Medizinische Fakultät

der

Universität Duisburg-Essen

Aus dem Institut für Physiologie

Optimierung der Nierenqualität durch den Einsatz von künstlichen Sauerstoffträgern in der isolierten normothermen Perfusion

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades der Medizin

durch die Medizinische Fakultät

der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von

Nina Küpers aus Gelsenkirchen

2020

DuEPublico
Duisburg-Essen Publications online

UNIVERSITÄT DUISBURG ESSEN
Offen im Denken

ub | universitäts bibliothek

Diese Dissertation wird via DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

DOI: 10.17185/duepublico/73891
URN: urn:nbn:de:hbz:464-20220106-141603-0

Alle Rechte vorbehalten.

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer
1. Gutachter: Frau Prof. Dr. rer. nat. K. Ferenz
2. Gutachter: Herr Univ.-Prof. Dr. med. B. Wilde

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Dezember 2020

Publikation:

Die Ergebnisse dieser Studie sollen zusammen mit weiterführenden Arbeiten zur Erstellung einer Publikation verwendet werden.

Posterpräsentation:

Küpers N, Kirsch M und Ferenz KB. The beneficial effect of albumin-derived, perfluorodecalin-based artificial oxygen carriers on the perfusion of an ischemic isolated rat kidney. 98th meeting of the German Physiological Society. Joint Meeting with the Austrian Physiological Society and Life Science Switzerland Physiology, Ulm, Germany 30.09.-02.10.2019

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel

„Optimierung der Nierenqualität durch den Einsatz von künstlichen Sauerstoffträgern in der isolierten normothermen Perfusion“

selbständig verfasst und keine anderen Quellen und Hilfsmittel als die angegebenen benutzt habe.
Die Stellen der Arbeit sowie evtl. beigefügte Abbildungen, Zeichnungen oder Grafiken, die anderen Werken den Worten oder Sinn nach entnommen wurden, habe ich unter Angabe der Quelle kenntlich gemacht.
Die Arbeit ist noch nicht an anderer Stelle als Prüfungsleistung vorgelegt worden.

Herten, den 02.06.2020 _____

Nina Küpers

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung....8

1.1 Nierentransplantation....8
1.1.1 Geschichte der Nierentransplantation....8
1.1.2 Grundlagen....9
1.1.2.1 Anatomische, biochemische und physiologische Grundlagen....9
1.1.2.2 Ischämische Zellschädigung....11
1.1.2.3 Reperfusionsschaden....11
1.1.3 Aktuelle Problematik der Nierentransplantation....12
1.1.4 Aktueller Forschungsstand....13
1.2 Künstliche Sauerstoffträger in der Organperfusion....15

2 Fragestellung....17

3 Material und Methoden....18

3.1 Material....18
3.2 Methoden....25
3.2.1 Experimentelles Modell....25
3.2.1.1 Versuchstiere....25
3.2.1.2 Narkose und Tötung....25
3.2.1.3 Operationstechnik....26
3.2.1.4 Organentnahme....27
3.2.1.5 Aufbau des Ex-Vivo-Perfusionssystems....29
3.2.1.6 Perfusionsmedium....31
3.2.1.7 Versuchsgruppen....33
3.2.1.8 Versuchsvorbereitung....34
3.2.1.9 Versuchsablauf....34
3.2.2 Untersuchungsparameter....35
3.2.2.1 Perfusionsflussrate....35
3.2.2.2 pH-Wert....36

3.2.2.3 Urinflussrate....36
3.2.2.4 Cytochromspektren....36
3.2.2.5 Osmolarität....37
3.2.2.6 Sauerstoffsättigung und Sauerstoffverbrauch....37
3.2.2.7 Inulin-Clearance/GlomeruläreFiltrationsrate (GFR)....37
3.2.2.8 Elektrolyte/Fraktionelle Exkretion von Na+/K+/Glukose....39
3.2.2.9 Histologische und immunhistochemische Untersuchungen....40
3.2.2.9.1 Histologie....40
3.2.2.9.2 Immunhistochemie....41
3.2.2.9.3 Enzymatische Bestimmung der DNA-Fragmentation....41
3.2.3 Statistische Auswertung....42

4 Ergebnisse....43

4.1 Vorversuche....43
4.2 Normotherme isolierte Perfusion nach 120 min Ischämie....43
4.2.1 Perfusionsflussrate....43
4.2.2 pH-Wert....46
4.2.3 Urinflussrate....48
4.2.4 Cytochromspektren....49
4.2.5 Osmolarität....51
4.2.6 Sauerstoffsättigung des Perfusats und Sauerstoffverbrauch der Niere....53
4.2.7 Glomeruläre Filtrationsrate....56
4.2.8 Elektrolyte/Fraktionelle Exkretion von Na+-/K+/Glukose....58
4.2.8.1 Natrium....58
4.2.8.2 Kalium....60
4.2.8.3 Glukose....62
4.2.9 Histologische und immunhistochemische Auswertung....64
4.2.9.1 Histologie....64
4.2.9.2 Immunhistochemie....69
4.2.9.3 Enzymatische Bestimmung der DNA-Fragmentation....73

5 Diskussion.....75

6 Zusammenfassung.....90

7 Literaturverzeichnis.....91

8 Abbildungsverzeichnis.....100

9 Tabellenverzeichnis.....101

10 Abkürzungsverzeichnis.....102

11 Danksagung.....103

12 Lebenslauf.....104

1 Einleitung

1.1 Nierentransplantation

1.1.1 Geschichte der Nierentransplantation

Als Pionier der Transplantationsforschung gilt Alexis Carrel, der 1912 für seine Ergebnisse in der gefäßchirurgischen Forschung den Nobelpreis erhielt. Die ersten technisch erfolgreichen Nierentransplantationen im Tierversuch erfolgten unter Leitung von Emmerich Ullmann, welcher 1902 eine Hunde-Autotransplantation und eine Hunde-Ziegen-Xenotransplantation durchführte.
Die erste Mensch-zu-Mensch-Nierentransplantation erfolgte 1933 durch Yu Yu Voronoy unter Blutgruppenunstimmigkeit und über sechs Stunden nach dem Tod des Spenders, weshalb dieses Vorhaben ebenfalls erfolglos blieb. Es folgten Jahre der Forschung, um den Transplantationserfolg zu verbessern und die Abstoßungsreaktionen zu unterdrücken. Zahlreiche Forscher, wie Morton Simonsen, David Hume, Peter Medawar, Ray Owen und Rupert Billingham beschäftigten sich mit dieser Problematik. Die erste erfolgreiche Nierentransplantation wurde 1954 in Boston von Dr. Joseph Murray zwischen eineiigen Zwillingen durchgeführt. 1985, zwei Jahre nach der Entdeckung von Cyclosporin als Immunsuppressivum, erzielte das Team von Murray einen Durchbruch, indem es eine erfolgreiche Transplantation zwischen zweieiigen Zwillingen durchführen konnte.
Bis heute laufen zahlreiche Studien, um die Organverträglichkeit und Operationstechnik zu verbessern. (Barker et al., 2013; Watson et al., 2012)

