüle wird nun weiter vorgeschoben bis die Kanülenöffnung unmittelbar vor dem Abgang der rechten Nierenarterie liegt. Hier erfolgt die endgültige Fixierung der Kanüle. Anschließend Ligatur der Aorta proximal des Abgangs der rechten Nierenarterie und sofortiges Erhöhen des Perfusatflusses, so dass ein ausreichender Perfusionsdruck von 90 – 100 mmHg erreicht wird. Alternativ kann auch schon hier auf den konstanten Druck-Modus gewechselt werden. Die Niere wird vom umgebenden Gewebe gelöst und die Gefäße durchtrennt. Um die spätere Kanülierung der V. cava inferior zu erleichtern, empfiehlt es sich, ein Stück der Leber, die die V. cava teilweise umgibt, am Nierenblock zu belassen. Nach Anheben der kanülierten Niere kann die Maus aus der Perfusionskammer gehoben werden und die Niere zurückgelegt werden. Es erfolgt die Kanülierung der Vene mit einem möglichst großlumigen Katheter, der das venöse Blut aus der Kammer leitet. Einbinden der Kanüle und Ligatur der v. cava inferior durch die vorbereiteten Fäden. Schließen des Deckels, um eine wasserdampfgesättigte, temperierte Umgebung für die Niere zu erzielen.

Die Bestimmung des Perfusatflusses und damit die Berechnung des renalen Gefäßwiderstandes kann nun durch die Umdrehungszahl der Perfusionpumpe bestimmt werden (Tachogenerator). Hierzu ist eine vorherige Kalibrierung erforderlich. Nachteil dieser Methode ist, dass der Perfusatfluss im Falle eines arteriellen Leckflusses überschätzt wird. Eine zweite Möglichkeit besteht in der Messung des venösen Blutflusses. Dies kann entweder durch Flussmessgeräte erfolgen, die in den venösen Abfluss integriert werden, oder durch das Auffangen des venösen Blutes und Bestimmung des Volumens während eines definierten Zeitintervalls. Nachteil der Messung des venösen Blutflusses ist, dass bei Vorliegen eines venösen Leckflusses, der renale Blutfluss unterschätzt wird. Allerdings ist man bei dieser Methode sicher, dass das gesamte Blut, das venös aufgefangen wird, tatsächlich durch die Niere geflossen ist. Da in unseren Experimenten zur Bestimmung der Reninsekretion das venöse Blut ohnehin aufgefangen werden muss, wenden wir routinemäßig das letztgenannte Verfahren zur Bestimmung des Blutflusses an (siehe Abb. 14.4).

Neben der Bestimmung der Reninaktivität im venösen Blut konnten wir im venösen Effluat der isoliert perfundierten Mäuseniere auch die zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP, sowie Adenosin und ATP messen und somit deren renale Sekretion bestimmen.

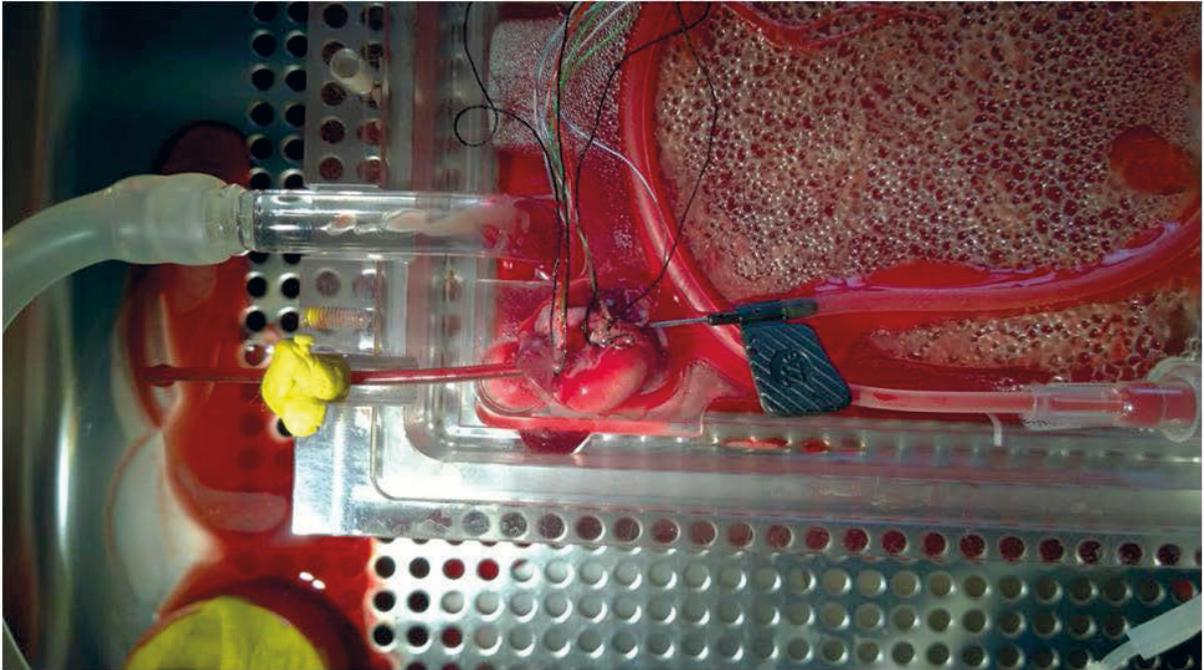


Abb. 14.4.: *Detailansicht der Nierenkammer mit geöffnetem Deckel.* Niere mit liegender Perfusionskanüle (rechts, am schwarzen Flügel erkennbar) und venösem Katheter (links) zur Drainage des Blutes nach außen. Zur Sicherung des venösen Katheters wird dieser mit handelsüblichem Knetgummi (Plastilin) fixiert.

Ad 14.2 Anhang

Schaferythrozyten als O₂-Träger für die Perfusion isolierter Mausnieren

Ein Beitrag von **Jan Czogalla**, Anatomisches Institut der Universität Zürich

Auf der Suche nach einer Alternative zu Humanerythrozyten ergab sich die Möglichkeit, defibriniertes Schafblut aus England zu beziehen. Schaferythrozyten entsprechen mit Ihrer Größe von 5-6µm denen der Mauserythrozyten.

Ausgangsmaterial: EOLabs (Burnhouse, Bonnybridge, UK) versendet zertifiziertes, defibriniertes Schaf-Vollblut. Die Schafe sind unter Veterinär-kontrollierter Quarantäne und bekommen ad libitum Futter und Wasser (ISO 17025:2005). Blut wird in Zyklen abgenommen, die garantieren, dass der Hämatokrit der Tiere stets über 35% liegt. Blut wird unter sterilen Bedingungen von der Jugularvene entnommen in Blutabnahmebeutel, die γ -bestrahlt wurden. Unter 4°C wird das Blut agitiert, bis eine vollständige Defibrinierung erreicht ist. Blut wird unter sterilen Bedingungen (ISO Grade 5/GMP Grade B) bei 4°C gelagert und innerhalb von 48h an den Empfänger versandt. Qualitätskontrolle (ISO9001:2008): Columbia-Agar-Platten werden mit dem Blut beimpft und Wachstum von Mikroorganismen über 14 Tage kontrolliert. Die Kosten für 3 x 1 Liter Schafvollblut betragen 99 GBP (136€).

Versand: Das Blut wird in den Blutbeuteln (3x1 Liter pro Sendung) in Isolierboxen verpackt. Dort sind, getrennt von dem Blut durch eine Styroporplatte, 2 Eispackungen beigelegt, die kontinuierlich kühlen. Versendet mit International Priority via FedEx erreicht das Blut den Empfänger in Festland-Europa innerhalb von 20h und ist dann noch bei ca. 8°C. Die Kosten für den Versand betragen 78€.

Lagerung und Haltbarkeit: Die Lagerung erfolgt bei uns im Kühlraum bei 4°C. Die Haltbarkeit wird vom Hersteller auf mindestens 1 Monat angegeben. Funktionelle Tests an der isolierten Niere mit 1 Monat alten Erythrozyten waren erfolgreich (Druck, Fluss, GFR und Urinzeitvolumen verhalten sich wie bei Verwendung von 3 Tage altem Blut).

Aufbereitung: Am Tag der Perfusion werden 300% des am Ende benötigten Erythrozytenvolumens steril entnommen. Das Vollblut wird in 12ml Falcon-Tubes für 8 Minuten bei 3000g zentrifugiert. Das Blutplasma und die oberste ca. 0,5cm der Erythrozytensäule werden entnommen und verworfen und das fehlende Volumen mit dem Dialysepuffer, welcher für die IPK verwendet wird, aufgefüllt. Dieselben Zentrifugationsschritte wie in Schritt 1 werden angewandt. Derart werden die Erythrozyten 4x gewaschen. Zuletzt wird der Pufferüberstand abgenommen und die Erythrozyten durch einen Filter (Machery-Nagel MN 615 Papierfilter, 4-12µm Porengröße) dem finalen Perfusionspuffer zugegeben (auf einen Hct von ca. 10%). Für zwei Mausnieren werden 700ml Perfusionspuffer gebraucht.

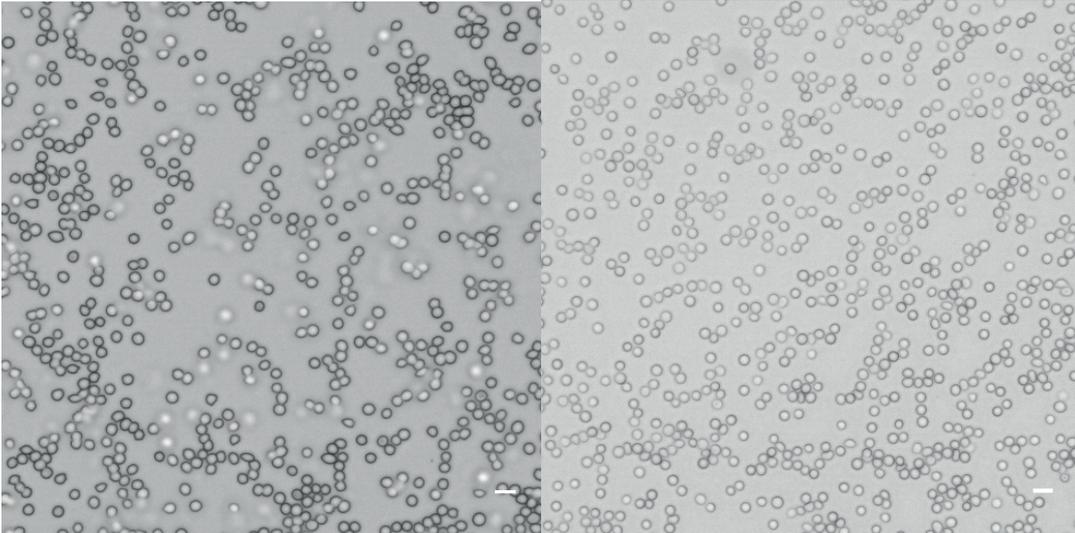


Abb. 14.5. Schaferythrozyten aus England im Ausstrich, verdünnt: links: Erythrozyten nach 2h kontinuierlicher Dialyse, rechts: Erythrozyten nach 2h kontinuierlicher Dialyse & Nierenpassage, der Nierenvene entnommen. Scalebar: 10µm.

15. Technischer Bildanhang zur IPRK



Abb.15.1.0.: Ensemble zur Gasbefeuchtung und Anwärmung. Oben ist eine Fritte, die in einen mit destilliertem Wasser gefüllten Erlenmeyerkolben mit Schliff eingepasst wird und das Gas über die darüber abgebildete Gasschlange vorgewärmt erhält. Der Erlenmeierkolben wird in ein Wasserbad eingetaucht (s.a. Abb. 5.1.1.0.). Über die Glasschlangen des unteren Bildes wird nachgewärmt mit dem Vorteil, dass man kein Kondenswasser ins Perfusionsmedium verschleppt. Die Anordnung der 4-fach Schlange war der Phase geschuldet, als im single pass Modus mit bis zu vier verschiedenen Substraten der Einfluss auf den Natriumtransport untersucht worden war (bis zu 4 Woulffsche Flaschen mit jeweils 2 Litern Perfusatvariante hintereinandergeschaltet (246, 247)).



Abb. 15.1.1: Montageblock als Auffangtrichter, Venenkanülenhalter und Ventilblock.

Der aktuelle Auffangtrichter wird unter der Nierenschale positioniert, er ist aus Edelstahl mit eingeschraubtem Schlauchadapter (Perfusatablauf). Anschlüsse für Wasserbadtemperierung links. Zwei Bohrungen vorn dienen der Durchführung der Schläuche für den arteriellen Bypass, dem Durchgang und zur Fixierung des T-Abgangs der Venenkanüle. Die äußere Rändelschraube dient der Vorkonstriktion des arteriellen Bypass zur pO_2 -Messung, die Nachbarschraube fixiert den T-Abgang der Venenkanüle. Der darunterliegende Balken bewegt zwei Klemmstifte um den arteriellen bzw. venösen Zulauf zur O_2 -Messung im Wechsel zu blockieren. Antrieb mit Pressluft über ein Magnetventil angesteuert, die seitlich aufgesetzte Platte nimmt den Stift des Pressluftzylinders auf. Der Pioniertyp des Hannoveraner Auffangtrichters war aus vernickeltem Messing gefertigt. Die Nachfolgetypen in Hannover und Münster wurden in der Forschungswerkstatt aus Edelstahl gearbeitet. Die Temperierung war auch mit Edelstahl ausreichend gewährleistet. Die dunkle Farbe entstand durch einen Veredelungsversuch mit physikalischem Plasma über Kohlenstoff aus Acetylen (diamantartige Oberfläche). Ansicht auch von unten mit angeschraubter Halteplatte.

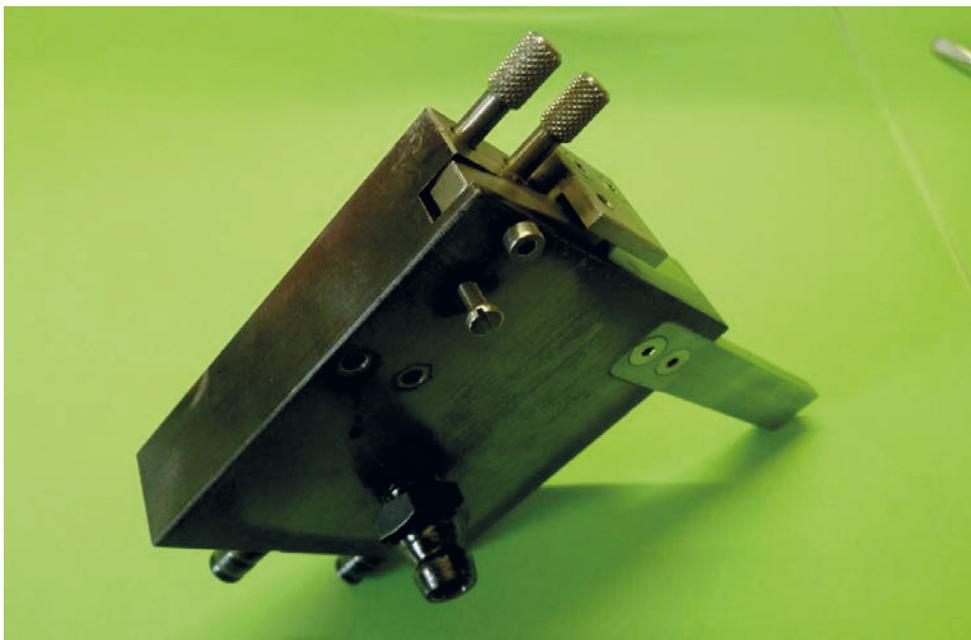




Abb. 15.1.2.: *Die Venenkanüle mit gestuftem T-Abgang zum Schlauchanschluss* für den Bypass zur O₂-Meßkammer, rechts Luer-Konnektor für punktuelle Kontrollmessungen und venöse Probenentnahme.

Die Zurückhaltung von Experimentatoren bei der Kanülierung der Nierenvene ist verständlich. Bei dem von uns genutzten Modus ist dies unproblematisch, weil ausreichend Zeit ist nach dem Beginn der Perfusion dieses Manöver unter kontinuierlicher Flusskontrolle auf dem Schreiber zu beobachten. Nachdem der Auffangtrichter untergeschwenkt bzw. montiert ist und die Perfusion druckkonstant gesteuert läuft, kann die Venenkanüle im Montageblock an die vena cava inferior von cranial (rechts) angenähert werden und die Vene mit zwei Uhrmacherpinzetten über die Kanüle gestülpt werden. Danach wird mit der oberen Cavaligatur eingebunden und dann erst die untere Cavaligatur geschlossen, sodaß das Perfusat quantitativ über die Kanüle drainiert. Diese Prozedur ist deshalb so einfach, weil die Kanüle um die Achse des unteren T-Abgangs drehbar ist und mit der Fixierschraube leicht und noch drehbar oder fest arretiert werden kann, dies alles unter Flusskontrolle am Schreiber.

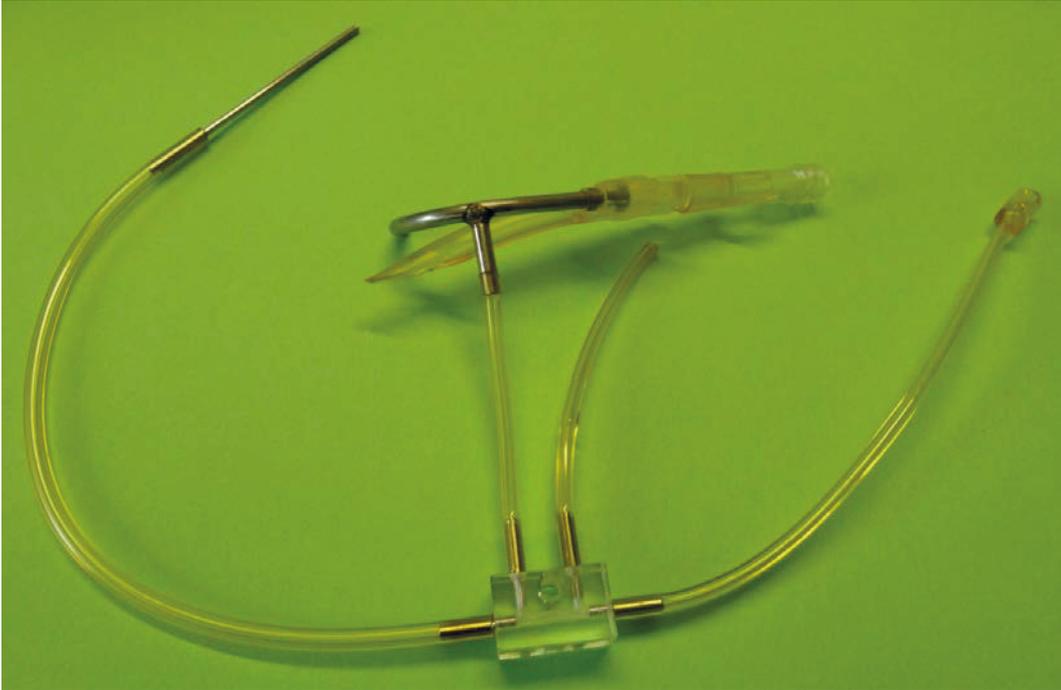


Abb. 15.1.3.: Ensemble mit Venenkanüle, arteriellem Bypass und Anschluss an die Sauerstoffmeßküvette. Die Venenkanüle ist per Tygonschlauch an einen 4-Wegeblock angeschlossen, ebenso der Schlauch für den arteriellen Bypass, rechts Abgang zur O₂-Messkammer, links atmosphärisch offener Überlauf, der in den Sammeltrichter zurückgeführt wird.

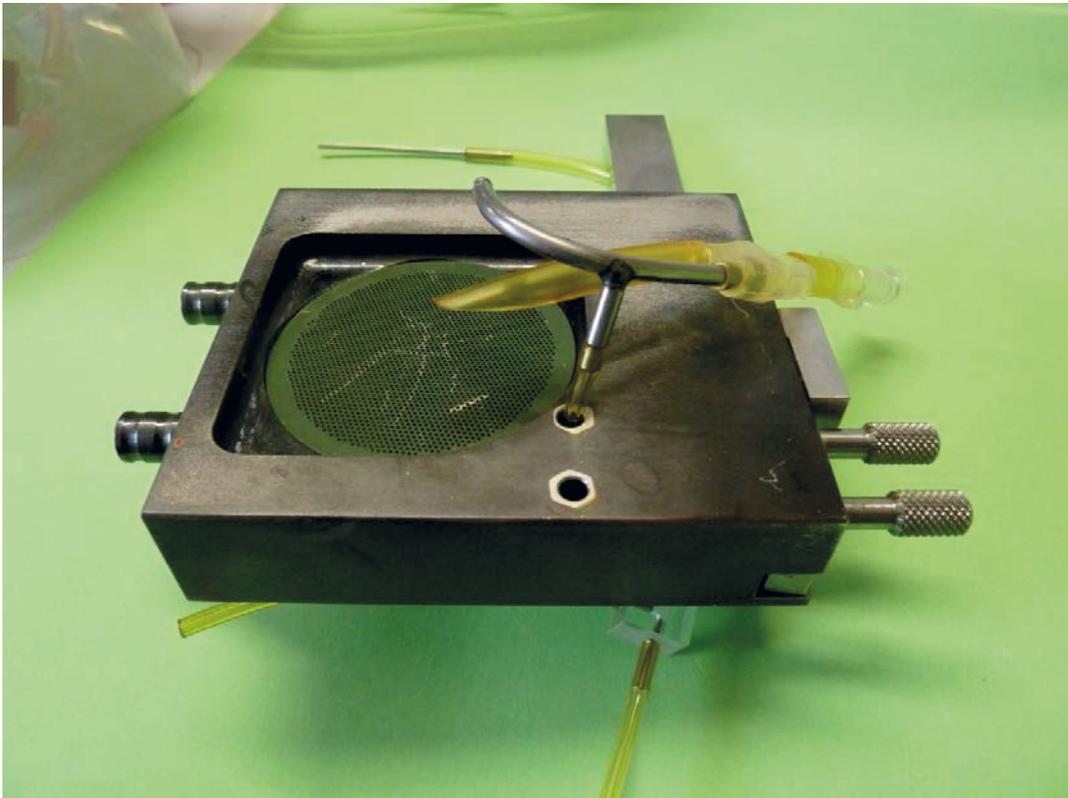


Abb. 15.1.4.: Vormontage von oben. Das Schlauch-System ist für die Montage vorbereitet.

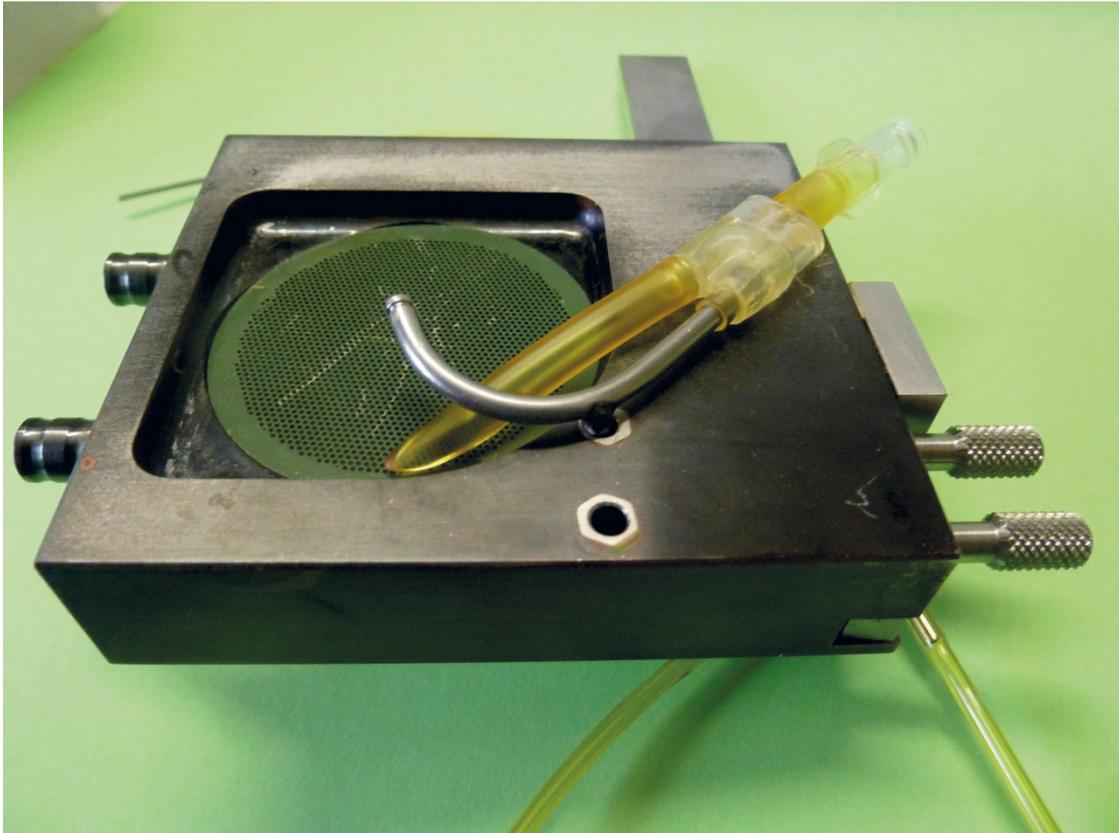


Abb. 15.1.5.: Fertigmontage. Ansicht von oben. Die Venenkanüle ist abgesenkt und provisorisch fixiert, sie kann um die Achse des T-Abgangs gedreht werden zum Einschwenken in die untere Vena cava von kranial her mit Öffnung zur Nierenvene. Der Schlauch für den arteriellen Bypass muss noch von unten durch das vordere Loch durchgefädelt werden.

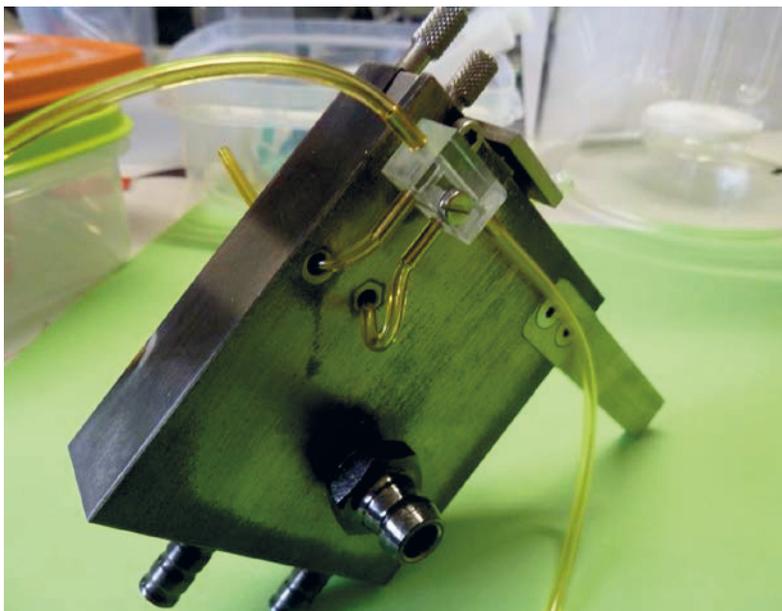


Abb. 15.1.6.: Fertigmontage. Ansicht von unten mit angeschraubtem 4-Wegeblock, der Schlauch für den arteriellen Bypass ist durchgesteckt und in der Grundposition vom Ventilbalken durch Federdruck abgeklemmt. Rechts seitlich unten die angeschraubte Halteplatte, mit der der Auffangtrichter am OP-Tisch fixiert wird. Unten die großlumige Schlaucholive für den Effluatschlauch, der zum Reservoir führt oder beim single-pass Modus zu einem Auffangbe-

hälter. Für eine sensorgesteuerte Rückführung des Effluats mit Ventil zur Schaumreduktion wäre eine kleinere Olive ausreichend und besser. So kann Effluat ohne Luftsegmente zurückgeführt werden.



Abb. 15.1.7.: Ansichten der zuletzt genutzten Nierenschale mit Montageblock. Der Montageblock ist zweigeteilt aus Messing gefertigt. Das Material der Schale ist Edelstahl. Das Temperierwasser wird von den Anschlüssen in die Mitte des nach hinten schräg abgesetzten Blocks U-förmig quer geführt. Das seitlich mit Laser angeschweißte Absaugröhrchen* öffnet nach vorn und sollte in der in situ Position mit einem breiten Silikonhalbschlauch unterfahren werden um ein Einsaugen von Fettbürzeln zu verhindern. Die Abmessungen der Schale sind: Breite 28mm, Höhe der vorderen Schale 15mm, Gesamthöhe 29mm, Tiefe 20,5mm, Oliven 6/4mm, Absaugröhrchen 3mm. Montagegestange 10mm dick, · 90mm lang. Die Abmessungen des Montageblocks sind: Breite 30mm, Höhe 35mm, Tiefe 20mm, der Innenteil ist 16mm breit und hat in Aufsicht rechts eine horizontale Nut zur Fixierung per angespitzter Schraube.

*Über das Absaugröhrchen wird nach Perfusionsbeginn und Durchtrennen von Aorta und Vena cava der Blutsee abgesaugt in ein Zwischengefäß (z.B. Erlenmeierkolben mit Schliff). In Berlin haben wir noch mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt, heute dient dazu der Einsaugstutzen eines Kleinkompressors.



Abb. 15.1.9.a.: Anlage in Vorbereitung einer Modus 3 Perfusion vor Erythrozytenzugabe. Links der 5 Liter Dialysatbehälter, in der Mitte der Kapillardialysator (FX5), die Zwei-Wege-Pumpe mit Dialysatarm hinten und Perfusatarm vorn, rechts hinten die feedback-gesteuerte Perfusionspumpe und der Perfusatbehälter.

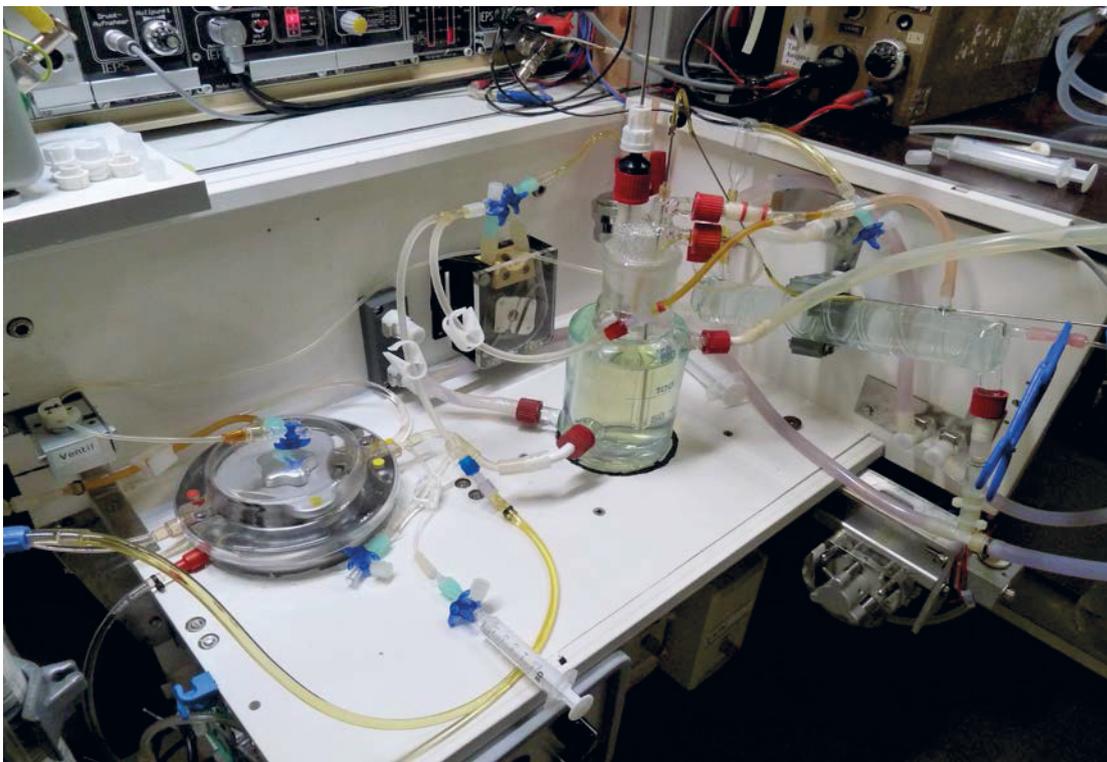


Abb. 15.1.9.b.: Detail-Ensemble. Links das Schlauchventil (normal closed), es öffnet die Dialysatzugabe zum Perfusat, wenn die Abtastsonde im Perfusatbehälter bei sinkendem Flüssigkeitsspiegel den Kontakt verliert, die Regelhysterese liegt bei ca. 2ml (1% des Füllvolumens). Die Steuerungselektronik gibt es im Fachhandel (z.B. Kemo M158: Wassermelder). Die blaue Klemme rechts versperrt den Weg zum Organ, links davon ist der Bypass offen.