1.1.2 Grundlagen

1.1.2.1 Anatomische, biochemische und physiologische Grundlagen

Die Niere ist ein paarig angelegtes Organ, das zahlreiche Aufgaben im Körper übernimmt. Sie ist wichtig für die Ausscheidung harnpflichtiger Substanzen, für eine funktionierende Blutdruck- sowie pH-Regulation und für eine Kontrolle des Wasserhaushaltes.
Anatomisch ist die Niere gekennzeichnet durch ein weit verzweigtes Gefäßnetz, welches über die *Arteria renalis* aus der Aorta gespeist wird. Die Arteriolen laufen schließlich über das *Vas afferens* in der kleinsten funktionellen Einheit der Niere, dem Glomerulus, zusammen. Hier erfolgt die Filtration des Primärharns über ein mehrschichtiges Filtersystem, abhängig vom hydrostatischen Druck. Als erste Filterstation fungiert das fenestrierte Endothel, welches zunächst lediglich alle zellulären Bestandteile zurückhält. Diese fließen mit einem geringen flüssigen Anteil über das *Vas efferens* und die *Vena cava* in den Blutkreislauf zurück. Anschließend folgt die negativ geladene Basalmembran, die anionen- aber nicht kationenpermeabel ist. Als letzte Barriere müssen Moleküle, die filtriert werden sollen, das viszerale Blatt der Bowman-Kapsel überwinden. Hier umschlingen die Fortsätze der Podozyten die Glomeruluskapillare und weitere sekundäre Fortsätze verzahnen sich miteinander. Dadurch werden kleine Spalträume gebildet, die nur von Molekülen passiert werden können, die kleiner als 70kDa sind.
Überwinden Moleküle den Filter des Glomerulus gelangen sie in das Tubulussystem der Niere. Im proximalen Tubulus erfolgt ein Großteil der sehr energieaufwändigen Rückresorption. Die Zellen sind hier nicht fähig zur anaeroben Glykolyse und somit abhängig von Sauerstoff. Die distalen Zellen bedienen sich dahingegen vorwiegend der glukoseabhängigen anaeroben Glykolyse, da durch die schlechte Durchblutung des Nierenmarks wenig Sauerstoff zu diesen Zellen gelangt und diese angepasst an die Gegebenheiten auch nur wenige Mitochondrien besitzen. Die Rückresorption erfolgt in den meisten Fällen über eine selektiv permeable Membran sekundär-aktiv entlang eines durch die Na^+/K^+-ATPase primär-aktiv erzeugten Na^+-Gradienten. (ATP-Adenosintriphosphat) Durch die Lokalisation der Carrier-Proteine auf der apikalen Seite der Membran wird verhindert, dass Elektrolyte vom Blut in den Primärharn strömen und so verloren gehen. Durch den entstanden Na^+-Gradienten kann außerdem über den osmotischen Druck und

folgenden Wasserstrom, den dieser Gradient mit sich bringt, ein Einstrom von Ionen in die Blutkapillaren bewirkt werden. Die Osmolarität des Blutes ist der Antrieb des Gegenstromprinzips, das im absteigenden Teil des Nephrons somit dazu führt, dass Substanzen wie Glukose dem Körper nicht über den Urin abhanden kommen. Zur pH-Regulation erfolgt die H^+-Sekretion über Na^+/H^+-Antiporter sekundär-aktiv, über eine primär-aktive H^+-ATPase im proximalen Tubulus, über den Na^+/H^+-Antiporter im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife, sowie über die H^+/K^+-ATPase und die H^+-ATPase im Verbindungsstück und Sammelrohr. Für jedes sezernierte H^+ bleibt ein OH^- in der Zelle zurück, welches katalysiert durch die Carboanhydrase II mit CO_2 zu HCO_3^- reagiert, welches wiederum entweder über den Natrium-Bicarbonat-Carrier oder über den Anion Exchanger 1 basolateral in das Blut sezerniert wird. Im Blut wird es von den Erythrozyten aufgenommen und über die Carboanhydrase I wieder in CO_2 und H_2O umgewandelt.
Die ins Lumen transportierten H^+ reagieren mit dem vorhandenen HCO_3^- über die Carboanhydrase IV in der luminalen Bürstensaummembran zu H_2O und CO_2.
Das fettlösliche CO_2 diffundiert über die Zellmembran zurück in die proximale Tubuluszelle, wo es dann der Carboanhydrase II wieder zur Verfügung steht (HCO_3^--Rückresorption). Der pH-Wert kann auch über eine Protonenausscheidung in Form von $H_2PO_4^{2-}$ reguliert werden. Wird Phosphat ($HPO4^-$) in den oberen Abschnitten des proximalen Tubulus nicht durch den Na^+/Phosphat Symporter sekundär-aktiv rückresorbiert, bindet es weiter an H^+. Ebenfalls eine Rolle in der pH-Regulation spielt die Verstoffwechslung von Ammoniak. Bei HCO_3^--Mangel wird Ammoniak nicht als Harnstoff fixiert, sondern gelangt vermehrt in Form von Glutamin in die proximalen Tubuluszellen, wo es durch die jetzt sehr aktive Glutaminase zu 2-Oxoglutarat und NH_4^+ gespalten wird. Von dort wird es als NH_4^+ oder NH_3 in das Lumen transportiert, teilweise wieder rückresorbiert und schließlich in das Sammelrohr sezerniert. Das NH_4^+ liefert dahingehend einen Beitrag zur H^+-Ausscheidung, dass für jedes ausgeschiedene NH_4^+ ein HCO_3^-, welches zur Harnstoffsynthese benötigt würde, eingespart wird. (Silbernagel et al., 2005)

1.1.2.2 Ischämische Zellschädigung

Die ischämische Zellschädigung resultiert größtenteils aus der Unterversorgung sauerstoffabhängiger Zellen, wie z.B. den renalen Tubuluszellen. Das verminderte oder fehlende Angebot an Sauerstoff führt zu einem Abfall der oxidativen Phosphorylierung. Durch diese verringerte Energieproduktion kommt es zu zahlreichen teilweise eng miteinander verknüpften Veränderungen in und um die Zelle, wie der Aktivierung von Hydrolasen und der Steigerung der Zellpermeabilität. Es kommt zu einem Abfall des intrazellulären pH-Werts, einerseits direkt bedingt durch den Abbau von ATP, andererseits durch die Freisetzung von H^+ durch zerstörte Lysosomen und die erhöhte anaerobe Glykolyse mit Anfall von Laktat. Eine erhöhte Aktivität der Na^+/K^+-ATPase und des Na^+/Ca^+-Antiporters, pH-Regulationsprozesse und eine erhöhte Permeabilität führen zu einer Störung der Ionen-Homöostase in Form einer Erhöhung des intrazellulären Natriums und Calciums. Die erhöhte zytosolische Calciumkonzentration kann wiederum Aktivator für Hydrolasen und Proteasen sein, welche den Schädigungsprozess durch Zersetzung ihrer Substrate voran treiben. Die erhöhte zytosolische Natriumkonzentration kann zur osmotischen Schwellung und zur Ruptur der Plasmamembran führen. Die erhöhte Permeabilität der Plasmamembran, welche zu einem weiteren Verlust von ATP führt, hängt mit dem Verlust des Membranpotentials und der erhöhten cytosolischen Calciumkonzentration zusammen.
All diese Vorgänge und Veränderungen führen zum nekrotischen Untergang des Gewebe, welcher durch die aktuell übliche Kaltlagerung der zur Transplantation bestimmten Organe nach aktuellen Studien zwar verlangsamt, aber noch nicht verhindert werden kann.
(Buja, 2005; de Groot et al., 2007; Hossmann, 2006; Weinberg, 1991; Zweier et al., 2006)

1.1.2.3 Reperfusionsschaden

Während der Ischämiezeit besteht durch den Stillstand der Durchblutung ein Sauerstoffdefizit und ein Substratmangel, was zu einem Anstieg der oxidativen Phosporylierung, der Akkumulation von Abbauprodukten, sowie einer Erschöpfung des verfügbaren ATP führt. Durch den erniedrigten pH-Wert können schädigende Prozesse in der Ischämiephase noch nicht in vollem Maße ablaufen. Kommt es jedoch im Rahmen der Reperfusion zur Normalisierung des pH-Werts führt dies über den Wiederaufbau des

Protonengradienten zu einem starken Einstrom von Natrium und Wasser. Der intrazellulär steigende Natrium-Wert führt wiederum zu einem Calcium-Einstrom, welcher zu einem weiteren Permeabilitätsanstieg der Mitochondrienmembran und zur Ausschüttung von Cytochrom c und weiteren Enzymen führt.
Durch die mit der Reperfusion plötzlich einsetzende Reoxygenierung kann es durch die ischämische Schädigung der elektronenübertragenden Enzyme der Atmungskette zur Entstehung sogenannter reaktiver Sauerstoffradikale kommen. Diese entstehen durch die Reaktion von Ubiquinon mit elementarem Sauerstoff. Das entstehende Superoxid kann zu Wasserstoffperoxid oder Hydroxylradikalen weiter reagieren.
Die reaktiven Sauerstoffradikale führen zur Oxidation von Lipiden in der Zellmembran. (de Groot et al., 2007; Kosieradzki et al., 2008)

1.1.3 Aktuelle Problematik der Nierentransplantation

Die Problematik der Organqualität und -verfügbarkeit in der Nierentransplantation ist allgegenwärtig. Der große Mangel an Spenderorganen begrenzt die Zahl der erfolgreichen Transplantationen stark, denn die erfolgversprechende Methode der Nierentransplantation steht somit nur wenigen Patienten zur Verfügung. (Bathini et al., 2013)
Im Vergleich zum Jahr 2011, wo noch 2850 Nierentransplantationen durchgeführt wurden, lag diese Zahl 2019 nur noch bei 2132. Dieser Zahl stehen 11827 Patienten gegenüber, die in Deutschland auf der Warteliste stehen. Somit ist die Zahl der Patienten auf der Warteliste mehr als fünf mal so hoch, wie die Anzahl der pro Jahr transplantierten Nieren. Mit 2799 Neuanmeldungen 2019 gab es in diesem Jahr ebenso mehr Neuanmeldungen als Nierentransplantationen. (Deutsche Stiftung Organtransplantation, 2019)
Hinzu kommt, dass sich die Spendenbereitschaft in einem starken Abwärtstrend befindet. Dies führt dazu, dass jedes Jahr hunderte Patienten auf der Warteliste versterben. Diese Faktenlage verdeutlicht die Notwendigkeit der Verbesserung der Organverfügbarkeit. Durch den großen Bedarf an Transplantaten wird es immer wichtiger auch Nieren mit schlechter Qualität, sogenannte marginale Organe, zu transplantieren. Darunter fallen Organe von “Erweiterte-Kriterien-Spendern” (z.B. Alte Spender oder Spender mit Bluthochdruck) und von Spendern, die an Herz-Kreislauf-Stillstand starben. Die Verwendung dieser Organe bringt einerseits die Problematik mit sich, dass diese Organe

vermehrt erst verspätet funktionieren, und andererseits die Verwendung von Organen von an Herz-Kreislauf-Stillstand gestorbenen Spendern durch die in Deutschland gesetzlich erforderliche Hirntoddiagnostik ("Bekanntmachungen: Richtlinien zur Organtransplantation gemäß § 16 TPG," 2004) zu einer verlängerten Ischämiezeit von mindestens 3h führt. (Jochmans et al., 2015; Kaiser et al., 2014; Tomita et al., 2017) Deswegen steht die Verbesserung der Organqualität mittels optimierter Lagerung bzw. Regeneration im Mittelpunkt der Transplantationsforschung, denn durch die aktuell durchgeführten Lagerungsverfahren kommt es vor allem bei Verwendung marginaler Organe zu gehäuften Fällen ausbleibender oder verspäteter Organfunktion. (Hosgood et al., 2011b; Singh et al., 2011)

1.1.4 Aktueller Forschungsstand

Die derzeit in Deutschland übliche Methode ist die Kaltlagerung des blutleer gespülten Organs bei 4° C. Durch die Hypothermie können die Stoffwechselvorgänge im Organ bis auf ein Minimum reduziert werden. Dies hat den Vorteil des verringerten ATP-Verbrauchs und einer verminderten Produktion von Sauerstoffradikalen. (Lam et al., 2013)
Eine Alternative zur hypothermen statischen Lagerung bieten die perfusionsbasierten Verfahren, welche unter anderem einen Abtransport toxischer Substanzen ermöglichen, aber auch die Möglichkeit zur Qualitätstestung und Organ-Präkonditionierung vor der geplanten Transplantation bieten. (Hosgood et al., 2011a, 2014a; Sharif et al., 2013).
Nach aktuellen Studien kann die Qualität der marginalen Organe mit schon möglichen perfusionsbasierten Methoden bereits verbessert werden, allerdings noch nicht in dem Maße, dem es bedürfe, um eine für den klinischen Einsatz zufriedenstellende Qualität zu sichern. (Hamar et al., 2018; Kaths et al., 2018; Lyon, 2015)
Zu den perfusionsbasierten Verfahren zählt auch die hypotherme Perfusion, bei welcher das Organ extrakorporal perfundiert und auf 4°C gekühlt wird. (Jochmans et al., 2015; Lam et al., 2013). Ein weiteres Verfahren ist die pseudonormotherme Perfusion, die sich von der hypothermen Perfusion grundlegend durch die Temperatur von 20-35°C unterscheidet. (Hosgood et al., 2011a) Durch die pseudonormotherme Temperatur kann der Stoffwechsel unter Zusatz von Sauerstoffträgern und Energiesubstraten aufrecht erhalten werden, was eine eingeschränkte Regeneration ermöglicht. (Hosgood et al., 2011b, 2014b)

Häufig erfolgt die Bereitstellung von Sauerstoff über den Zusatz von Blut. (Hosgood et al., 2013) Es wurden allerdings auch schon künstliche Sauerstoffträger auf Perfluorcarbon- oder Hämoglobin-Basis getestet. (Hosgood et al., 2012; Hosgood et al., 2011b).
Des Weiteren können durch die (pseudo-)normotherme Perfusion hypothermie-bedingte Schädigungen, wie eine vermehrte Vasokonstriktion oder Schädigung der Endothelzellen, vermieden werden. (Kay et al., 2011) Außerdem gibt es die Möglichkeit der regionalen normothermen Perfusion, welche vor Entnahme des Organs mit extrakorporal oxygeniertem und mit Energiesubstraten versetztem Blut erfolgt. Dies bedeutet aber, dass ein Transport des Organs unter Perfusion praktisch nicht möglich ist. In Deutschland wäre diese Methode nur durchführbar, wenn vor der Explantation der Hirntod festgestellt würde. (Morrissey et al., 2014) Eine weitere Methode ist die normotherme extrakorporale Perfusion, bei der ebenfalls Sauerstoffträger und Energiesubstrate benötigt werden. (Kaminski et al., 2019; Kay et al., 2011; Mann et al., 2009; Thuillier et al., 2019)
Sie bietet ebenso die Möglichkeit den Stoffwechsel aufrecht zu erhalten und die Ischämiezeit zu verkürzen. (Hosgood et al., 2013) Des Weiteren können in der isolierten extrakorporalen Perfusion schnell und einfach einzelne Parameter kontrolliert und beeinflusst werden. (Maack, 1980) Studien zeigten, dass mit blutbasierter Perfusionslösung eine normotherme Perfusion bis zu acht Stunden unter physiologischer Flussrate ermöglicht werden kann. (Kaths, Echeverri, Goldaracena, et al., 2016)
Bei der Verwendung blutfreier Perfusionslösungen ist eine Perfusion unter physiologischen Funktionsparametern bisher nur für zwei Stunden möglich. (Jia et al., 2013)
Eine Perfusion über zwei Stunden ist bisweilen nur unter massiver Steigerung der Flussrate möglich, was wiederum Organschäden mit sich bringt. (Maack, 1980)