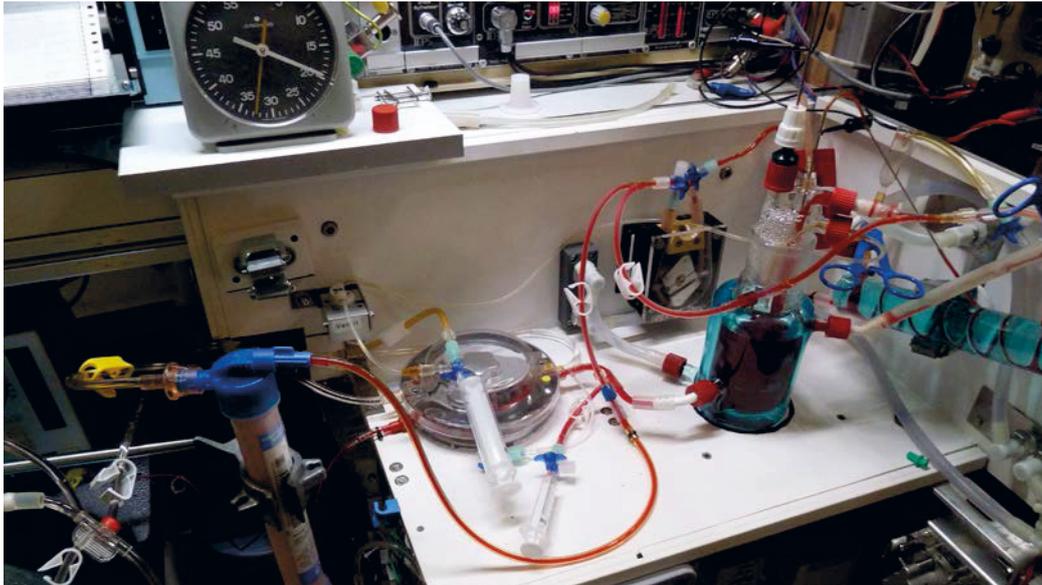


Abb. 15.2.0.a.: Nach Erythrozyten-Zugabe und Perfusionsstart (19. Minute). Ein Hämatokrit von 5% reicht aus um morphologisch sichtbare Sauerstoffmangelschäden zu verhindern (253). Im Perfusatbehälter ist ein Rührmagnet und unter dem Perfusattopf eingebaut das Rührgerät, was eine Entmischung der Erythrozyten im Perfusat verhindert.

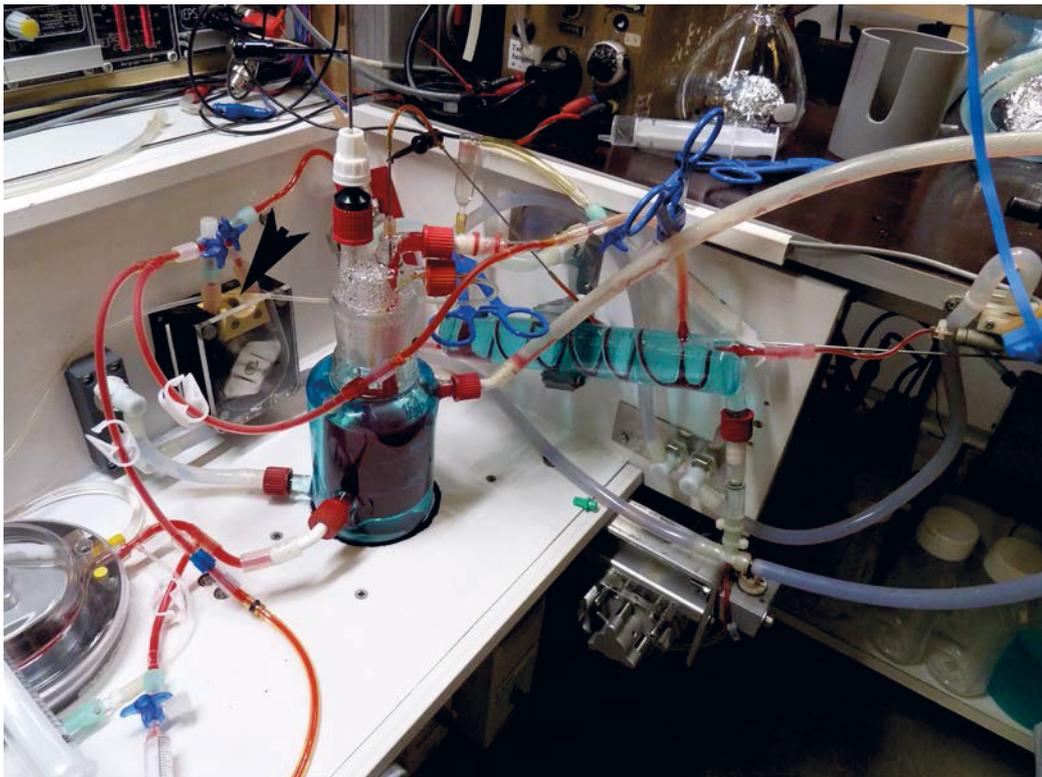


Abb. 15.2.0.b.: Detail-Ensemble. Der dünne Schlauch zwischen den beiden Anschlüssen der Perfusatspumpe (schwarzer Pfeil) führt weiter nach rechts zum Perfusatbehälter. Hierüber wird bei geöffnetem Ventil Dialysat zugeführt als Ersatz bei gesunkenem Perfusatspiegel (durch verlorenes Urinvolumen und Ultrafiltrat im Dialysator). Volumenverluste durch entnommene Perfusatsproben können durch Absenken der Abtastsonde kompensiert werden. Der Bypass von der Temperierschlange zum Reservoir ist jetzt abgeklemmt (blaue Klemme).



Abb. 15.2.0.c.: Perfusatbehälter im Detail mit Füllstandsregelung. Die Abtastsonde links ist in der Höhe verstellbar und dient als eine der Elektroden für die Nachfüllregelung zur Kompensation der Zwangsuptrafiltration des Dialysators. Das dünne Edelstahlröhrchen rechts dient als zweite Elektrode und darüber wird auch das Meßaliquot für die Sauerstoffdruckmessung zurückgeführt. S.a. Abb. 5.3.2.

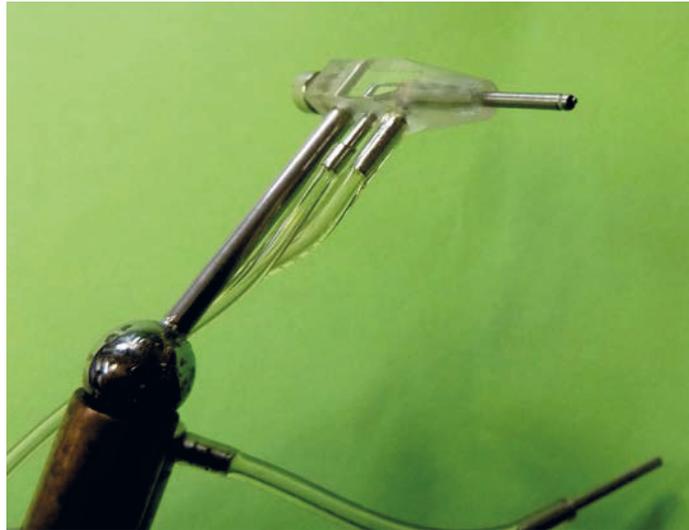
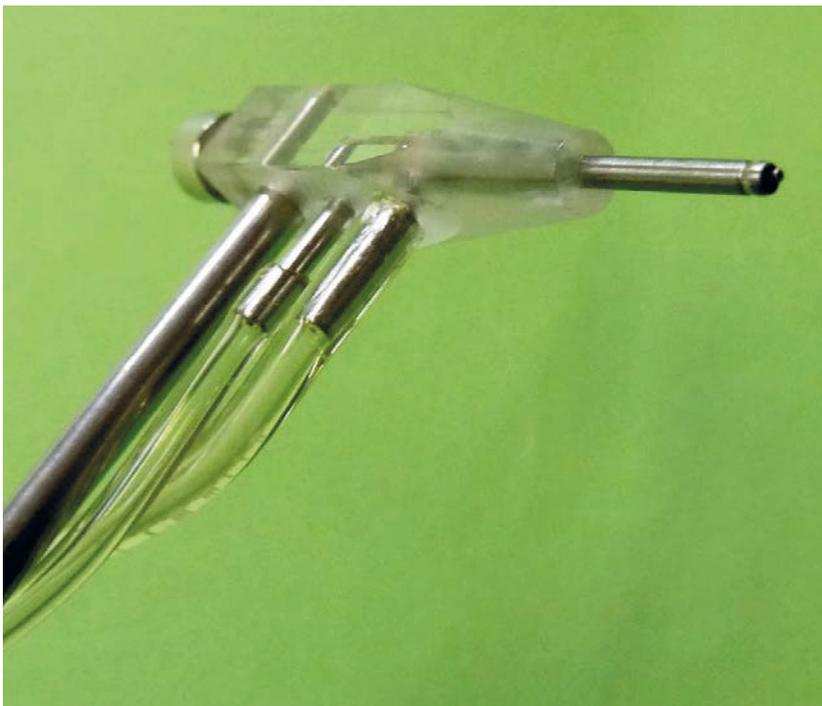


Abb. 15.2.1.a.: Doppelläufige Aortenkanüle durch Magnet-Kugelgelenk beweglich fixiert. Die Kugel ist in der Pfanne frei beweglich. Die Perfusionskanüle selbst ist auf der Rundstabachse fest angeschraubt (IBS Magnet, Berlin; ibsmagnet.de).



Das Detailbild der Kanüle links unten zeigt die als Pionier vorstehende Innenkanüle zur Druckübertragung an den Druckaufnehmer. Die Außenkanüle weist frontal eine Kerbe auf zur Fixierung des Einbindefadens.

Die genaue Dimension der Kanüle ist in Abb. 4.3.8 angegeben.

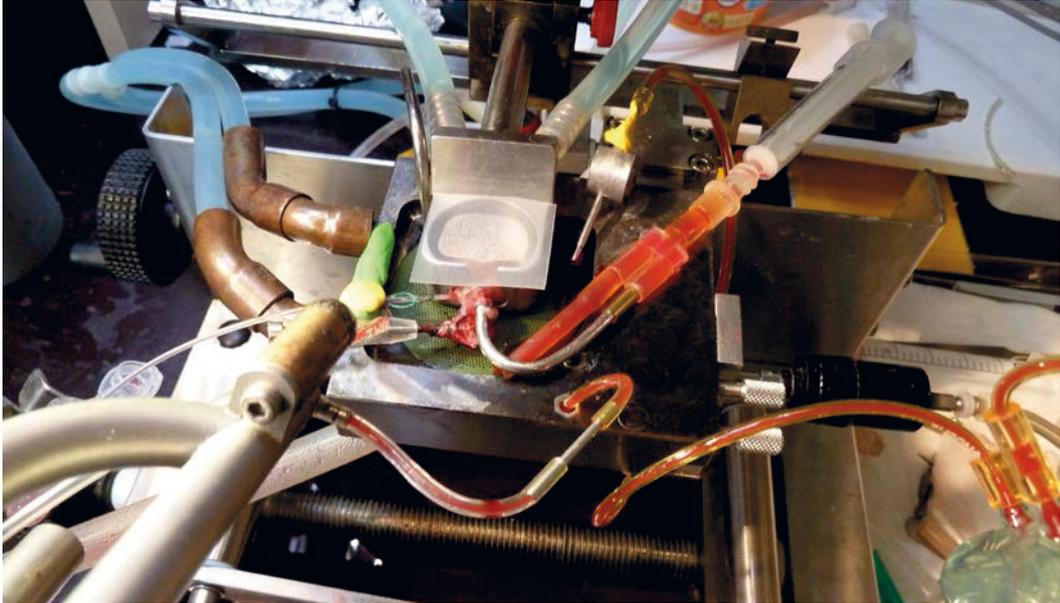


Abb. 15.2.1.b.: Perfundierte Niere mit Kanülen in Aorta und Vena cava und Ureterkatheter. Über die Siebplatte unter der Nierenschale wird das venöse Effluat drainiert. Die Niere ist durch Parafilm abgedeckt, der Ureterkatheter durch Plastilin fixiert, der Ureterkatheter führt links zum Sammeltöpfchen. Vorn der Bypass für die arterielle pO_2 -Messung, rechts führt der Tygonschlauch zur Messküvette. Der schwarze Zylinder rechts bewegt pneumatisch den Umschaltbalken, der alternierend von der venösen pO_2 -Messung zur arteriellen wechselt.

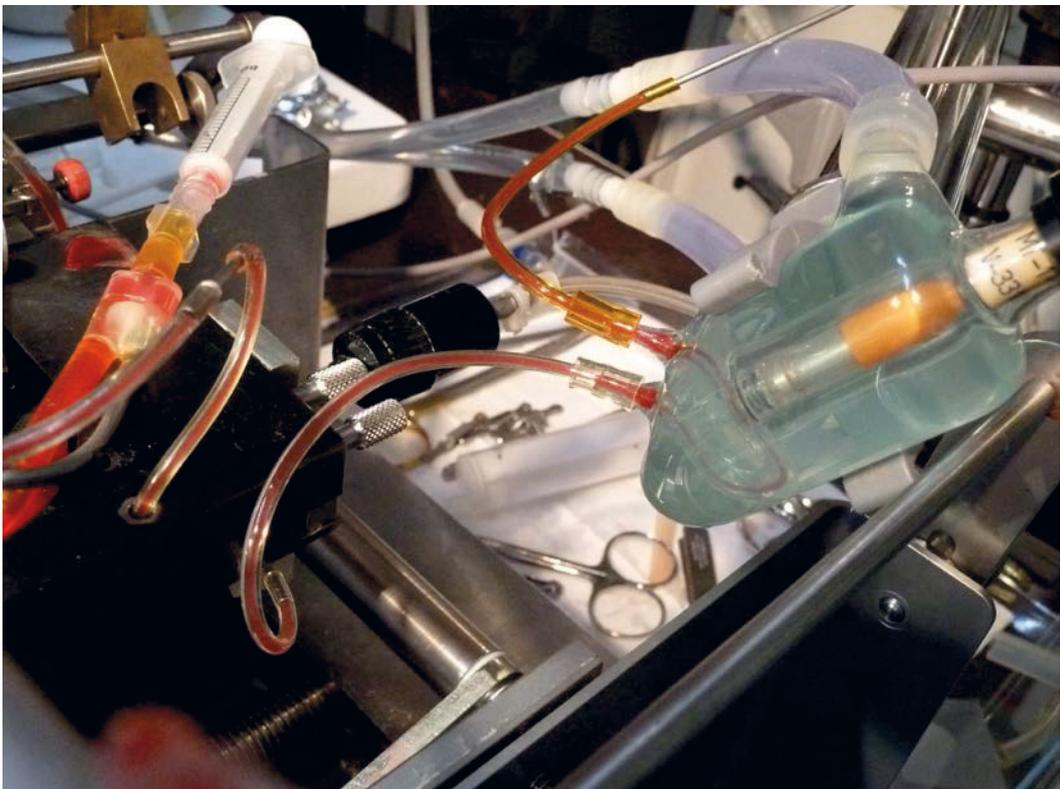


Abb. 15.2.1.c.: Detailbild mit pO_2 -Sonde (Typ MT-1-AC, Eschweiler, Kiel) in der Küvette. Alternativ hierzu kann eine Mehrfachküvette zur Messung von pO_2 , pCO_2 und pH dafür eingesetzt werden. Der Aufwand zur Kalibrierung ist nicht unerheblich. Die Messung zeigt aber, dass die Auslenkungen von pH und pCO_2 deutlich grösser sind bei zellfreiem Perfusat.

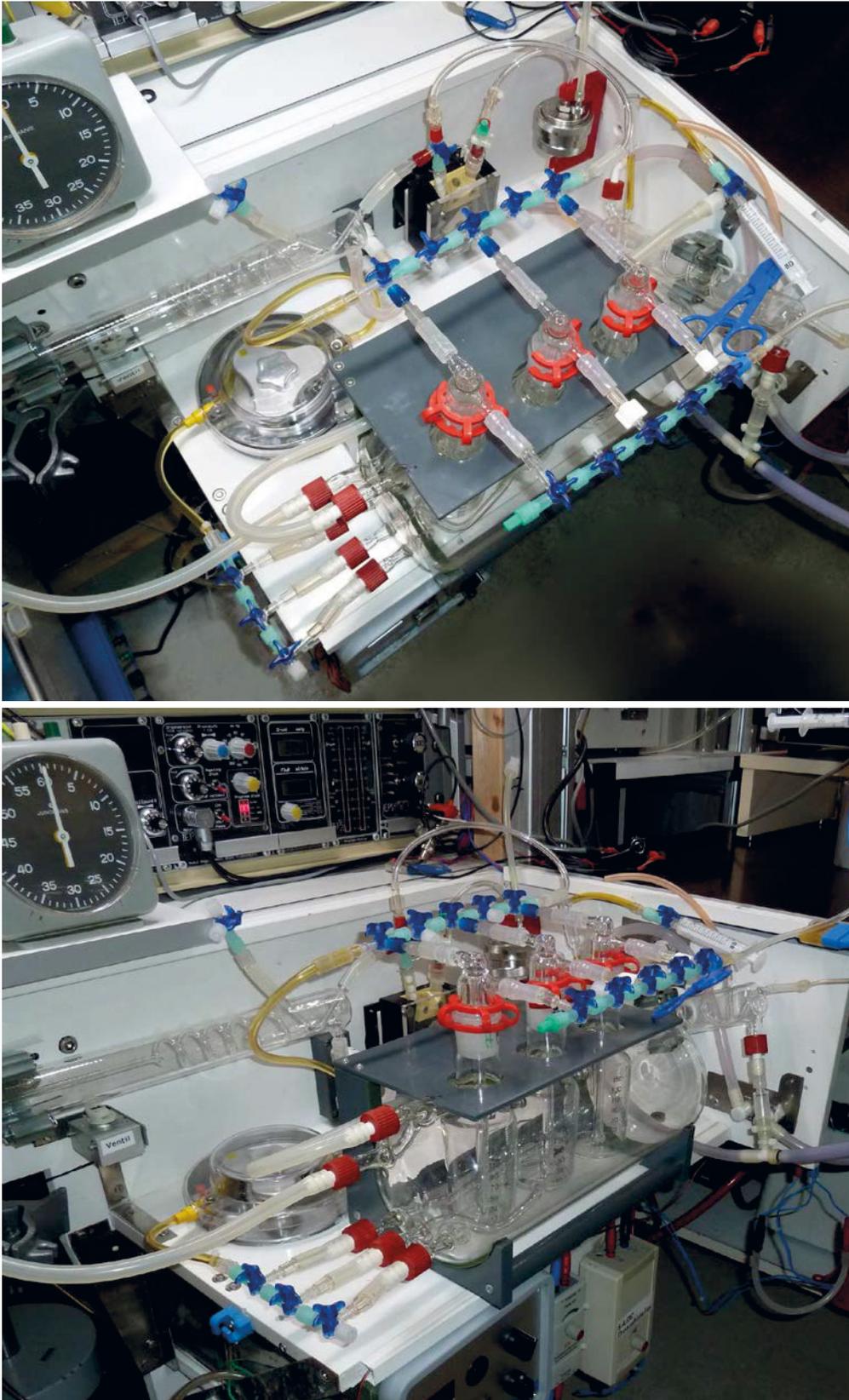


Abb. 15.2.2.a/b.: Aufbau zur Reperfusion anatomisch fixierter Nieren. Temperierter Glasbehälter mit 3 getrennten Einsätzen für die Rezirkulation und zur Variation der Bedingungen. Über die Glasschlange links kann temperierte NaCl-Lösung zur Zwischenspülung angeboten werden.

16. Anhang zur Historie der Nierenperfusion von 1849 bis 1908.

Chronologie des Wissens über Perfusionsapparaturen modifiziert nach BD Ross aus der Arbeit von **K.Skutul** aus dem Pharmakologischen Labor der St. Wladimir Universität zu Kiew (267): **Über Durchströmungsapparate. Pflügers Arch 123: 249-273, 1908**

- 1849** **Carl Eduard Löbell, Dissertation in Latein, Universität zu Marburg. 1849** (146). *De conditionibus quibus secretiones in glandulis. Erste Versuche zur Perfusion isolierter Schweinenieren mit defibriniertem Blut und Messung der Urinausscheidung, sogenannte Durchleitungsversuche. Bemerkenswert seine Beobachtung, dass das hellrote arterielle Blut dunkel gefärbt und reicher an festen Bestandteilen aus der Nierenvene abfließt, während aus dem Ureter eine völlig klare Flüssigkeit hervortrat, welche in ziemlicher Quantität Eiweiß enthielt (s.a. Kommentar von Ernst Bidder zu Löbells Arbeit, auch zur Qualität des Lateins).*
- 1862** **Ernst Bidder, Dissertation in Deutsch an der kaiserlichen Universität zu Dorpat, heute Tartu in Estland** (28). Bidder setzte sich recht kritisch mit der Arbeit von Löbell auseinander, zitiert aber die obige Beobachtung als wichtiges Ergebnis. Eine interessante Beobachtung war, dass bei sehr niedrigem Durchfluss in den Urinproben mehr Eiweiß zu finden war als bei höherem Durchfluss.
- 1867-1869** **Alex Schmidt im Labor von Carl Ludwig in Leipzig** verbesserte die Methodik indem das Blutperfusat auf 36-40°C erwärmt und kontinuierlich durch die Niere strömte (Arbeiten der physiologischen Anstalt zu Leipzig 1869, S.99).
- 1877** **G. Bunge und O. Schmiedeberg** (45) wiesen die Synthese von Hippursäure in Durchleitungsexperimenten an der isolierten Hundeniere nach.
- 1885** **Frey und Gruber** konstruierten einen Apparat mit einem Kreislauf des Blutes mit Oxygenator (künstliche Lunge) und einer pulsatilen Pumpe.
- 1890** **C. Jacobj stellt den von ihm konstruierten und „Hämatisator“ genannten Apparat in Straßburg vor**, der eine wassermotorbetriebene Zweiventilpumpe nutzte und eine Oxygenierung des Blutes, womit er dem natürlichen Kreislauf näher kommt.
- 1892** **W. von Sobieranski und C. Jacobj** setzten eine biologische Lunge ein und vermieden so den direkten Kontakt des Blutes mit atmosphärischer Luft, ein quasi „doppelter Hämatisator“ wie Skutul ihn nannte. Pulsatile Perfusion wie oben.
- 1895** **O. Langendorff in Rostock entwickelte erfolgreich einen Perfusionsapparat für das Herz**, an dessen Prinzip sich über die Jahre kaum etwas verändert hat. Die Organfunktion kann bei schlagendem Herzen untersucht werden, die Kontraktionen können aufgezeichnet werden. Als Druckquelle dient eine 17,5 Liter große Glasflasche, die mit nachfließendem Wasser auf Druck gehalten wird (Typ Gasometer).

- 1903** *T.G. Brodie in London beschrieb einen Rezirkulationsapparat mit regulierbarer Pumpe und einstellbar konstantem Perfusionsdruck, kleinem Rezirkulationsvolumen und mit zunehmender Erfahrung später eingebauten Filtern im venösen und arteriellen Schenkel des Systems, was sich im arteriellen Schenkel bis in die Neuzeit erhalten hat, bzw. „wiederentdeckt“ wurde. The perfusion of surviving organs. J Physiol 29: 266-275, 1903.*
- 1904** *Sakusow in St. Petersburg beschrieb in seiner Dissertation von 1904 (in Russisch) eine verbesserte Temperierung mit einer im Wasserbad inkubierten Glasschlange.*
- 1904** *A. Siewert in Kiew (Arbeit in Deutsch) perfundierte isolierte Herzen mit einem modifizierten Langendorff-Apparat, indem er das Perfusat vorgewärmt über eine temperierte Glasschlange unmittelbar vor dem Herzen damit normotherm zuführen konnte. Pflügers Archiv 102: 364-372, 1904.*
- 1908** *K. Skutul in Kiew hat in seiner Übersicht über bisherige Apparaturen aus den Fehlern der Vorläufer gelernt, deren Arbeiten er bis auf die Brodie Arbeit sehr genau studiert hatte. Daraus hat er einen eigenen Apparat entwickelt (267) (Publikation in Deutsch).*

Anhang historische Bilder

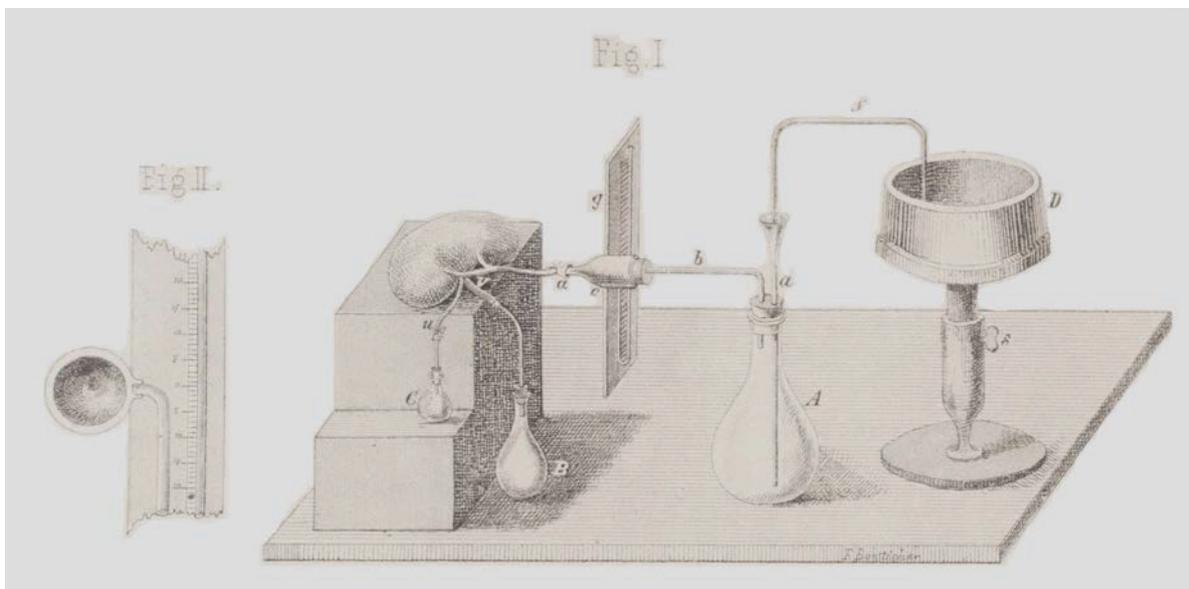


Abb. 16.1.1.: Apparatur nach Ernst Bidder. Das Bild stammt aus der Dissertation von 1862, deutsche Originalpublikation an der kaiserlichen Universität von Dorpat, dem heutigen Tartu in Estland (28).

Jacobj C: XXIII Arbeiten aus dem Laboratorium für experimentelle Pharmakologie zu Strassburg. 78. Apparat zur Durchblutung isolirter Organe. **Archiv f. experimentelle Pathologie u. Pharmakologie Band XXVI: S 388-400, 1890**, die Zeitschrift wird heute unter dem Namen: „Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology“ fortgeführt im Springer-Wissenschafts-Verlag und ist digitalisiert einsehbar (109). Copyright permission von Springer.

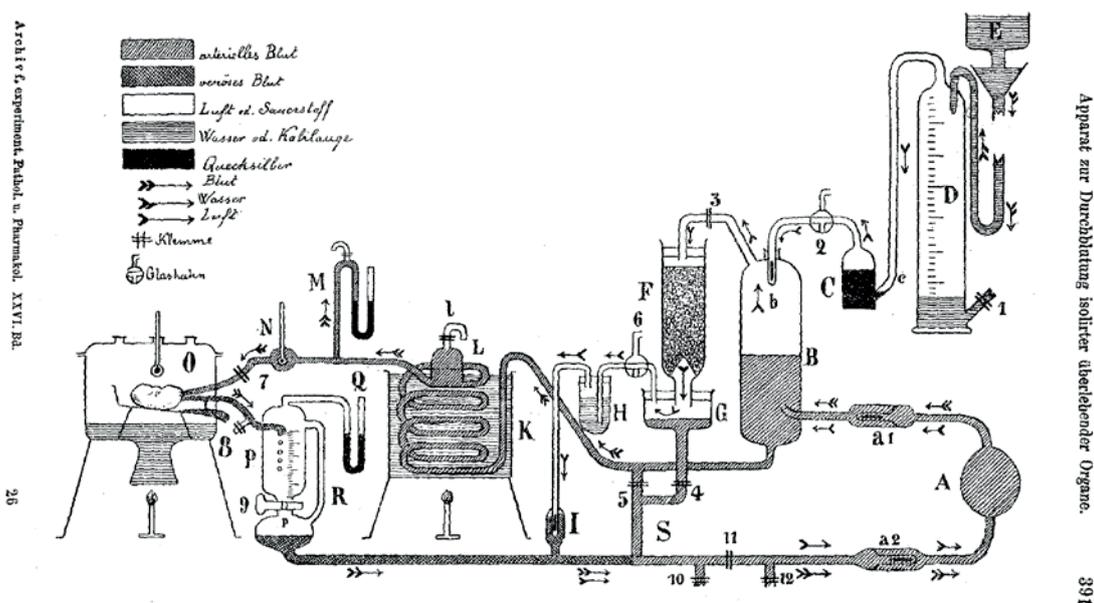


Abb. 16.1.2.: Die historische Apparatur von Jacobj aus dem Pharmakologischen Institut der Universität von Straßburg mit originellen Ideen zur Perfusion von Hundenieren. Es besteht aus drei Röhrensystemen für 1. Arterielles Blut, für 2. Venöses Blut und für 3. Luft bzw. Sauerstoffzirkulation zur Arterialisierung des Blutes. Rechts das „Kunsthertz“ A, eine Balgpumpe mit zwei Ventilen, der Ballon wurde von einer Wippe pulsatil komprimiert, getrieben von einem Wassermotor. Das Reservoir B für Luft und Blut fasste incl. Großkreislauf 300 ml defibrinierten Bluts und war mit Gasdruck aus einem Sauerstoffgasometer D vorkomprimiert. Bei S konnte der kleine Kreislauf geschlossen werden und den Überschuss der Pumpe aufnehmen. Bei I wurde Sauerstoff nachgegeben, der zuvor im Kohlensäure-Absorptionsgefäß H von CO₂ befreit wurde durch Passage einer Kalilauge. Temperiert wurde über eine Glasspirale im Wasserbad mit Bunsenbrennern und Temperaturkontrolle bei N, der venöse Fluss konnte mit einer Messkammer P gemessen werden. Quecksilber-U-Röhren dienten der Druckmessung. Der zugeführte Sauerstoff konnte in dem Zylinder D gemessen werden, der Sauerstoff wurde portionsweise im Gasometer D von zufließendem Wasser verdrängt und durch ein Quecksilber-Rückschlagventil in den Vorratsbehälter für arterielles Blut geblasen wo es mit CO₂ vermischt wurde. Das restliche Gas (O₂) wurde dem Blut bei I zugemischt und das Blut so arterialisiert (F hatte Entschäumer-Funktion). Die Protokolle der Arbeit zeigen, dass die Durchflussraten bei einer 28g schweren Hundeniere bei 10-33ml/min recht niedrig lagen. Andererseits wurden bei Schlachthofnieren vom Schwein nach einer perfusionsfreien Karenz von 45min deutlich höhere Werte erreicht, aber dennoch wiesen sie eine hohe Sauerstoffausschöpfung auf, was auf eine

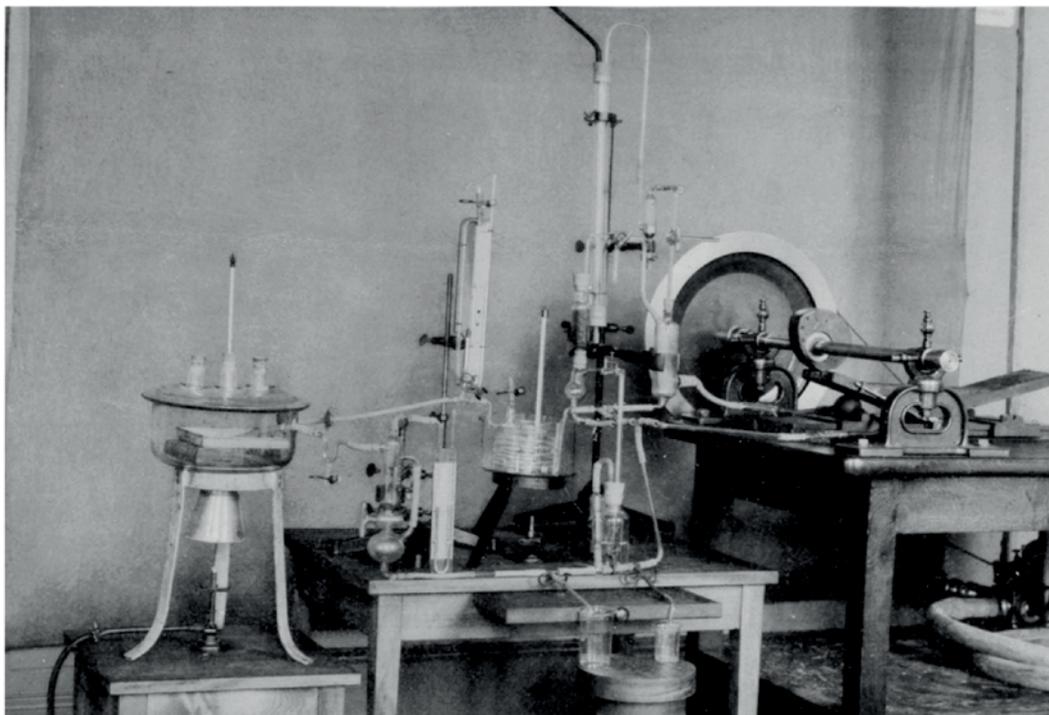
Mangelperfusion hinweist (s.a. Nizet im 20. Jahrhundert (177)). Zwei Jahre später wurde mit von Sobieranski zusammen im Zweitkreislauf eine biologische Lunge eingesetzt um die Nachteile des ersten Systems zu überwinden. In der 1892 publizierte Arbeit findet sich allerdings diese Technik noch nicht beschrieben.