1.2 Künstliche Sauerstoffträger in der Organperfusion

Der Einsatz künstlicher Sauerstoffträger ist mit der Suche nach einer optimierten Lagerungs- und Regenerationsmöglichkeit potentieller Spenderorgange mehr denn je in den Fokus der Forschung gerückt. Ohne den Zusatz von Sauerstoffträgern kommt es während einer Perfusion, vor allem im äußeren Nierenmark, zwangsläufig zu Sauerstoffmangelschäden. (H. J. Schurek et al., 1985)
Allen voran fungierte in den Versuchen Blut als Sauerstoffträger. Hierbei konnten durch Kaths et al. bereits Erfolge erzielt werden, indem gezeigt werden konnte, dass eine kontinuierliche normotherme Perfusion mit Blut der kurzen Perfusion gefolgt von Kaltlagerung überlegen ist. (Kaths, Cen, et al., 2016)
Es werden außerdem Hämoglobin-basierte Lösungen als Sauerstoffträger erforscht. (Habler et al., 2005; Scholer et al., 2010) Komplikationen ergaben sich vermutlich durch Diffusion ins Gewebe oder durch Zerfall des Hämoglobins in Dimere, welche die Nierentubuli verstopfen und zum Nierenversagen führen können. (Buehler et al., 2010)
Eine aktuell untersuchte hämoglobinbasierte Variante ist das Wattwurmhämoglobin, welches in Form von „Hemo2life“ als vielversprechender Sauerstoffträger gehandelt wird. (Jani et al., 2017; Mallet et al., 2014)
Da außerhalb eines Erythrozyten die 2,3-Bisphosphoglycerat-Konzetrationen zu gering sind, um die Sauerstoffaffinität zu senken, wirkt freies Hämoglobin statt als Sauerstofftransporter als Sauerstoffspeicher. (Centis et al., 2009)
Eine weitere Variante ist die Verwendung von Perfluorcarbonen als Sauerstoffträger, auf welche auch in dieser Arbeit zurückgegriffen wurde. (Hosgood et al., 2010)
Da bisher noch kein solcher Durchbruch erzielt werden konnte, so dass es ein Präparat in Deutschland in den klinischen Gebrauch geschafft hätte, werden weiterhin neue Stoffe erforscht, bzw. optimiert. Unter anderem wird daran gearbeitet durch Einkapselung eine Dissoziation zu verhindern. (Centis et al., 2009) Perfluorcarbone sind synthetisch hergestellte Kohlenwasserstoffverbindungen, deren Kohlenwasserstoffatome vollständig durch Fluor ersetzt wurden. Durch die chemischen Eigenschaften des Fluors (höchste Elektronegativität) sind Perfluorcarbone weder lipo- noch hydrophil und somit chemisch inert und biokompatibel. (Krafft, 2001) Daher sind sie mit wässrigen Lösungen aber auch nicht mischbar und müssen z.B. als Emulsionen verabreicht werden. Sie können Sauerstoff und auch andere Gase wie Kohlenstoffdioxid abhängig vom Partialdruck lösen. Wichtig

bei der Verwendung von Sauerstoffträgern, die auf Perfluorcarbon basieren, ist die Abhängigkeit des Sauerstoffpartialdrucks (pO_2), denn je höher der pO_2 liegt, desto höher ist die Sättigung der Sauerstoffträger. (Leland et al., 1966; Riess, 2005) Einige Perfluorcarbone, zum Beispiel in Form von Oxygent oder Oxycite (Castro et al., 2010) wurden bereits in klinischen Studien erprobt. Die meisten Studien wurden jedoch auf Grund von Problemen mit der Finanzierung oder mangelnder Patienteneinschlussquoten abgebrochen oder brachten auf Grund auftretender Komplikationen, wie Stabilitätsproblemen oder zu langen Organretentionszeiten, keine erfolgreichen Ergebnisse hervor. Lediglich Perftoran ist in Russland, Kasachstan, Kirgistan, Mexiko und der Ukraine bereits zugelassen und findet Verwendung in der Behandlung akuter Blutverluste und der Oxygenierung spezifischer Gewebe. (Ferenz, 2015) Auf Grund geringer Haltbarkeit und sehr langer Organretentionszeiten von 90 Tagen ist Perftoran jedoch trotz seltener Nebenwirkungen weder in Europa noch in den USA zugelassen. (Castro et al., 2010)
Bei den im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten künstlichen Sauerstoffträgern handelt es sich nicht um Perfluorcarbonemulsionen, sondern um Perfluorcarbonkapseln.
Vorteil dieser Einkapselung ist z.B. die erhöhte Lagerungsstabilität.
Als Kapselwandmaterial wird das Biopolymer Albumin verwendet.
Albumin als Kapselmaterial ist dadurch interessant, dass es auf Grund seines natürlichen Vorkommens zu keinerlei toxischer oder inflammatorischer Reaktion kommt und biologische Abbauprodukte des Albumins zu keiner Schädigung führen. Aufgrund der Amphiphilie des Albuminmoleküls kann auch auf den Einsatz meist toxischer Emulgatoren vollständig verzichtet werden, die u.a. für Nebenwirkungen der Perfluorcarbonemulsionen mitverantwortlich sind.
Albuminkapseln mit anderen Inhaltsstoffen sind in verschiedenen medizinischen Einsatzgebieten, wie der Applikation von Arzneimitteln oder der Immuntherapie, bereits im klinischen Einsatz etabliert. (Elzoghby et al., 2012; Neuberger T., 2005)
Die Versuchsprotokolle dieser Arbeit wurden auf Studien aufgebaut, die bereits Erfolge in der isolierten Perfusion und eine fortschrittliche Entwicklung der künstlichen Sauerstoffträger zeigen konnten. (Hosgood et al., 2011a; Kaths, Cen, et al., 2016; Kaths, Echeverri, Chun, et al., 2016; Wrobeln, Schlueter, et al., 2017) Die Anfänge in der isoliert perfundierten Rattenniere machten dabei 1959 Weiss et al. (Weiss et al., 1959)

Die in dieser Arbeit verwendeten auf Perfluordecalin basierenden Albuminkapseln (Albumin-derived, perfluorodecalin-based artificial oxygen carriers - APOCs) zeigten im Tiermodell (Ratte) eine gute Verträglichkeit (Wrobeln, Laudien, et al., 2017) und schützen das isoliert perfundierte Rattenherz unter massiver Ischämie (Wrobeln, Schlueter, et al., 2017).