Jacobj C und v. Sobieranski W: II Arbeiten aus dem Laboratorium für experimentelle Pharmakologie zu Strassburg. 89. Über das Funktionsvermögen der künstlich durchbluteten Niere. **Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie 29: 25-40, 1892.**

In dieser Arbeit wird der unregelmäßige Wasserdruck beklagt, der dazu führen konnte, dass der Wassermotor unregelmäßig läuft und wie man dieses Problem überwinden konnte.

C. Jacobj.

Leichtdruck v. J. Kraemer, Hofphotograph, Kehl.



Tafel V.

Abb. 16.1.3.: Apparatur von C. Jacobj. Die Abbildung, damals von einem Hofphotographen aus der Nachbarstadt Kehl aufgenommen, zeigt rechts die aufwendige mechanische Wippe, mit der der Gummiball als Ventrikelerersatz über die Nockenwelle komprimiert wurde. Angetrieben wurde das System von einem Wassermotor, wie man ihn bis in die fünfziger Jahre des 20. Jahrhunderts auch noch für Waschmaschinen genutzt hat, zumal das damals günstiger war als elektrische Maschinen. Man sieht auch die beiden Bunsenbrenner links unter der Organ-kammer und in der Mitte unter dem Wasserbad für die Glasschlange. Erkennbar sind auch die U-förmigen Quecksilbermanometer am venösen Ausgang und arteriellen Zulauf.

17. Literatur

1. **Abraham R, Dawson W, and Gangolli SD.** The isolated perfused rat liver in toxicological studies. *Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol* 259: 203, 1968.
2. **Abraham R, Dawson W, Grasso P, and Golberg L.** Lysosomal changes associated with hyperoxia in the isolated perfused rat liver. *Exp Mol Pathol* 8: 370-387, 1968.
3. **Adlkofer F, Schurek HJ, and Soerje H.** The renal clearance of thyroid hormones in the isolated perfused rat kidney. *Horm Metab Res* 12: 400-404, 1980.
4. **Aeikens B.** Untersuchungen über den Kapillaraufbau des Glomerulum und morphometrische Messungen am Glomerulum. Habilitationsschrift. Medizinische Hochschule Hannover, 1982.
5. **Aeikens B, Eenboom A, and Bohle A.** Untersuchungen zur Struktur des Glomerulum. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 381: 283-293, 1979.
6. **Alcorn D, Emslie KR, Ross BD, Ryan GB, and Tange JD.** Selective distal nephron damage during isolated kidney perfusion. *Kidney Int* 19: 638-647, 1981.
7. **Aldehni F, Tang T, Madsen K, Plattner M, Schreiber A, Friis UG, Hammond HK, Han PL, and Schweda F.** Stimulation of renin secretion by catecholamines is dependent on adenylyl cyclases 5 and 6. *Hypertension* 57: 460-468, 2011.
8. **Arendshorst WJ, and Gottschalk CW.** Glomerular ultrafiltration dynamics: euvo-lemic and plasma volume-expanded rats. *Am J Physiol* 239: F171-F186, 1980.
9. **Arendshorst WJ, and Gottschalk CW.** Glomerular ultrafiltration dynamics: historical perspective. *Am J Physiol* 248: F163-F174, 1985.
10. **Assel E.** Polykationeninduzierte Erhöhung der Durchlässigkeit für Albumin ohne morphologische Veränderungen der Fußfortsätze. Untersuchungen mit Protamin an der isoliert perfundierten Rattenniere. Dissertation. Medizinische Hochschule Hannover, 1982.
11. **Assel E, Neumann KH, Schurek HJ, Sonnenburg C, and Stolte H.** Glomerular albumin leakage and morphology after neutralization of polyanions. I. Albumin clearance and sieving coefficient in the isolated perfused rat kidney. *Ren Physiol* 7: 357-364, 1984.
12. **Bahlmann J, Giebisch G, Ochwaldt B, and Schoeppe W.** Micropuncture study of isolated perfused rat kidney. *Am J Physiol* 212: 77-82, 1967.
13. **Bainbridge FA, and Evans CL.** The heart, lung, kidney preparation. *J Physiol* 48: 278-286, 1914.
14. **Baines AD, Adamson G, Wojciechowski P, Pliura D, Ho P, and Kluger R.** Effect of modifying O₂ diffusivity and delivery on glomerular and tubular function in hypoxic perfused kidney. *Am J Physiol* 274: F744-F752, 1998.
15. **Baines AD, Christoff B, Wicks D, Wiffen D, and Pliura D.** Cross-linked hemoglobin increases fractional reabsorption and GFR in hypoxic isolated perfused rat kidneys. *Am J Physiol* 269: F628-F636, 1995.
16. **Baines AD, and Ross BD.** Nonoxidative glucose metabolism a prerequisite for formation of dilute urine. *Am J Physiol* 242: F491-F498, 1982.
17. **Bastin J, Cambon N, Thompson M, Lowry OH, and Burch HB.** Change in energy reserves in different segments of the nephron during brief ischemia. *Kidney Int* 31: 1239-1247, 1987.

18. **Bauman AW, Clarkson TW, and Miles EM.** Functional evaluation of isolated perfused rat kidney. *J Appl Physiol* 18: 1239-1246, 1963.
19. **Baumung H, and Peterlik M.** Über die Verwendung einer "künstlichen Niere" bei der Durchströmung der isolierten Rattenleber. *Med Pharmacol Exp Int J Exp Med* 16: 275-281, 1967.
20. **Baylis C, Ichikawa I, Willis WT, Wilson CB, and Brenner BM.** Dynamics of glomerular ultrafiltration. IX. Effects of plasma protein concentration. *Am J Physiol* 232: F58-F71, 1977.
21. **Bayliss WM.** On the local reactions of the arterial wall to changes of internal pressure. *J Physiol* 28: 220-231, 1902.
22. **Bekersky I.** Use of the isolated perfused kidney as a tool in drug disposition studies. *Drug Metab Rev* 14: 931-960, 1983.
23. **Belzer FO, Ashby BS, Huang JS, and Dunphy JE.** Etiology of rising perfusion pressure in isolated organ perfusion. *Ann Surg* 168: 382-391, 1968.
24. **Bertermann H, Franke H, Huland H, and Weiss C.** CO₂-production by the isolated perfused rat kidney from ¹⁴C-labelled substrates. *Res Exp Med* 161: 1-14, 1973.
25. **Besarab A, DeGuzman A, and Swanson JW.** Effect of albumin and free calcium concentrations on calcium binding in vitro. *J Clin Pathol* 34: 1361-1367, 1981.
26. **Besarab A, Silva P, Landsberg L, and Epstein FH.** Effect of catecholamines on tubular function in the isolated perfused rat kidney. *Am J Physiol* 233: F39-F45, 1977.
27. **Besarab A, Silva P, Ross B, and Epstein FH.** Bicarbonate and sodium reabsorption by the isolated perfused kidney. *Am J Physiol* 228: 1525-1530, 1975.
28. **Bidder E.** Beiträge zur Lehre von der Function der Nieren. Dissertation. Kaiserliche Universität zu Dorpat, heute Tartu, Estland: Universität Tartu, 1862.
29. **Boesken WH, Mamier A, Neumann H, and Engelhardt R.** Gibt es die "febrile Proteinurie". *Klin Wochenschr* 61: 917-922, 1983.
30. **Bohrer MP, Deen WM, Robertson CR, and Brenner BM.** Mechanism of angiotensin II-induced proteinuria in the rat. *Am J Physiol* 233: F13-F21, 1977.
31. **Bowman RH.** Gluconeogenesis in the isolated perfused rat kidney. *J Biol Chem* 245: 1604-1612, 1970.
32. **Bowman RH.** The perfused rat kidney. *Methods Enzymol* 39: 3-11, 1975.
33. **Bowman RH, and Maack T.** Effect of albumin concentration and ADH on H₂O and electrolyte transport in perfused rat kidney. *Am J Physiol* 226: 426-430, 1974.
34. **Bowman RH, and Maack T.** Glucose transport by the isolated perfused rat kidney. *Am J Physiol* 222: 1499-1504, 1972.
35. **Brandt P.** Der Elektrolytgehalt im Nierengewebe von intakten und adrenaletomierten Ratten. Untersuchungen an in vivo Nieren und an isoliert perfundierten Nieren. Dissertation. Inst. f. Klin. Physiologie. Freie Univ. Berlin., 1974, p. 1-85.
36. **Brezis M, and Rosen S.** Hypoxia of the renal medulla-its implications for disease. *N Engl J Med* 332: 647-655, 1995.
37. **Brezis M, Rosen S, Silva P, and Epstein FH.** Renal ischemia: a new perspective. *Kidney Int* 26: 375-383, 1984.
38. **Brezis M, Rosen S, Silva P, and Epstein FH.** Transport activity modifies thick ascending limb damage in the isolated perfused kidney. *Kidney Int* 25: 65-72, 1984.
39. **Brezis M, Rosen S, Spokes K, Silva P, and Epstein FH.** Substrates induce hypoxic injury to medullary thick limbs of isolated rat kidneys. *Am J Physiol* 251: F710-F717, 1986.

40. **Brezis M, Rosen S, Spokes K, Silva P, and Epstein FH.** Transport-dependent anoxic cell injury in the isolated perfused rat kidney. *Am J Pathol* 116: 327-341, 1984.
41. **Brink HM, Moons WM, and Slegers JF.** Glomerular filtration in the isolated perfused kidney. I. Sieving of macromolecules. *Pflügers Arch* 397: 42-47, 1983.
42. **Brink HM, Moons WM, and Slegers JF.** Glomerular filtration in the isolated perfused kidney. II. Glomerular hemodynamics. *Pflügers Arch* 397: 48-53, 1983.
43. **Brink HM, and Slegers JF.** Instantaneous measurement of glomerular filtration rate in the isolated perfused rat kidney. *Pflügers Arch* 383: 71-73, 1979.
44. **Brull L, and Louis-Bar D.** Toxicity of artificially circulated heparinized blood on the kidney. *Arch Int Physiol Biochim* 65: 470-476, 1957.
45. **Bunge G, und Schmiedeberg O.** Über die Bildung der Hippursäure. *Archiv für Experimentelle Pathologie & Pharmakologie* 6: 233-255, 1876. Heute fortgeführt unter: Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology
46. **Castrop H, Schweda F, Mizel D, Huang Y, Briggs J, Kurtz A, and Schnermann J.** Permissive role of nitric oxide in macula densa control of renin secretion. *Am J Physiol Renal Physiol* 286: F848-F857, 2004.
47. **Cheung K, Hickman PE, Potter JM, Walker NI, Jericho M, Haslam R, and Roberts MS.** An optimized model for rat liver perfusion studies. *J Surg Res* 66: 81-89, 1996.
48. **Ciarimboli G.** Role of size, charge and conformation of dissolved molecules and of fixed charges of the filtration barrier in glomerular permselectivity. Dissertation. Universität Hannover FB Biologie, 1999, p. 1-83.
49. **Ciarimboli G, Boekenkamp A, Schurek HJ, Fels LM, Kilian I, Maess B, and Stolte H.** The "fixed" charge of glomerular capillary wall as determinant of permselectivity. *Ren Fail* 23: 365-376, 2001.
50. **Ciarimboli G, Hjalmarsson C, Bökenkamp A, Schurek HJ, and Haraldsson B.** Dynamic alterations of glomerular charge density in fixed rat kidneys suggest involvement of endothelial cell coat. *Am J Physiol Renal P.* 285: F722-F730, 2003.
51. **Ciarimboli G, Schurek HJ, Zeh M, Flohr H, Bökenkamp A, Fels LM, Kilian I, and Stolte H.** Role of albumin and glomerular capillary wall charge distribution on glomerular permselectivity: studies on the perfused-fixed rat kidney model. *Pflügers Arch* 438: 883-891, 1999.
52. **Cohen JJ.** Is the function of the renal papilla coupled exclusively to an anaerobic pattern of metabolism? *Am J Physiol* 236: F423-F433, 1979.
53. **Cohen JJ, Gregg CM, Merkens LS, Brand PH, Garza-Quintero R, Pashley DH, and Black AJ.** Comparison of the oxidation rates of glucose and lactate in relation to support of Na⁺ reabsorption. *Curr Probl Clin Biochem* 8: 418-423, 1977.
54. **Cohen JJ, and Kamm DE.** Renal Metabolism: Relation to Renal Function. In: *The Kidney*, edited by Brenner BM, and Rector FC, Jr. Philadelphia: WB Saunders, 1981, p. 147, 155-157.
55. **Cohen JJ, Kook YJ, and Little JR.** Substrate-limited function and metabolism of the isolated perfused rat kidney: effects of lactate and glucose. *J Physiol* 266: 103-121, 1977.
56. **Cohen JJ, and Little JR.** Lactate metabolism in the isolated perfused rat kidney: relations to renal function and gluconeogenesis. *J Physiol* 255: 399-414, 1976.
57. **Cortell S, Davidman M, Gennari FJ, and Schwartz WB.** Catheter size as a determinant of outflow resistance and intrarenal pressure. *Am J Physiol* 223: 910-915, 1972.

58. **Cowin GJ, Leditschke IA, Crozier S, Brereton IM, and Endre ZH.** Regional proton nuclear magnetic resonance spectroscopy differentiates cortex and medulla in the isolated perfused rat kidney. *MAGMA* 5: 151-158, 1997.
59. **Cowley AW, Jr., Ryan RP, Kurth T, Skelton MM, Schock-Kusch D, and Gretz N.** Progression of glomerular filtration rate reduction determined in conscious Dahl salt-sensitive hypertensive rats. *Hypertension* 62: 85-90, 2013.
60. **De Mello G, and Maack T.** Nephron function of the isolated perfused rat kidney. *Am J Physiol* 231: 1699-1707, 1976.
61. **de Seigneux S, Nielsen J, Olesen ETB, Dimke H, Kwon TH, Frokiaer J, and Nielsen S.** Long-term aldosterone treatment induces decreased apical but increased basolateral expression of AQP2 in CCD of rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 293: F87-F99, 2007.
62. **Demerath T, Staffel J, Schreiber A, Valletta D, and Schweda F.** Natriuretic peptides buffer renin-dependent hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol* 306: F1489-F1498, 2014.
63. **Doering HJ, and Dehnert H.** Das isoliert perfundierte Warmblüter-Herz nach Langendorff. *Biomesstechnik-Verlag March GmbH, Germany*, 1985.
64. **Dume T, Koch KM, Krause HH, and Ochwad B.** Kritischer venöser Sauerstoffdruck an der erythrocytenfrei perfundierten isolierten Rattenniere. *Pflügers Arch* 290: 89-100, 1966.
65. **Eisenbach GM, Liew JB, Boylan JW, Manz N, and Muir P.** Effect of angiotensin on the filtration of protein in the rat kidney: a micropuncture study. *Kidney Int* 8: 80-87, 1975.
66. **Endre ZH, Ratcliffe PJ, Tange JD, Ferguson DJ, Radda GK, and Ledingham JG.** Erythrocytes alter the pattern of renal hypoxic injury: predominance of proximal tubular injury with moderate hypoxia. *Clin Sci (Lond)* 76: 19-29, 1989.
67. **Epstein FH, Brosnan JT, Tange JD, and Ross BD.** Improved function with amino acids in the isolated perfused kidney. *Am J Physiol* 243: F284-F292, 1982.
68. **Evans RG, Gardiner BS, Smith DW, and O'Connor PM.** Intrarenal oxygenation: unique challenges and the biophysical basis of homeostasis. *Am J Physiol Renal Physiol* 295: F1259-F1270, 2008.
69. **Fauler J, Wiemeyer A, Yoshizawa M, Schurek HJ, and Froelich JC.** Metabolism of cysteinyl leukotrienes by the isolated perfused rat kidney. *Prostaglandins* 42: 239-249, 1991.
70. **Felts JM, and Whayne TF, Jr.** A small oxygenator for use with an organ perfusion system. *IEEE Trans Biomed Eng* 20: 382-384, 1973.
71. **Ferguson DC, and Jennings AS.** Regulation of conversion of thyroxine to triiodothyronine in perfused rat kidney. *Am J Physiol* 245: E220-E229, 1983.
72. **Fisher MM, and Kerly M.** Amino acid metabolism in the perfused rat liver. *J Physiol* 174: 273-294, 1964.
73. **Flemming B, Arenz N, Seeliger E, Wronski T, Steer K, and Persson PB.** Time-dependent autoregulation of renal blood flow in conscious rats. *J Am Soc Nephrol* 12: 2253-2262, 2001.
74. **Flohr H.** Die Bedeutung der negativen Ladungen in der glomerulären Basalmembran für die Proteinurie. Untersuchungen an dem neu etablierten Modell der reperfundierten, isolierten und anatomisch fixierten Rattenniere. *Dissertation. Medizinische Hochschule Hannover: 1990, p. 1-77.*
75. **Folkman J, Winsey S, Cole P, and Hodes R.** Isolated perfusion of thymus. *Exp Cell Res* 53: 205-214, 1968.