2 Fragestellung

Um den Pool an nutzbaren Transplantaten zu vergrößern und dadurch mehr Patienten eine Nierentransplantation zu ermöglichen, ist langfristig eine Alternative zur statisch hypothermen Lagerung der Organe nötig, die die Regeneration ischämisch oder anderweitig geschädigter Nieren ermöglicht.
In der vorliegenden Arbeit wurde im Tiermodell (Ratte) untersucht, ob eine ischämisch geschädigte Niere blutfrei isoliert normotherm ohne weitergehenden Qualitätsverlust perfundiert oder sogar regeneriert werden kann (Modell der isoliert perfundierten Niere, IPK). Um den hierzu notwendigen Stoffwechsel zu gewährleisten, wurden zur Sauerstoffversorgung erstmalig spezielle mit Albumin verkapselte künstliche Sauerstoffträger auf Perfluorcarbonbasis (APOCs) eingesetzt. Es galt zu untersuchen ob die Versorgung mit APOCs einen positiven Einfluss auf die Organqualität hat. Des Weiteren wurde untersucht, ob durch den Zusatz von Antioxidantien, Schutzenzymen sowie einem erhöhten Angebot an Energiesubstraten ein positiver Einfluss auf den Stoffwechsel erzielt werden kann.
Die durchgeführten Testreihen sind der Beginn einer langfristig angelegten Studie, deren Ziel es ist mit Hilfe der APOCs eine Alternative zur Konservierung von Organen und eine Option zur Regeneration zu bieten.

3 Material und Methoden

3.1 Material

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Autoklav	VX-75	Systec, Linden, DE
Beheizbarer Schüttler	Thermomixer® C	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Blutgasanalysegerät	ABL 715	Radiometer, Kopenhagen, DK
Blutplasmaanalysegerät	Respons® 920	DiaSys, Holzheim, DE
Brutschrank	Memmert Brutschrank U10	Memmert; Schwabach; DE
Druckdom	MX960 Medex™ Logical Druckwandlerplatte	Smith Medical; Grasbrunn; DE
Feinwaage	SBC	Scaltec, Heiligenstadt, DE
Fluoreszenzmikroskop	Leica SP8 gSTED super resolution confocal & FILM	Leica, Wetzlar, DE
Guillotine	Guillotine	Feinmechanik UK Essen, Essen, DE
Heizbad	Thermomix	B. Braun, Melsungen, DE
Kauther	low-temp micro fine tip, 850° F (454° C)	Bovie Medical; St. Petersburg; RUS
Kontaktthermometer	ETS-D5	IKA, Staufen, DE
Magnet-Heizrührer	Cmag HS-17	IKA, Staufen, DE
Narkosegas-Verdampfer	RESEARCH	Eickemeyer, Tuttlingen, DE
Narkosetopf	Narkosetopf	Feinmechanik UK Essen, Essen, DE
O2C	O2C	LEA, Giessen, DE

Objektiv	HC PL APO CS2 40x	Leica; Wetzlar; DE
Operationsbesteck	Operationsbesteck	FST, Heidelberg, DE
Organbad	Organbad	Eigenanfertigung
Paraffingießstation	Leica EG 1150 H	Leica; Wetzlar; DE
Paraffinstreckbad	Paraffinstreckbad 24900	Medax; Kiel; DE
Peristaltikpumpe	Rotarus® flow	Hirschmann, Heilbronn, DE
pH-Einstabmesskette	pH-Einstabmesskette InLab Micro	Mettler-Toledo, USA
pH-Meter	765 Calimatic	Knick, Berlin, DE
Photometer	UV mini 1240	Shimadzu, Duisburg, DE
Pipettierhilfe	Pipetus	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, DE
Rotationsmikrotom	RM 2235	Leica, Wetzlar, DE
Sauerstoffelektrode	Oxyview	Hansatech, Norfolk, GB
Scan Scope	Aperio Scan Scope Side Scanner CS2	Leica, Wetzlar, DE
Schlauchpumpe	rotarus® volume 50	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, DE
Schüttler	Certomat U	B. Braun, Melsungen, DE
Sterilbank	HERA safe	Heraeus, Hanau, DE
Ultraschallprozessor	UP 400S	Hielscher Ultrasonics, Teltow, DE
Ultraschallsonde	Sonotrode H3, Durchmesser der Sonotrodenspitze 3 mm, Länge ca. 100 mm	Hielscher Ultrasonics, Teltow, DE
Vortexer	GLW L46	Oehmen Labortechnik, Essen, DE
Wärmeschrank	Universalschrank	Memmert, Schwabach, DE

Wasseraufbereitungs-Anlage	Milli Q® Advantage A10	Merck, Darmstadt, DE
Wasserbad	Wasserbad mit Gestell	Feinmechanik UK Essen, Essen, DE
Zentrifuge	mini spin	Eppendorf, Wesseling, DE

Tabelle 1: Geräte

Material	Modell	Hersteller
4-Wege-Hahn	4-Wege-Hahn blau PC 360° mit Überwurfmutter	Smiths Medical, Grasbrunn, DE
Adapter	Combifix® Adapter	B. Braun, Melsungen, DE
Aktivkohlefilter	AP9999 Aldasorber Medical Filter	NorVap, Cardiff, GB
Chirurgischer Faden	Resorba	Resorba medical GmbH, Nürnberg, DE
Deckglas	Deckglas für Mikroskopie	Engelbrecht; Edermünde; DE
Deckglas	Deckgläser ∅ 28 mm # 1	Menzel, Braunschweig, DE
Druckmanschette	Druckmanschette p*	mediPlac GmbH; Borchen; DE
Filter	AP9999 Aldasorber Medical Filter - Charcoal Scavenger	Aston Pharma, London, GB
Filter	Minisart® High Flow Spritzenvorsatzfilter	Sartorius AG; Göttingen; DE
Gummistopfen	Gummistopfen mit umstülpbarem Rand für NS 19	Carl Roth GmbH; Karlsruhe; DE
Handschuhe	Peha-soft-nitril	Hartmann, Heidenheim, DE
Histosetten	Biopsy Casettes I	Thermo Scientific; Dreieich; DE
Kanüle – blau	Sterican® Gr. 14, G 23 x 1 1/4" / ø 0,60 x 30 mm	B. Braun, Melsungen, DE
Klebeband	3M ™ Durapore ™ Klebeband	Durapore™

Kleinlumige Polyethylen Schläuche, 0,56 mm OD	Portex®	Smiths Medical, Kent, GB
Laborglasflasche	Duran® Laborglasflasche 250 ml mit Normschliff	DWK Life Sciences GmbH; Mainz; DE
Objektträger	Objektträger 76 mm x 26 mm x 1 mm	Engelbrecht; Edermünde; DE
Objektträger	Objektträger 76 mm x 26 mm x 1 mm	Carl Roth GmbH; Karlsruhe; DE
Paraffin	Paraplast	Mc Cormick
Perfusionsleitung	Original Perfuser® Line Typ: IV-Standard	B. Braun, Melsungen, DE
Polyethylen Schläuche	Portex Kleinlumige Polyethylen Schläuche 0,58 mm ID/ 0,96 mm 30 m	Smith Medical, Belgium
Reaktionsgefäß	Reagiergefäß 1,5 ml, 2,0 ml	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Seidenfaden	Seidenfaden Flachspule, 100 m, 1,5 mm	Resorba, Nürnberg, DE
Spritze	Einmalspritzen 1 ml BD Discardit™ II	Becton Dickinson; Franklin Lakes, USA
Sterilfilter 55 mm	NalgeneTMRapidflow	Thermo Scientific, Dreieich, DE
Teflonmembran	PTFE-Band	Berry-Plastic-Corporation, Evansville, USA
Tip	MaiMed – Tip Wattestäbchen	MaiMed, Neuenkirchen, DE
Venenverweilkanüle	Venenverweilkanüle Introcan Safety 16G	B. Braun, Melsungen, DE
Venenverweilkanüle	Venenverweilkanüle Introcan Safety 24G	B. Braun, Melsungen, DE
Verlängerungsleitung	Verlängerungsleitung 10 cm	B. Braun, Melsungen, DE
Vlieskompressen	BeeSana®	Sana, Alsdorf, DE
Wattestäbchen	Mai-Med-Tip	Mai Med, Neuenkirchen, DE
Zentrifugationsröhrchen	Röhre 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, DE