76. **Franke H, Gronow G, and Petersen K.** Glucagon induced functional changes of isolated perfused rat kidney. *Curr Probl Clin Biochem* 8: 424-434, 1977.
77. **Franke H, Huland H, Weiss C, and Unsicker K.** Improved net sodium transport of the isolated rat kidney. *Z Gesamte Exp Med* 156: 268-282, 1971.
78. **Franke H, Malyusz M, and Runge D.** Improved sodium and PAH transport in the isolated fluorocarbon-perfused rat kidney. *Nephron* 22: 423-431, 1978.
79. **Franke H, Malyusz M, and Weiss C.** Substrate oxidation and inhibition of sodium transport in the isolated perfused rat kidney. *Curr Probl Clin Biochem* 4: 169-174, 1975.
80. **Franke H, Sobotta EE, Witzki G, and Unsicker K.** Funktion und Morphologie der isolierten Rattenniere nach zellfreier Perfusion mit verschiedenen Plasmaexpandern. *Anaesthesist* 24: 231-238, 1975.
81. **Gertz KH, Mangos JA, Braun G, and Pagel HD.** Pressure in the glomerular capillaries of the rat kidney and its relation to arterial blood pressure. *Pflügers Arch* 288: 369-374, 1966.
82. **Godecke A, Decking UK, Ding Z, Hirchenhain J, Bidmon HJ, Godecke S, and Schrader J.** Coronary hemodynamics in endothelial NO synthase knockout mice. *Circ Res* 82: 186-194, 1998.
83. **Green R, Windhager EE, and Giebisch G.** Protein oncotic pressure effects on proximal tubular fluid movement in the rat. *Am J Physiol* 226: 265-276, 1974.
84. **Grosse-Siestrup C, Unger V, Fehrenberg C, Baeyer H, Fischer A, Schaper F, and Groneberg DA.** A model of isolated autologously hemoperfused porcine slaughterhouse kidneys. *Nephron* 92: 414-421, 2002.
85. **Grosse-Siestrup C, Unger V, Meissler M, Nagel S, Wussow A, Peiser C, Fischer A, Schmitt R, and Groneberg DA.** Hemoperfused isolated porcine slaughterhouse kidneys as a valid model for pharmacological studies. *J Pharm Sci* 92: 1147-1154, 2003.
86. **Grünberger C, Obermayer B, Klar J, Kurtz A, and Schweda F.** The calcium paradoxon of renin release: calcium suppresses renin exocytosis by inhibition of calcium-dependent adenylate cyclases AC5 and AC6. *Circ Res* 99: 1197-1206, 2006.
87. **Guan Z, Gobe G, Willgoss D, and Endre ZH.** Renal endothelial dysfunction and impaired autoregulation after ischemia-reperfusion injury result from excess nitric oxide. *Am J Physiol Renal Physiol* 291: F619-F628, 2006.
88. **Guan Z, Willgoss DA, Matthias A, Manley SW, Crozier S, Gobe G, and Endre ZH.** Facilitation of renal autoregulation by angiotensin II is mediated through modulation of nitric oxide. *Acta Physiol Scand* 179: 189-201, 2003.
89. **Gutsche HU, Holstein-Rathlou NH, and Leyssac PP.** Oscillating tubulo-glomerular feedback, proximal hydrostatic pressure fluctuations in relation to early salt concentration. *Nieren- und Hochdruckkrankheiten* 17: 1988.
90. **Gutsche HU, Müller-Suur R, Hegel U, and Hierholzer K.** Electrical conductivity of tubular fluid of the rat nephron. Micropuncture study of the diluting segment in situ. *Pflügers Arch* 383: 113-121, 1980.
91. **Hamilton RL, Berry MN, Williams MC, and Severinghaus EM.** A simple and inexpensive membrane "lung" for small organ perfusion. *J Lipid Res* 15: 182-186, 1974.
92. **Haraldsson B, Nystrom J, and Deen WM.** Properties of the glomerular barrier and mechanisms of proteinuria. *Physiol Rev* 88: 451-487, 2008.

93. **Haraldsson BS, Johnsson EK, and Rippe B.** Glomerular permselectivity is dependent on adequate serum concentrations of orosomucoid. *Kidney Int* 41: 310-316, 1992.
94. **Hartwig M.** Zur Konversion von Thyroxin zu Trijodthyronin an der isoliert perfundierten Rattenniere mit Bestimmung des freien Thyroxins durch Equilibriumsdialyse. Dissertation. Medizinische Hochschule Hannover, 1988, p. 1-52.
95. **Harvey AM, and Malvin RL.** Comparison of creatinine and inulin clearances in male and female rats. *Am J Physiol* 209: 849-852, 1965.
96. **Hautmann M, Friis UG, Desch M, Todorov V, Castrop H, Segerer F, Otto C, Schutz G, and Schweda F.** Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulates renin secretion via activation of PAC1 receptors. *J Am Soc Nephrol* 18: 1150-1156, 2007.
97. **Hemingway A.** Some observations on the perfusion of the isolated kidney by a pump. *J Physiol* 71: 201-213, 1931.
98. **Hemmingsen L, and Skaarup P.** Urinary excretion of ten plasma proteins in patients with febrile diseases. *Acta Med Scand* 201: 359-364, 1977.
99. **Hems R, Ross BD, Berry MN, and Krebs HA.** Gluconeogenesis in the perfused rat liver. *Biochem J* 101: 284-292, 1966.
100. **Heringlake M, Wagner K, Schumacher J, and Pagel H.** Urinary excretion of urodilatin is increased during pressure natriuresis in the isolated perfused rat kidney. *Am J Physiol* 277: F347-F351, 1999.
101. **Hierholzer K, Lichtenstein I, Siebe H, Tsiakiras D, and Witt I.** Renal metabolism of corticosteroid hormones. *Klin Wochenschr* 60: 1127-1125, 1982.
102. **Hierholzer K, Schöneshofer M, Siebe H, Tsiakiras D, and Weskamp P.** Corticosteroid metabolism in isolated rat kidney in vitro. I. Formation of lipid soluble metabolites from corticosterone (B) in renal tissue from male rats. *Pflügers Arch* 400: 363-371, 1984.
103. **Hilbrands LB, Artz MA, Wetzels JF, and Koene RA.** Cimetidine improves the reliability of creatinine as a marker of glomerular filtration. *Kidney Int* 40: 1171-1176, 1991.
104. **Hochel J, Lehmann D, Fehrenberg C, Unger V, Groneberg DA, and Grosse-Siestrup C.** Effects of different perfusates on functional parameters of isolated perfused dog kidneys. *Nephrol Dial Transplant* 18: 1748-1754, 2003.
105. **Höcherl K, Gerl M, and Schweda F.** Proteinase-activated receptors 1 and 2 exert opposite effects on renal renin release. *Hypertension* 58: 611-618, 2011.
106. **Hoeltzenbein J.** Die künstliche Niere. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 1969.
107. **Holstein-Rathlou NH.** Synchronization of proximal intratubular pressure oscillations: evidence for interaction between nephrons. *Pflügers Arch* 408: 438-443, 1987.
108. **Holstein-Rathlou NH, and Leyssac PP.** TGF-mediated oscillations in the proximal intratubular pressure: differences between spontaneously hypertensive rats and Wistar-Kyoto rats. *Acta Physiol Scand* 126: 333-339, 1986.
109. **Jacobj C.** Apparat zur Durchblutung isolirter überlebender Organe. *Archiv für Experimentelle Pathologie & Pharmakologie* 26: 388-400, 1890. Heute fortgeführt unter: Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology
110. **Jesinghaus WP.** Zum Einfluß von Cyclosporin A auf die Anpassungshypertrophie nach unilateraler Nephrektomie. Dissertation. Medizinische Hochschule Hannover, 1987.

111. **Johns O.** Oszillierende Sauerstoffpartialdrücke in der Nierenrinde. Ausdruck einer durch den tubuloglomerulären Feedback Mechanismus geregelten Nephronfunktion? Dissertation. Medizinische Hochschule Hannover, 1994.
112. **Johnson V, and Maack T.** Renal extraction, filtration, absorption, and catabolism of growth hormone. *Am J Physiol* 233: F185-F196, 1977.
113. **Kaczmarczyk G, and Reinhardt HW.** Arterial blood gas tensions and acid-base status of Wistar rats during thiopental and halothane anesthesia. *Lab Anim Sci* 25: 184-190, 1975.
114. **Karakashian A, Timmer RT, Klein JD, Gunn RB, Sands JM, and Bagnasco SM.** Cloning and characterization of two new isoforms of the rat kidney urea transporter: UT-A3 and UT-A4. *J Am Soc Nephrol* 10: 230-237, 1999.
115. **Kellner C.** Morphometrische Untersuchungen corticaler Glomerula an Rattennieren zur Bestimmung der glomerulären effektiven hydraulischen Permeabilität. Dissertation. Medizinische Hochschule Hannover, 1986.
116. **Kinter WB, and Pappenheimer JR.** Role of red blood corpuscles in regulation of renal blood flow and glomerular filtration rate. *Am J Physiol* 185: 399-406, 1956.
117. **Kleinzeller A, Malek J, Longmuir I, Kovac L, Cerkasov J, Chaloupka J, Kotyk A, and Burger M.** Manometrische Methoden und ihre Anwendung in der Biologie und Biochemie. VEB Gustav Fischer Verlag Jena (deutsch) & Tschechoslowakischer Verlag für Medizinische Literatur Prag (Original tschechisch), 1965.
118. **Klokkers J.** Atriales natriuretisches Peptid und Stickstoffmonoxid antagonisieren die durch Vasopressin erhöhte Wasserpermeabilität in innermedullären Sammelrohrzellen. Dissertation. FB Biologie, Universität Münster. 2010, p. 1-141.
119. **Kohan DE, Rossi NF, Inscho EW, and Pollock DM.** Regulation of blood pressure and salt homeostasis by endothelin. *Physiol Rev* 91: 1-77, 2011.
120. **Kokko JP, and Rector FC, Jr.** Countercurrent multiplication system without active transport in inner medulla. *Kidney Int* 2: 214-223, 1972.
121. **Koury ST, Bondurant MC, and Koury MJ.** Localization of erythropoietin synthesizing cells in murine kidneys by in situ hybridization. *Blood* 71: 524-527, 1988.
122. **Koury ST, Bondurant MC, Koury MJ, and Semenza GL.** Localization of cells producing erythropoietin in murine liver by in situ hybridization. *Blood* 77: 2497-2503, 1991.
123. **Krause I.** Der Einfluss von Succinat auf die Natriumresorption und den Metabolismus der isoliert perfundierten Rattenniere. Dissertation. Institut für Klinische Physiologie. Freie Universität Berlin. 1984, p. 1-45.
124. **Kriz W.** Structural organization of renal medullary circulation. *Nephron* 31: 290-295, 1982.
125. **Kriz W.** Structural organization of the renal medulla: comparative and functional aspects. *Am J Physiol* 241: R3-16, 1981.
126. **Kuehnle HF, von Dahl K, and Schmidt FH.** Fully enzymatic inulin determination in small volume samples without deproteinization. *Nephron* 62: 104-107, 1992.
127. **Kurtz A, Eckardt KE, Tannahill L, and Bauer C.** Regulation of erythropoietin production. *Contrib Nephrol* 66: 1-16, 1988.
128. **Kurtz A, Götz KH, Hamann M, and Sandner P.** Mode of nitric oxide action on the renal vasculature. *Acta Physiol Scand* 168: 41-45, 2000.
129. **Kurtz A, Schurek HJ, Jelkmann W, Muff R, Lipp HP, Heckmann U, Eckardt KU, Scholz H, Fischer JA, and Bauer C.** Renal mesangium is a target for calcitonin gene-related peptide. *Kidney Int* 36: 222-227, 1989.

130. **Kurtz A, and Schweda F.** Osmolarity-induced renin secretion from kidneys: evidence for readily releasable renin pools. *Am J Physiol Renal Physiol* 290: F797-F805, 2006.
131. **Kurtz L, Schweda F, de Wit C, Kriz W, Witzgall R, Warth R, Sauter A, Kurtz A, and Wagner C.** Lack of connexin 40 causes displacement of renin-producing cells from afferent arterioles to the extraglomerular mesangium. *J Am Soc Nephrol* 18: 1103-1111, 2007.
132. **Lacombe C, Da Silva JL, Bruneval P, Fournier JG, Wendling F, Casadevall N, Camilleri JP, Bariety J, Varet B, and Tambourin P.** Peritubular cells are the site of erythropoietin synthesis in the murine hypoxic kidney. *J Clin Invest* 81: 620-623, 1988.
133. **Landis E, and Pappenheimer JR.** Circulation: Exchange of substances through capillary walls. In: *Handbook of Physiology*, edited by WF H, and P D. Washington D.C.: American Physiological Society, 1963, p. 961-1034.
134. **Landis EM.** The capillary pressure in frog mesentery as determined by micro-injection methods. *Am J Physiol* 75: 548-570, 1926.
135. **Leichtweiss HP, Lübbers DW, Weiss C, Baumgärtl H, and Reschke W.** The oxygen supply of the rat kidney: measurements of intrarenal pO₂. *Pflügers Arch* 309: 328-349, 1969.
136. **Leyssac PP, and Baumbach L.** An oscillating intratubular pressure response to alterations in Henle loop flow in the rat kidney. *Acta Physiol Scand* 117: 415-419, 1983.
137. **Lieberthal W.** Stroma-free hemoglobin: a potential blood substitute. *J Lab Clin Med* 126: 231-232, 1995.
138. **Lieberthal W, Stephens GW, Wolf EF, Rennke HG, Vasilevsky ML, Valeri CR, and Levinsky NG.** Effect of erythrocytes on the function and morphology of the isolated perfused rat kidney. *Ren Physiol* 10: 14-24, 1987.
139. **Lieberthal W, Vasilevsky ML, Valeri CR, and Levinsky NG.** Interactions between ADH and prostaglandins in isolated erythrocyte-perfused rat kidney. *Am J Physiol* 252: F331-F337, 1987.
140. **Lieberthal W, Wolf EF, Merrill EW, Levinsky NG, and Valeri CR.** Hemodynamic effects of different preparations of stroma free hemolysates in the isolated perfused rat kidney. *Life Sci* 41: 2525-2533, 1987.
141. **Lilienfein H.** Die Wirkung des Sauerstoffträgers MP4 auf die Nekrosebildung im Hautlappenmodell an SKH-1/hr haarlosen Mäusen. Dissertation. Ruhr-Universität Bochum, 2011, p. 1-98.
142. **Lindemann B.** Hans Ussing, experiments and models. *J Membr Biol* 184: 203-210, 2001.
143. **Lippman RW.** Mechanism of proteinuria; effect of parenteral bovine albumin injections on hemoglobin excretion in rats. *Am J Physiol* 154: 532-536, 1948.
144. **Lippman RW.** Mechanism of proteinuria; identity of urinary proteins in the rat following parenteral protein injection. *Proc Soc Exp Biol Med* 71: 546-549, 1949.
145. **Little JR, and Cohen JJ.** Effect of albumin concentration on function of isolated perfused rat kidney. *Am J Physiol* 226: 512-517, 1974.
146. **Löbell CE.** De conditionibus quibus secretiones in glandulis perficiuntur. Dissertation. Universität Marburg: 1849.
147. **Lohfert H, Lichtenstein I, Butz M, and Hierholzer K.** Continuous measurement of renal intratubular pressures with a combined pressure transducer microperfusion system. *Pflügers Arch* 327: 191-202, 1971.