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Citratpuffer	9 ml 0,1M Zitronensäure und 41 ml 0,1 M Natriumcitrat ad 450 ml mit Aqua purificata
Krebs-Henseleit-Puffer (KH-Puffer)	NaCl 85 mM $NaHCO_3$ 25 mM CaCl* $2H_2O$ 1 mM Kcl 4 mM $MgSO_4(H_2O)_7$ 2,44 mM $KHPO_4$ 1,5 mM Glukose 5,5 mM
PBS (Phosphate buffered saline)	NaCl 137 mM KCl 2,6 mM KH_1PO_4 1,5 mM Na_2HPO_4 8,1 mM in Aqua purificata
PBST (PBS + Tween)	1l PBS + 500 µl Tween 20

Tabelle 3: Puffer und Lösungen

Aminosäure-Mix für 1l Perfusionspuffer:

	[mM]	[g/mol]	[g]
Alanin	2,02	89,09	0,180
Arginin	0,61	174,20	0,106
Asparagin	0,21	133,12	0,028
Aspartat	0,21	133,10	0,028
Cystein	0,50	121,16	0,061
Glutamat	2,00	183,60	0,367
Glutamin	4,00	146,10	0,584
Glycin	2,31	75,07	0,173
Histidin	0,33	155,16	0,051
Isoleucin	0,30	131,18	0,040
Leucin	0,41	131,18	0,054

Lysin	1,01	182,70	0,184
Methionin	0,33	149,20	0,050
Phenylalanin	0,33	165,19	0,054
Prolin	0,32	115,10	0,037
Serin	1,01	105,10	0,106
Threonin	0,24	119,12	0,029
Tryptophan	0,07	204,23	0,015
Tyrosin	0,21	181,19	0,037
Valin	0,34	117,15	0,04

Tabelle 4: Aminosäure-Gemisch

Verwendete Perfusionsmedien: siehe 3.2.1.6

Chemikalie	Hersteller
Biotinylated Goat Anti-Rabbit IgG Antibody	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Carbogen	Air Liquide; Düsseldorf; DE
D-Glukose	Carl Roth, Karlsruhe, DE
DAB Quanto Chromogen und Substrat	Fisher Scientific, Pittsburgh, USA
Formaldehydlösung 4 %	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Hämatoxylin	Thermo Scientific, Dreieich, DE
In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein	Roche Diagnostic GmbH, Darmstadt, DE
Isofluran	Abbot, Hannover, DE
Katalase	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
L-Glutamin	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (≥98 %)	Roth, Karlsruhe, DE
Perfluordecalin HP	F2 Chemicals Ltd., Lancashire, UK
Periodsäure	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Phospho-MLKL mouse monoclonal antibody	Biologo,Kronshagen, DE

Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulin	Agilent Technologies; Santa Clara; USA
Proteinase K	Sigma Aldrich, Steinheim, DE
Rinderserum Albumin	Appli Chem, Darmstadt, DE
Ringerlösung	Fresenius; Bad Homburg; DE
Schiff'sches Reagenz	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Schwefelsäure (>95 %)	Fisher Scientific, Pittsburgh, USA
Superoxide Dismutase bovine	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
TNF-a Rabbit polyclonal antibody	Biologo, Kronshagen, DE
TNF-aR1 Rabbit polyclonal antibody	Biologo, Kronshagen, DE
Tris-HCL	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Tween 20	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Universal Staining System DAB	Biologo, Kronshagen, DE
Urinverdünner	Radiometer; Kopenhagen; DNK
Urokinase 10.000 HS	Medac, Wedel, DE
Vectashield Mounting Medium with DAPI	Vector Laboratories; Burlingame; USA
Vectastain Elite ABC Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Xylolersatz	Thermo Scientific, Dreieich, DE

Tabelle 5: Chemikalien

Alle nicht genannten Chemikalien wurden von der Firma Sigma Aldrich bezogen.

Computerprogramm	Hersteller

Aperio Image Scope	Leica, Wetzlar, DE
Endnote X8	Clarivate Analytics, Philadelphia, USA
Graph Pad Prism® 6.0	Graph Pad Software, La Jolla, USA
Image J 1.51n	National Institute of Health, Maryland, USA
Leica LAS AF3	Leica, Wetzlar, DE
LibreOffice 5.0.5.2	The Document Foundation, Berlin, DE

Tabelle 6: Computerprogramme

3.2 Methoden

3.2.1 Experimentelles Modell

3.2.1.1 Versuchstiere

Insgesamt 47 weibliche Wistar Ratten (Rattus norvegicus), ca. 200-300g, wurden vom zentralen Tierlabor des Universitätsklinikum Essen bezogen. Die Versuchstiere wurden unter standardisierten Temperaturbedingungen (22 ± 1 °C), Feuchtigkeit (55 ± 5 %) und 12/12-h Licht/Dunkelheit Zyklen mit freiem Zugang zu Nahrung (ssniff-Spezialdiaeten, Soest, Germany) und Wasser gehalten. Alle Versuchstiere wurden, nach den standardisierten Richtlinien der Annex III 2010/63/EU des europäischen Parlaments und des Gremiums vom 22. September 2010 zum Schutz zu Forschungszwecken genutzter Tiere, artgerecht gehalten. (Council, 2010)
Die Organe wurden unter Einhaltung der gesetzlichen Bestimmungen im Rahmen von Tötungen zu wissenschaftlichen Zwecken gemäß § 4 Absatz 3 Tierschutzgesetz gewonnen.

3.2.1.2 Narkose und Tötung

Die Ratten wurde sachgemäß durch Griff an ihrer Schwanzwurzel in einem Narkoseeimer platziert, welcher an einer Absaugung mit Aldasorber Aktivkohle-Narkosefilter und einer Sauerstoffversorgung (4 l/min) angeschlossen war. Bevor die Narkose über die Beimischung von Isofluran (4 %) eingeleitet wurde, wurde die Ratte eine kurze Zeit mit reinem Sauerstoff versorgt. Als Indiz für das Erreichen des Narkosestadiums wurde das Ausbleiben des Stellreflexes der Ratte durch Kippen des Narkoseeimers getestet. Die Tötung des Tieres erfolgte über zügige Dekapitation per Guillotine.

3.2.1.3 Operationstechnik

Die Ratten wurden in dorsaler Lage auf dem Operationstisch platziert. Zunächst wurde nach Befeuchtung des Bauchfells mit Ethanol der Körper der Ratte entlang der *Linea alba* und des Rippenbogens eröffnet. Nach Auslagerung des Darms und Befreiung des Ureters von Fett und Bindegewebe wurde dieser mit einer Ligatur abgedichtet, um später die Katheterisierung zu erleichtern. Anschließend erfolgte die Trennung der *Vena Cava, Aorta, Vena renalis* und *Arteria renalis* voneinander mit Hilfe einer anatomischen Pinzette und von Fett und Bindegewebe mit Hilfe von Wattestäbchen. Im nächsten Schritt wurden Ligaturen locker um die *Arteria* und *Vena renalis* gelegt und abgehende Gefäße zu den Nebennieren versiegelt (Abb. 1). Anschließend wurde die Harnblase zur Entnahme des 0 min-Kontrollurin punktiert. Nach 120 min Ischämiezeit erfolgte die Katheterisierung von Gefäßen und Harnleiter. Arterie und Vene wurden, nachdem sie mit einer Gefäßschere eröffnet wurden, katheterisiert. In den Vorversuchs-, bzw. Kontrollgruppen erfolgte dieser Schritt entsprechend nach 0 min, 5 min, 30 min, 60 min, 90 min oder 120 min.
Für die Arterie wurde ein kleinlumiger Polyethylenschlauch mit ca. 5-10 cm Länge verwendet, der über eine Kanüle (23G) gezogen wurde (Abb. 2). Für Die Vene hingegen wurde ein Silikonschlauch von ca. 1-2 cm Länge verwendet, der über einen Venenverweilkatheter (16G) gezogen wurde (Abb. 3).
Die ersten 10 min wurden die Nieren über den Perfusor mit Basismedium gespült, bevor auf den Perfusionspuffer umgestellt wurde (siehe 3.2.1.6). Während der 10 min Spülung der Niere wurde ein weiterer Katheter (Venenverweilkatheter 24G) im 45° Winkel in den erweiterten Harnleiter eingeführt und ebenfalls mit einer Ligatur fixiert (Abb. 4).

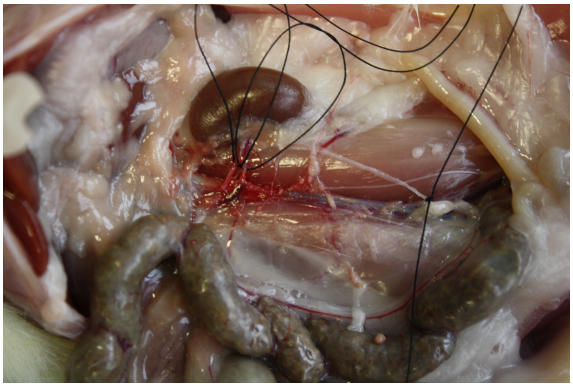


Abbildung 1: Ligaturen

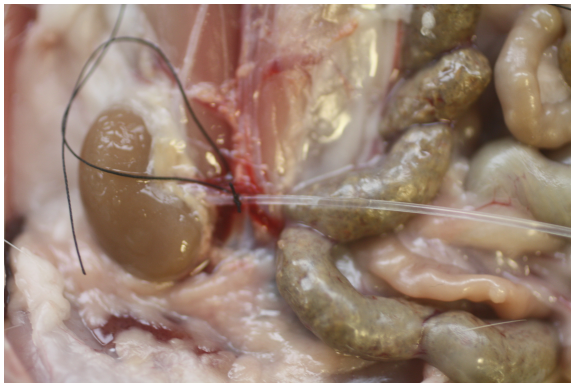


Abbildung 2: Arterienkatheter

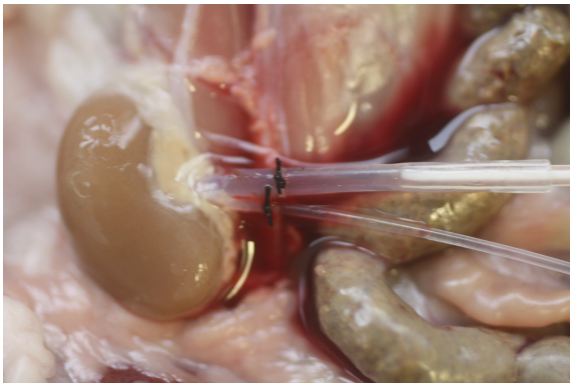


Abbildung 3: Venenkatheter

Abbildung 4: Ureterkatheter

3.2.1.4 Organentnahme

Nachdem alle Katheter eingeführt und sicher durch Ligaturen fixiert worden waren, wurde das Organ komplett vom umgebenden Bindegewebe und Fett getrennt. Es wurde lediglich etwas Fettgewebe belassen, um das Organ mit der Pinzette dort zu greifen und in das Organbad transferieren zu können. Das Organbad besteht aus einem Gestell, welches in einem Wasserbad (37°C) platziert wurde. In dem Gestell wurde eine Kunststoff-Abdampfschale eingelassen, welche nach Einlage von 1-2 Kompressen mit KH-Puffer befüllt wurde. Anschließend wurde das Organ ohne die Position der Katheter zueinander zu verändern in das vorgesehene Becken im Organbad abgelegt und die Katheter in den vorhandenen Furchen oder mit Hilfe von Klebeband fixiert (Abb. 5).

Schließlich wurde eine O2C (Oxygen to see)-Sonde auf das Organ gelegt, ebenfalls mit Klebeband fixiert, um ein flaches Aufliegen zu gewährleisten und mit Aluminiumfolie abgedeckt, um eventuelle Streustrahlung zu vermindern.
Nachdem der Perfusionspuffer die Niere komplett durchspült hat, konnte die Perfusorleitung, als Verbindung zum System, an den Venenkatheter angeschlossen werden. Die 0 min-Kontrollnieren wurden direkt aus dem Tier entnommen und in Formalin fixiert, während bei den 120 min-Kontrollnieren und den Nieren der Vorversuchsgruppen die Entnahme und Fixierung nach einer Spülphase erfolgte.

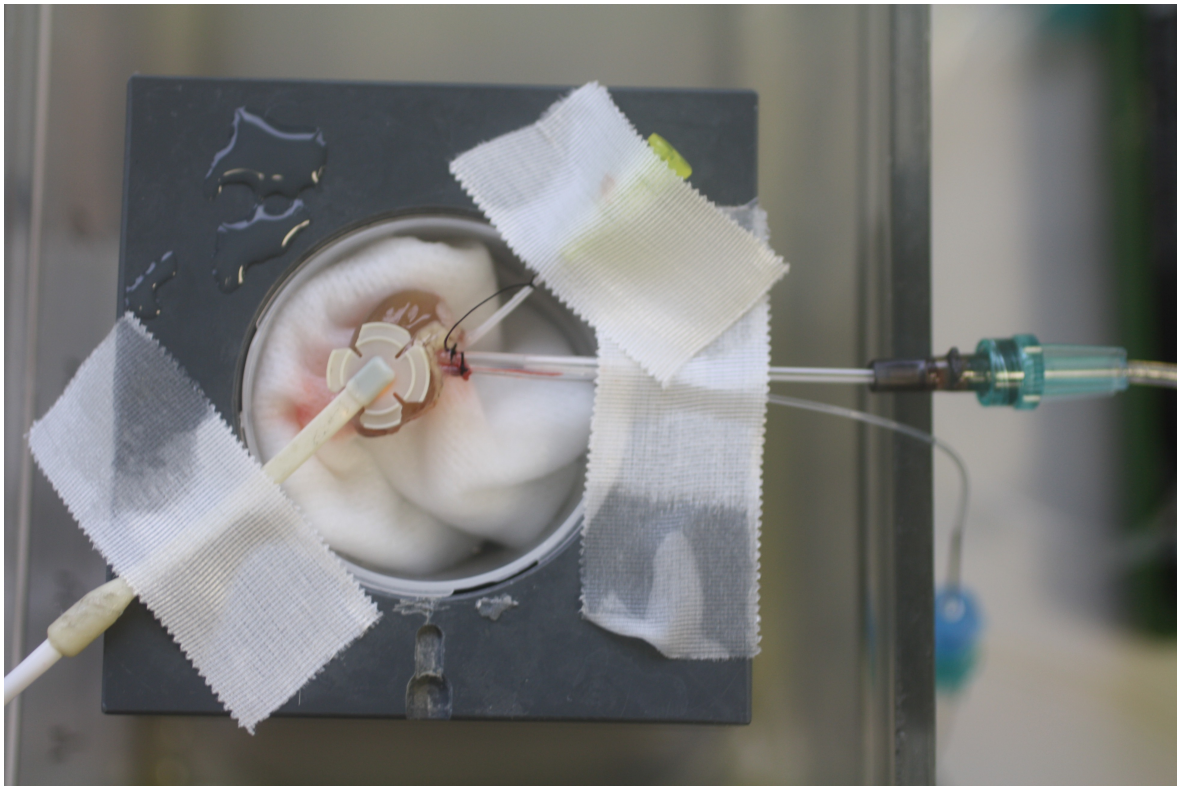


Abbildung 5: Entnommene Niere mit Arterien-, Venen- und Ureterkatheter und aufliegender O2C-Sonde im Organbad