148. **Lopez MJ, Wong SK, Kishimoto I, Dubois S, Mach V, Friesen J, Garbers DL, and Beuve A.** Salt-resistant hypertension in mice lacking the guanylyl cyclase-A receptor for atrial natriuretic peptide. *Nature* 378: 65-68, 1995.
149. **Lorenz JN, and Gruenstein E.** A simple, nonradioactive method for evaluating single-nephron filtration rate using FITC-inulin. *Am J Physiol* 276: F172-F177, 1999.
150. **Loutzenhiser R, Horton C, and Epstein M.** Flow-induced errors in estimating perfusion pressure of the isolated rat kidney. *Kidney Int* 22: 693-696, 1982.
151. **Lustenberger N, Schindhelm K, Nordmeyer C, Schurek HJ, and Stolte H.** Renal handling of middle molecules in uremic patients and in the isolated rat kidney. *Artif Organs* 4 Suppl: 110-114, 1981.
- 152a. **Lutz J.** Druckkonstante Perfusion von Teilkreisläufen mittels einer druckgesteuerten Rollenpumpe mit analoger Durchströmungsregistrierung. *Pflügers Arch* 333: 1289, 1972.
- 152b. **Lutz J.** Eine linear-proportional regelbare Dauerinfusionspumpe zur stetig abstufbaren Applikation von Pharmaka. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 275: 24-30, 1972.
153. **Lutz J, and Henrich H.** Gefäßkontraktionen in situ bei druck- und stromkonstanter Perfusion der intestinalen Strombahn und ihre Abhängigkeit vom Ausgangsdruck. *Pflügers Arch* 319: 68-81, 1970.
154. **Maack T.** Physiological evaluation of the isolated perfused rat kidney. *Am J Physiol* 238: F71-F78, 1980.
155. **Maack T.** Renal clearance and isolated kidney perfusion techniques. *Kidney Int* 30: 142-151, 1986.
156. **Maack T.** Renal handling of low molecular weight proteins. *Am J Med* 58: 57-64, 1975.
157. **Maack T, and Kau ST.** Renal handling of parathyroid hormone. *Contrib Nephrol* 20: 103-113, 1980.
158. **Marcus AJ, Broekman MJ, Drosopoulos JH, Islam N, Alyonycheva TN, Safier LB, Hajjar KA, Posnett DN, Schoenborn MA, Schooley KA, Gayle RB, and Maliszewski CR.** The endothelial cell ecto-ADPase responsible for inhibition of platelet function is CD39. *J Clin Invest* 99: 1351-1360, 1997.
159. **Mathar I, Vennekens R, Meissner M, Kees F, Van der Mieren G, Camacho Londono JE, Uhl S, Voets T, Hummel B, van den Bergh A, Herijgers P, Nilius B, Flockerzi V, Schweda F, and Freichel M.** Increased catecholamine secretion contributes to hypertension in TRPM4-deficient mice. *J Clin Invest* 120: 3267-3279, 2010.
160. **Maude DL, Handelsman DG, Babu M, and Gordon EE.** Handling of insulin by the isolated perfused rat kidney. *Am J Physiol* 240: F288-F294, 1981.
161. **Mayes PA, and Felts JM.** Liver function studied by liver perfusion. *Proceedings European Soc. Study of Drug Toxicity.* 7: 16-29, 1966.
162. **Meier W.** Untersuchungen zum Parathormon-Abbau an der isoliert perfundierten Rattenniere. Dissertation. Medizinische Hochschule Hannover: 1981, p. 1-67.
163. **Michels L, and Harvey R.** Effects of perfusate viscosity on the perfused rat kidney. *Microvasc Res* 12: 169-175, 1976.
164. **Miki M, Tamai H, Mino M, Yamamoto Y, and Niki E.** Free-radical chain oxidation of rat red blood cells by molecular oxygen and its inhibition by alpha-tocopherol. *Arch Biochem Biophys* 258: 373-380, 1987.

165. **Miller LL, Bly CG, Watson ML, and Bale WF.** The dominant role of the liver in plasma protein synthesis; a direct study of the isolated perfused rat liver with the aid of lysine-epsilon-C14. *J Exp Med* 94: 431-453, 1951.
166. **Müller-Suur R, Gutsche HU, and Schurek HJ.** Acute and reversible inhibition of tubuloglomerular feedback mediated afferent vasoconstriction by the calcium-antagonist verapamil. *Curr Probl Clin Biochem* 6: 291-298, 1976.
167. **Nagel W, Wolff G, Gigon JP, and Enderlin F.** Zur Bestimmung der Inulin-clearance in Gegenwart von Dextran. *Klin Wochenschr* 45: 137-140, 1967.
168. **Nakane H, Nakane Y, Reach G, Corvol P, and Menard J.** Aldosterone metabolism in isolated perfused rat kidney. *Am J Physiol* 234: E472-E479, 1978.
169. **Nawata CM, Evans KK, Dantzler WH, and Pannabecker TL.** Transepithelial water and urea permeabilities of isolated perfused Munich-Wistar rat inner medullary thin limbs of Henle's loop. *Am J Physiol Renal Physiol* 306: F123-F129, 2014.
170. **Neher E, and Sakmann B.** The patch clamp technique. *Sci Am* 266: 44-51, 1992.
171. **Neher E, and Sakmann B.** Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260: 799-802, 1976.
172. **Neumann KH.** Untersuchungen zur Pathophysiologie der glomerulären Wasserpermeabilität. Habilitationsschrift. Medizinische Hochschule Hannover, 1984.
173. **Neumann KH, Kellner C, Kühn K, Stolte H, and Schurek HJ.** Age-dependent thickening of glomerular basement membrane has no major effect on glomerular hydraulic conductivity. *Nephrol Dial Transplant* 19: 805-811, 2004.
174. **Neumann KH, and Rector FC, Jr.** Mechanism of NaCl and water reabsorption in the proximal convoluted tubule of rat kidney. *J Clin Invest* 58: 1110-1118, 1976.
175. **Neumann KH, Schurek HJ, Kellner C, Kühn K, and Aeikens B.** Effective hydraulic permeability of the glomerular capillary wall in rats after uninephrectomy. *Ren Physiol* 9: 270-278, 1986.
176. **Nishiitsutsuji-Uwo JM, Ross BD, and Krebs HA.** Metabolic activities of the isolated perfused rat kidney. *Biochem J* 103: 852-862, 1967.
177. **Nizet A.** The isolated perfused kidney: possibilities, limitations and results. *Kidney Int* 7: 1-11, 1975.
178. **Nizet A, and Cuypers Y.** [Extraction of two fractions with vasoconstrictor actions on the kidneys by partition of erythrocytes]. *Arch Int Physiol Biochim* 65: 642-647, 1957.
179. **Nizet A, Cuypers Y, Deetjen P, and Kramer K.** Functional capacity of the isolated perfused dog kidney. *Pflügers Arch* 296: 179-195, 1967.
180. **Nizet A, Cuypers Y, Massillon L, and Lambert S.** [Demonstration of factors reducing renal blood flow liberated by erythrocytes]. *Arch Int Physiol Biochim* 65: 568-588, 1957.
181. **Nordsletten DA, Blackett S, Bentley MD, Ritman EL, and Smith NP.** Structural morphology of renal vasculature. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291: H296-H309, 2006.
182. **O'Connor P, Anderson W, Kett M, and Evans R.** Renal preglomerular arterial-venous O₂ -shunting is a structural defence mechanism of the renal cortex. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 33: 637-641, 2006.
183. **Oppermann M, Gess B, Schweda F, and Castrop H.** Atrap deficiency increases arterial blood pressure and plasma volume. *J Am Soc Nephrol* 21: 468-477, 2010.
184. **Pagel H.** Zum glomerulären Mechanismus der renalen Proteinausscheidung. Dissertation. Universität Hannover FB Biologie, 1986, p. 1-106.

185. **Pagel H, and Stolte H.** On the glomerular mechanism of the renal protein excretion. Studies in the isolated perfused rat kidney. *Ren Physiol Biochem* 15: 249-256, 1992.
186. **Pappenheimer JR, and Kinter WB.** Hematocrit ratio of blood within mammalian kidney and its significance for renal hemodynamics. *Am J Physiol* 185: 377-390, 1956.
187. **Pegg DE, and Farrant J.** Vascular resistance and edema in the isolated rabbit kidney perfused with a cell-free solution. *Cryobiology* 6: 200-210, 1969.
188. **Pegg DE, and Green CJ.** Renal preservation by hypothermic perfusion. I. The importance of pressure-control. *Cryobiology* 10: 56-66, 1973.
189. **Pegg DE, and Green CJ.** Renal preservation by hypothermic perfusion. III. The lack of influence of pulsatile flow. *Cryobiology* 13: 161-167, 1976.
190. **Pegg DE, and Green CJ.** Renal preservation by hypothermic perfusion. IV. The use of gelatin polypeptides as the sole colloid. *Cryobiology* 15: 27-34, 1978.
191. **Pegg DE, Green CJ, and Foreman J.** Renal preservation by hypothermic perfusion. II. The influence of oxygenator design and oxygen tension. *Cryobiology* 11: 238-247, 1974.
192. **Persson AEG, Müller-Suur R, and Selen G.** Capillary oncotic pressure as a modifier for tubuloglomerular feedback. *Am J Physiol* 236: F97-102, 1979.
193. **Persson AEG, Schnermann J, and Wright FS.** Modification of feedback influence on glomerular filtration rate by acute isotonic extracellular volume expansion. *Pflügers Arch* 381: 99-105, 1979.
194. **Peters T J.** All about Albumin. Academic Press Elseviers, 1995.
195. **Rabkin R, and Kitabchi AE.** Factors influencing the handling of insulin by the isolated rat kidney. *J Clin Invest* 62: 169-175, 1978.
196. **Radermacher J, Förstermann U, and Frölich JC.** Endothelium-derived relaxing factor influences renal vascular resistance. *Am J Physiol* 259: F9-17, 1990.
197. **Radermacher J, Klanke B, Kastner S, Haake G, Schurek HJ, Stolte HF, and Frölich JC.** Effect of arginine depletion on glomerular and tubular kidney function: studies in isolated perfused rat kidneys. *Am J Physiol* 261: F779-F786, 1991.
198. **Radermacher J, Klanke B, Schurek HJ, Stolte HF, and Frölich JC.** Importance of NO/EDRF for glomerular and tubular function: studies in the isolated perfused rat kidney. *Kidney Int* 41: 1549-1559, 1992.
199. **Rahgozar M, Guan Z, Matthias A, Gobe GC, and 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)* 9: 288-296, 2004.
200. **Reale E, and Luciano L.** The laminae rarae of the glomerular basement membrane. Their manifestation depends on the histochemical and histological techniques. *Contrib Nephrol* 80: 32-40, 1990.
201. **Reale E, Luciano L, and Kühn K.** Cationic dyes reveal proteoglycans on the surface of epithelial and endothelial kidney cells. *Histochemistry* 82: 513-518, 1985.
202. **Reale E, Luciano L, and Kühn K.** The fine structure of the laminae rarae of the glomerular basement membrane in the rat. *Prog Clin Biol Res* 295: 167-172, 1989.

203. **Reale E, Luciano L, and Kühn KW.** Ultrastructural architecture of proteoglycans in the glomerular basement membrane. A cytochemical approach. *J Histochem Cytochem* 31: 662-668, 1983.
204. **Reale E, Luciano L, Kühn KW, and Stolte H.** Morphological and functional aspects of the glomerular basement membrane. *Basic Appl Histochem* 23 Suppl: 5-11, 1979.
205. **Reale E, Luciano L, and Spitznas M.** Histochemical demonstration of hyaluronic acid molecules by alcian blue. *Histochem J* 18: 306-316, 1986.
206. **Reinhardt HW.** Die Rolle des Harnstoffs im Konzentrierungsprozess der Niere. Habilitationsschrift. Bayrische Staatsbibliothek München: 1969.
207. **Repp V.** Untersuchungen zur "repaired defect" Hypothese der glomerulären Kapillarwand. Dissertation. Westfälische Wilhelms Universität Münster, 2015.
208. **Röckel A, Hertel J, Fiegel P, Abdelhamid S, Panitz N, and Walb D.** Permeability and secondary membrane formation of a high flux polysulfone hemofilter. *Kidney Int* 30: 429-432, 1986.
209. **Rosenthal AM, Jones G, Kooh SW, and Fraser D.** 25-hydroxyvitamin D3 metabolism by isolated perfused rat kidney. *Am J Physiol* 239: E12-E20, 1980.
210. **Röskenbleck H, Huhmann W, Gloy U, and Niesel W.** Anwendung eines Dünnschichtdialysators zur Gasäquilibrierung von Perfusionslösungen bei Durchströmungsversuchen an Organen. *Pflügers Arch* 294: 88-90, 1967.
211. **Ross B, Silva P, and Bullock S.** Role of the malate-aspartate shuttle in renal sodium transport in the rat. *Clin Sci (Lond)* 60: 419-426, 1981.
212. **Ross BD.** The isolated perfused rat kidney. *Clin Sci Mol Med Suppl* 55: 513-521, 1978.
213. **Ross BD.** *Perfusion Techniques in Biochemistry.* Oxford: Clarendon Press, 1972.
214. **Ross BD, and Bullock S.** Energy requirements for metabolic and excretory activities of perfused rat kidney. *Curr Probl Clin Biochem* 6: 86-98, 1976.
215. **Ross BD, Bullock S, Frega N, and Leaf A.** Glucose as a fuel in kidney. *Biochem Soc Trans* 6: 524-526, 1978.
216. **Ross BD, Epstein FH, and Leaf A.** Sodium reabsorption in the perfused rat kidney. *Am J Physiol* 225: 1165-1171, 1973.
217. **Sands JM.** Mammalian urea transporters. *Annu Rev Physiol* 65: 543-566, 2003.
218. **Sands JM, and Layton HE.** Advances in understanding the urine-concentrating mechanism. *Annu Rev Physiol* 76: 387-409, 2014.
219. **Sands JM, Timmer RT, and Gunn RB.** Urea transporters in kidney and erythrocytes. *Am J Physiol* 273: F321-F339, 1997.
220. **Schafer AI.** Vascular endothelium: in defense of blood fluidity. *J Clin Invest* 99: 1143-1144, 1997.
221. **Schimassek H.** Perfusion of isolated rat liver with a semi-synthetic medium and control of liver function. *Life Sci* 1: 629-634, 1962.
222. **Schindhelm K, Schlatter E, Schurek HJ, and Stolte H.** The isolated perfused rat kidney and uremic middle molecules. *Contrib Nephrol* 19: 191-200, 1980.
223. **Schindhelm K, Schlatter E, Schurek HJ, and Stolte H.** Renal handling of uremic middle molecules. A study with the isolated perfused rat kidney. *Nephron* 30: 166-172, 1982.
224. **Schlarmann J, Schurek HJ, Neumann KH, and Eckert G.** Chloride-induced increase of plasma potassium after transfusion of erythrocytes in dialysis patients. *Nephron* 37: 240-245, 1984.

225. **Schlatter E.** Metabolismus und Exkretion von Peptidhormonen in der Niere. Untersuchungen an der isoliert perfundierten Rattenniere. Dissertation. Universität Hannover, FB Biologie, 1980.
226. **Schlatter E, Schurek HJ, and Zick R.** Renal handling of homologous and heterologous insulin in the isolated perfused rat kidney. *Pflügers Arch* 393: 227-231, 1982.
227. **Schmid U, Stopper H, Schweda F, Queisser N, and Schupp N.** Angiotensin II induces DNA damage in the kidney. *Cancer Res* 68: 9239-9246, 2008.
228. **Schmidt FH.** Die enzymatische Bestimmung von Glucose und Fructose nebeneinander. *Klin Wochenschr* 39: 1244-1247, 1961.
229. **Schnermann J, Stowe N, Yarimizu S, Magnsussen M, and Tingwald G.** Feedback control of glomerular filtration rate in isolated, blood-perfused dog kidneys. *Am J Physiol* 233: F217-F224, 1977.
230. **Scholz H, Schurek HJ, Eckardt KU, and Bauer C.** Role of erythropoietin in adaptation to hypoxia. *Experientia* 46: 1197-1201, 1990.
231. **Scholz H, Schurek HJ, Eckardt KU, Kurtz A, and Bauer C.** Oxygen-dependent erythropoietin production by the isolated perfused rat kidney. *Pflügers Arch* 418: 228-233, 1991.
232. **Schurek, HJ, Ciarimboli G, Helmchen U.** Orthostatische Proteinurie. Ist es ein intrarenaler Mechanismus? *Kidney & Blood Pressure Research* 22: 228 Abstract A104, 1999.
233. **Schurek H, Pagel H, and Kriz W.** Oxygen deficiency and lipid peroxidation in the isolated perfused rat kidney. In: *Kidney Metabolism and Function*, edited by Dzurik R, Lichardus B, and Guder WG. Mart. Nijhoff Publishing, 1985, p. 135-142.
234. **Schurek H, Pagel H, Thole H, Neumann K, Alt J, Bahlmann J, and Stolte H.** Die "repaired defect" Hypothese der glomerulären Kapillarwand. Untersuchungen an der isoliert perfundierten Rattenniere. *Nieren- und Hochdruckkrankheiten* 15: 368, 1986.
235. **Schurek H, Schwietzer G, Alt J, and Stolte H.** Albumin filtration and effective filtration pressure in cortical nephrons in the isolated perfused rat kidney. *Proc 7th Int Congr Nephrol, Montreal 1978*, Abstract AX4.
236. **Schurek HJ.** Application of the isolated perfused rat kidney in nephrology. *Contrib Nephrol* 19: 176-190, 1980.
237. **Schurek HJ.** Discussion of paper "The glomerular permeability for water and albumin in the isolated perfused rat kidney". *Int J Biochem* 12: 195, 1980.
238. **Schurek HJ.** Mechanisms of glomerular proteinuria and hematuria. *Kidney Int Suppl* 47: S12-S16, 1994.
239. **Schurek HJ.** Physiologische und pathophysiologische Grundlagen der glomerulären Permeabilität für Plasmaproteine. *Verh Dtsch Ges Inn Med* 93: 466-472, 1987.
240. **Schurek HJ.** Untersuchungen zur Pathophysiologie der Niere bei Hypoproteinämie. Habilitationsschrift. Medizinische Hochschule Hannover, 1981.
241. **Schurek HJ, and Alt JM.** Effect of albumin on the function of perfused rat kidney. *Am J Physiol* 240: F569-F576, 1981.
242. **Schurek HJ, Alt JM, and Stolte H.** Micropuncture experiments on albuminuria in the isolated perfused rat kidney. *Kidney Int* 13: 531-532, 1978.
243. **Schurek HJ, Aulbert E, and Ebel H.** The effect of Ca ion antagonist verapamil on ouabain inhibition of renal sodium reabsorption. *Studies in the isolated perfused rat kidney. Curr Probl Clin Biochem* 6: 281-290, 1976.

244. **Schurek HJ, Aulbert E, Ebel H, and Mueller-Suur C.** Influence of ouabain and ethacrynic acid on sodium transport and NaK-ATPase activity in the isolated perfused rat kidney. *Curr Probl Clin Biochem* 4: 162-168, 1975.
245. **Schurek HJ, Brecht JP, and Brandt P.** Na-Reabsorption und O₂-Verbrauch der isoliert perfundierten Rattenniere unter Einwirkung von Ethacrynsäure. VIII. Symposium der Gesellschaft f. Nephrologie, Aachen, 1971. Hrsg. R Heintz. Selbstverlag
246. **Schurek HJ, Brecht JP, Brandt P, Lange K, Kolbe H, and Keller K.** Substrate action on transport and metabolism of the isolated perfused rat kidney. Action of pyruvate, oxaloacetate, butyrate and succinate. In: *Biochemical Aspects of Kidney Function*, edited by M.Hohenegger. Muenchen: Goldmann-Verlag, 1972, p. 110-126.
247. **Schurek HJ, Brecht JP, Lohfert H, and Hierholzer K.** The basic requirements for the function of the isolated cell free perfused rat kidney. *Pflügers Arch* 354: 349-365, 1975.
248. **Schurek HJ, G. S, Alt JM, and Stolte H.** The glomerular permeability for water and albumin in the isolated perfused rat kidney. *Int J Biochem* 12: 195-195, 1980.
249. **Schurek HJ, and Johns O.** Is tubuloglomerular feedback a tool to prevent nephron oxygen deficiency? *Kidney Int* 51: 386-392, 1997.
250. **Schurek HJ, Jost U, Baumgärtl H, Bertram H, and Heckmann U.** Evidence for a preglomerular oxygen diffusion shunt in rat renal cortex. *Am J Physiol* 259: F910-F915, 1990.
251. **Schurek HJ, Jost U, Bertram H, and Baumgärtl H.** Preglomerular cortical oxygen diffusion shunt: a prerequisite for effective erythropoietin regulation? *Contrib Nephrol* 76: 57-64, 1989.
252. **Schurek HJ, Klokckers J, Pavenstädt H, Schlatter E, and Edemir B.** The analysis of aquaporin-2 regulation by means of the isolated perfused rat kidney. *Proceedings of the Deutsche Physiologische Gesellschaft* P100: 232, 2011.
253. **Schurek HJ, and Kriz W.** Morphologic and functional evidence for oxygen deficiency in the isolated perfused rat kidney. *Lab Invest* 53: 145-155, 1985.
254. **Schurek HJ, Lohfert H, and Hierholzer K.** Na-Reabsorption in the isolated perfused rat kidney. Dependency on substrates and Na-load. *Pflügers Arch*, 1970, p. 1285 R1285.
255. **Schurek HJ, and Neumann KH.** Physiologie der Niere. In: *Klinische Nephrologie*, edited by Koch KM. Hannover: Urban & Fischer, München, Jena, 2000, p. 33-71.
256. **Schurek HJ, Neumann KH, Flohr H, Zeh M, and Stolte H.** The physiological and pathophysiological basis of glomerular permeability for plasma proteins and erythrocytes. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 30: 627-633, 1992.
257. **Schurek HJ, Neumann KH, Jesinghaus WP, Aeikens B, and Wonigeit K.** Influence of cyclosporine A on adaptive hypertrophy after unilateral nephrectomy in the rat. *Clin Nephrol* 25 Suppl 1: S144-S147, 1986.
258. **Schurek HJ, Schlatter E, Meier W, Zick R, Dorn G, Hehrmann R, and Stolte H.** Renal handling of polypeptide hormones (insulin, C-peptide, h-PTH) as studied in the isolated perfused rat kidney. *Int J Biochem* 12: 237-242, 1980.
259. **Schweda F, Segerer F, Castrop H, Schnermann J, and Kurtz A.** Blood pressure-dependent inhibition of Renin secretion requires A1 adenosine receptors. *Hypertension* 46: 780-786, 2005.

260. **Schweda F, Wagner C, Kramer BK, Schnermann J, and Kurtz A.** Preserved macula densa-dependent renin secretion in A1 adenosine receptor knockout mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 284: F770-F777, 2003.
261. **Schwietzer G, and Gertz KH.** Changes of hemodynamics and glomerular ultrafiltration in renal hypertension of rats. *Kidney Int* 15: 134-143, 1979.
262. **Seeliger E, Wronski T, Ladwig M, Dobrowolski L, Vogel T, Godes M, Persson PB, and Flemming B.** The renin-angiotensin system and the third mechanism of renal blood flow autoregulation. *Am J Physiol Renal Physiol* 296: F1334-F1345, 2009.
263. **Semenza GL.** Hypoxia-inducible factor 1 and cardiovascular disease. *Annu Rev Physiol* 76: 39-56, 2014.
264. **Semenza GL.** Hypoxia-inducible factor 1: regulator of mitochondrial metabolism and mediator of ischemic preconditioning. *Biochim Biophys Acta* 1813: 1263-1268, 2011.
265. **Semenza GL, Nejfelt MK, Chi SM, and Antonarakis SE.** Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 5680-5684, 1991.
266. **Silva P, Ross BD, Charney AN, Besarab A, and Epstein FH.** Potassium transport by the isolated perfused kidney. *J Clin Invest* 56: 862-869, 1975.
267. **Skutul K.** Über Durchströmungsapparate. *Pflügers Arch* 123: 249-273, 1908.
268. **Smyth DD, Umemura S, and Pettinger WA.** Alpha 1-adrenoceptor blockade and altered renal alpha 2-adrenoceptors: a model (?) for the study of genetically altered alpha 2-adrenoceptors in hypertensive rats. *J Hypertens Suppl* 4: S205-S208, 1986.
269. **Smyth DD, Umemura S, and Pettinger WA.** Alpha 2-adrenoceptor antagonism of vasopressin-induced changes in sodium excretion. *Am J Physiol* 248: F767-F772, 1985.
270. **Smyth DD, Umemura S, and Pettinger WA.** Alpha 2-adrenoceptors and sodium reabsorption in the isolated perfused rat kidney. *Am J Physiol* 247: F680-F685, 1984.
271. **Soldin SJ, Henderson L, and Hill JG.** The effect of bilirubin and ketones on reaction rate methods for the measurement of creatinine. *Clin Biochem* 11: 82-86, 1978.
272. **Solomon R, Silva P, and Epstein FH.** Aldosterone effects on renal function in the isolated perfused rat kidney. *Ren Physiol* 2: 1-11, 1979.
273. **Somers M, Piqueras AI, Strange K, Zeidel ML, Pfaller W, Gawryl M, and Harris HW.** Interactions of ultrapure bovine hemoglobin with renal epithelial cells in vivo and in vitro. *Am J Physiol* 273: F38-F52, 1997.
274. **Sonnenburg-Hatzopoulos C, Assel E, Schurek HJ, and Stolte H.** Glomerular albumin leakage and morphology after neutralization of polyanions. II. Discrepancy of protamine induced albuminuria and fine structure of the glomerular filtration barrier. *J Submicrosc Cytol* 16: 741-751, 1984.
275. **Sonnenburg C.** Darstellung und Funktion von Polyanionen der glomerulären Filtrationsbarriere. Untersuchungen an der in vivo und isoliert perfundierten Rattenniere. Dissertation. Universität Hannover FB Biologie, 1982.
276. **Staib W, Staib R, Herrmann J, and Meiers HG.** Untersuchungen über die Cortisol-Glykoneogenese in der isoliert perfundierten Rattenleber. In: *Stoffwechsel der isoliert perfundierten Leber.* Berlin: Springer-Verlag, Berlin, 1968, p. 155.

277. **Starling EH.** On the Absorption of Fluids from the Connective Tissue Spaces. *J Physiol* 19: 312-326, 1896.
278. **Stegbauer J, Friedrich S, Potthoff SA, Broekmans K, Cortese-Krott MM, Quack I, Rump LC, Koesling D, and Mergia E.** Phosphodiesterase 5 attenuates the vasodilatory response in renovascular hypertension. *PLoS One* 8: e80674, 2013.
279. **Stegbauer J, Vonend O, Habel S, Quack I, Sellin L, Gross V, and Rump LC.** Angiotensin II modulates renal sympathetic neurotransmission through nitric oxide in AT2 receptor knockout mice. *J Hypertens* 23: 1691-1698, 2005.
280. **Stolte H, Alt J, and Schurek HJ.** Experimentelle und klinische Untersuchungen zur Differentialdiagnostik der Proteinurie. *Klin Wochenschr* 57: 1069-1079, 1979.
281. **Stolte H, Alt JM, Baldamus CA, Galaske RG, and Schurek HJ.** Direct assessment of the glomerular sieving coefficient for albumin in the rat kidney. *Kidney Int* 11: 220-220, 1977.
282. **Stolte H, Neumann KH, Reale E, Alt J, and Schurek HJ.** Renal handling of serum proteins as studied by micropuncture techniques. *Contrib Nephrol* 26: 23-30, 1981.
283. **Stolte H, Schurek HJ, and Alt JM.** Glomerular albumin filtration: a comparison of micropuncture studies in the isolated perfused rat kidney with in vivo experimental conditions. *Kidney Int* 16: 377-384, 1979.
284. **Swanson JW, Besarab A, Pomerantz PP, and DeGuzman A.** Effect of erythrocytes and globulin on renal functions of the isolated rat kidney. *Am J Physiol* 241: F139-F150, 1981.
285. **Taft DR.** The isolated perfused rat kidney model: a useful tool for drug discovery and development. *Curr Drug Discov Technol* 1: 97-111, 2004.
286. **Thole H.** Zum Mechanismus der Angiotensin II induzierten Proteinurie. Dissertation. Medizinische Hochschule Hannover, 1988.
287. **Timmer RT, Klein JD, Bagnasco SM, Doran JJ, Verlander JW, Gunn RB, and Sands JM.** Localization of the urea transporter UT-B protein in human and rat erythrocytes and tissues. *Am J Physiol Cell Physiol* 281: C1318-C1325, 2001.
288. **Torelli G, Milla E, Kleinman LI, and Faelli A.** Effect of hypothermia on renal sodium reabsorption. *Pflügers Arch* 342: 219-230, 1973.
289. **Ussing HH, and Zerahn K.** Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. Reprinted from *Acta. Physiol. Scand.* 23: 110-127, 1951. *J Am Soc Nephrol* 10: 2056-2065, 1999.
290. **Venkatachalam MA, Bernard DB, Donohoe JF, and Levinsky NG.** Ischemic damage and repair in the rat proximal tubule: differences among the S₁, S₂, and S₃ segments. *Kidney Int* 14: 31-49, 1978.
291. **Vonend O, Stegbauer J, Sojka J, Habel S, Quack I, Robaye B, Boeynaems JM, and Rump LC.** Noradrenaline and extracellular nucleotide cotransmission involves activation of vasoconstrictive P2X(1,3)- and P2Y6-like receptors in mouse perfused kidney. *Br J Pharmacol* 145: 66-74, 2005.
292. **Wagner C, de Wit C, Kurtz L, Grünberger C, Kurtz A, and Schweda F.** Connexin40 is essential for the pressure control of renin synthesis and secretion. *Circ Res* 100: 556-563, 2007.
293. **Walter R, and Bowman RH.** Mechanism of inactivation of vasopressin and oxytocin by the isolated perfused rat kidney. *Endocrinology* 92: 189-193, 1973.
294. **Weiss C.** Zur Frage der Sauerstoffversorgung der Säugetierniere. Habilitationsschrift. Physiologisches Institut der Universität Hamburg, 1962.

295. **Weiss C, Passow H, and Rothstein A.** Autoregulation of flow in isolated rat kidney in the absence of red cells. *Am J Physiol* 196: 1115-1118, 1959.
296. **Wesslau C, Jung K, and Schirrow R.** Vergleich von Inulin- und Kreatininclearance-Bestimmungen bei narkotisierten und wachen Ratten. *Z Urol Nephrol* 81: 395-400, 1988.
297. **Wetzels JF, Huysmans FT, and Koene RA.** Creatinine as a marker of glomerular filtration rate. *Neth J Med* 33: 144-153, 1988.
298. **Willinger CC, Schramek H, Pfaller K, Joannidis M, Deetjen P, and Pfaller W.** Ultrapure polymerized bovine hemoglobin improves structural and functional integrity of the isolated perfused rat kidney. *Ren Physiol Biochem* 18: 288-305, 1995.
299. **Willinger CC, Schramek H, Pfaller K, Pfaller W, and Deetjen P.** Ultrapure polymerized bovine hemoglobin (UPPBHb) improves integrity of the isolated perfused rat kidney (IPRK): effects on function and structure. *Clin Nephrol* 44: 32-43, 1995.
300. **Windhager EE, Lewy JE, and Spitzer A.** Intrarenal control of proximal tubular reabsorption of sodium and water. *Nephron* 6: 247-259, 1969.
301. **Wollenberger A, Ristau O, and Schoffa G.** Eine einfache Technik der extrem schnellen Abkühlung größerer Gewebestücke. *Pflügers Arch* 270: 399-412, 1960.
302. **Wruck G.** Zur Konversion von Thyroxin zu Trijodthyronin an der isoliert perfundierten Rattenniere. Dissertation. Medizinische Hochschule Hannover: 1986, p. 1-44.
303. **Wusteman MC.** Comparison of colloids for use in isolated normothermic perfusion of rabbit kidneys. *J Surg Res* 25: 54-60, 1978.
304. **Yamamoto Y, Niki E, Kamiya Y, Miki M, Tamai H, and Mino M.** Free radical chain oxidation and hemolysis of erythrocytes by molecular oxygen and their inhibition by vitamin E. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 32: 475-479, 1986.
305. **Zeh M.** Zur glomerulären Permeabilität geladener und ungeladener Makromoleküle. Dissertation. Medizinische Hochschule Hannover: 1994, p. 1-90.

Laborhandbuch Nierenperfusion

Hans-Joachim Schurek

Die beste und normale Funktion hat ein Organ wie die Niere nur im gesunden Organismus. Sobald man die Niere experimentell isoliert, muss man die richtige Balance finden zwischen Fragestellung, der dazu passenden Variante des experimentellen Modells und der Antwort, die man von diesem Experiment erwarten kann. Eine isolierte Niere ist eine „sterbende Niere“, auch wenn man über 1-4 h eine Funktion aufrechterhalten kann, je nach Definition und den Ansprüchen an eine normale Funktion. Der Grund für die Begrenzung der Überlebensfähigkeit eines isolierten Organs mag in der Übergangsphase liegen zwischen der in vivo Vollblutperfusion zu der Perfusion mit einer mehr oder weniger künstlichen Perfusionslösung als Blutersatz: Blut ist als „flüssiges Organ“ eine hochkomplexe Mischung die permanent rekonditioniert wird durch eine Reihe von Organen und wenn wir an diese phantastischen Eigenschaften herankommen wollen, dann sollten wir ein Organ wie die Niere besser im Organismus belassen. Goethe lässt im Drama Faust I, Studierzimmer II Mephisto sagen: „Blut ist ein ganz besonderer Saft“.