3.2.1.5 Aufbau des Ex-Vivo-Perfusionssystems

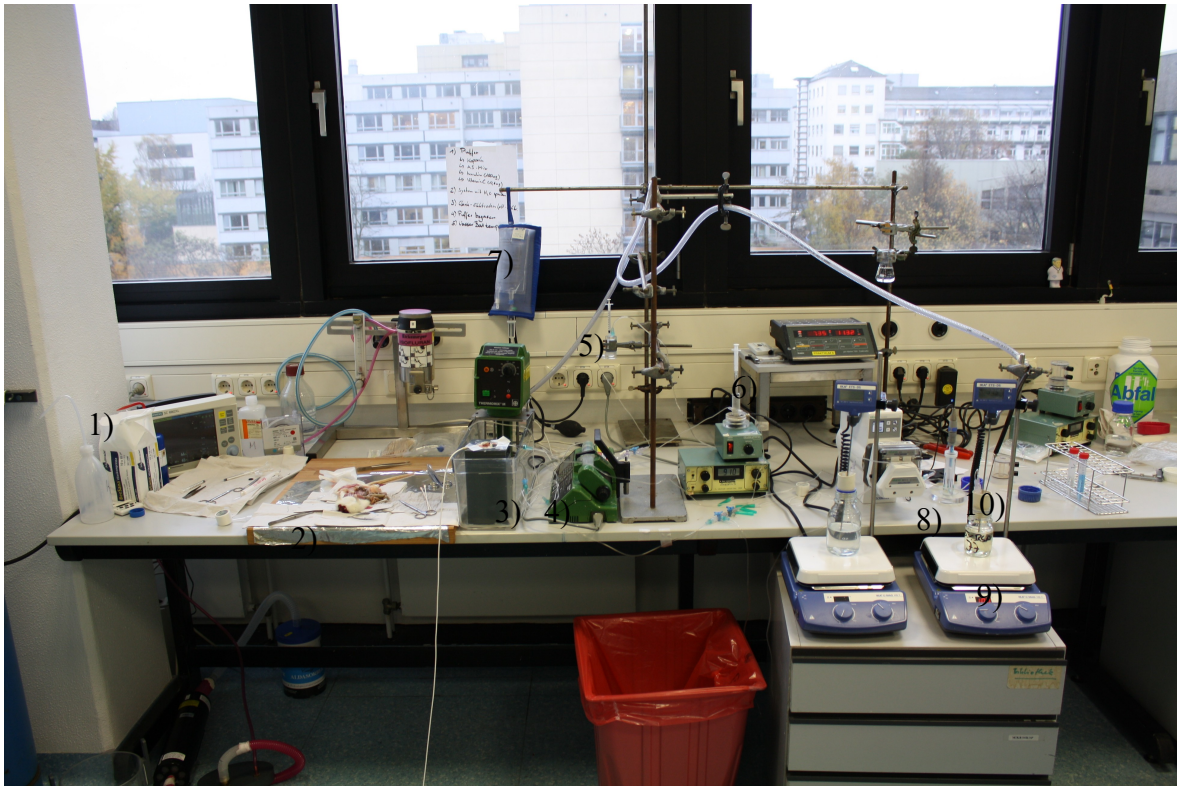


Abbildung 6: Arbeitsplatz: *1) Computer zur Druckkontrolle; 2) OP-Arbeitsplatz; 3) Niere im Organbad mit O2C-Sonde; 4) Perfusor; 5) Blasenfänger; 6) Sauerstoffelektrode (hier noch im System eingeschaltet; später separat aufgebaut); 7) Druckbeutel mit Ringerlösung; 8) Peristaltikpumpe; 9) Heizplatte mit Puffer-Reservoir; 10) pH-Meter; nicht zu sehen: Druckdom hinter Organbad*

Abb. 6 zeigt den Versuchsaufbau. Als Reservoir für den Puffer dienten 250 ml Laborglasflaschen mit Normschliff 29, um diese mit Stopfen verschließen zu können, um Verunreinigung durch eindringende Partikel zu verhindern und das Einführen von Kanülen und Thermometer zu ermöglichen. Dieses Reservoir wurde auf einem Magnet-Heizrührer platziert. Eine Kanüle wurde mit einem Stück einer Perfusionsleitung versehen, welches bis zum Boden reichte und später dazu diente, den Puffer über die Pumpe in das System zu leiten. Weitere Kanülen dienten als Zulauf für das Perfusat, sowie als Druckausgleich, welcher auf Grund der Begasung mit Carbogen nötig war. Außerdem wurde das Kontaktthermometer eingeführt, um während der Durchführung die Temperatur des Perfusats kontrollieren zu können. Um den Sauerstoffzufluss zu gewährleisten, wurden

Mehrwegkanülen, die bis kurz oberhalb der Pufferoberfläche reichten und über einen gasdichten Schlauch an die Carbogen-Flasche angeschlossen waren, angebracht. Die Kanüle, die zur Weiterleitung des Perfusats in das System diente, wurde über einen Combifix® Adapter an eine Verlängerungsleitung (ID: 1,2 mm/ L: 300 mm) angeschlossen, die bis zur Peristaltikpumpe führte. In der Peristaltikpumpe wurde eine Original Perfusor®Line eingespannt, die an die Verlängerungsleitung angeschlossen wurde. Auf der anderen Seite erfolgte der Anschluss an den bis zur Hälfte gefüllten Blasenfänger, welcher mit einer 1 ml Spritze abgedichtet wurde. Eine weitere Verlängerungsleitung führte vom Blasenfänger über einen 4-Wege-Hahn zum Druckdom. Dieser war an einen Druckbeutel mit Ringerlösung angeschlossen, welche mit ca. 200 mmHg dem System zugeführt wurde.
Eine weitere kleine Verlängerungsleitung führte vom Druckdom zu zwei hintereinander geschalteten 4-Wege-Hähnen, welche nötig waren, um den Puffer im Versuch umstellen zu können. Von den 4-Wege-Hähnen führte eine lange Perfusorleitung zum Arterienkatheter. Die lange Perfusorleitung, welche im Versuch an den Venenkatheter angeschlossen wurde, führte über einen weiteren 4-Wege-Hahn, der zur Probenentnahme und zur Ermöglichung eines konstanten Flusses im System während der ersten 10 min Äquilibrierphase diente, zur pH-Elektrode. Von der pH-Elektrode führte eine kleine Verlängerungsleitung über eine Kanüle mit Adapter zurück zum Reservoir.

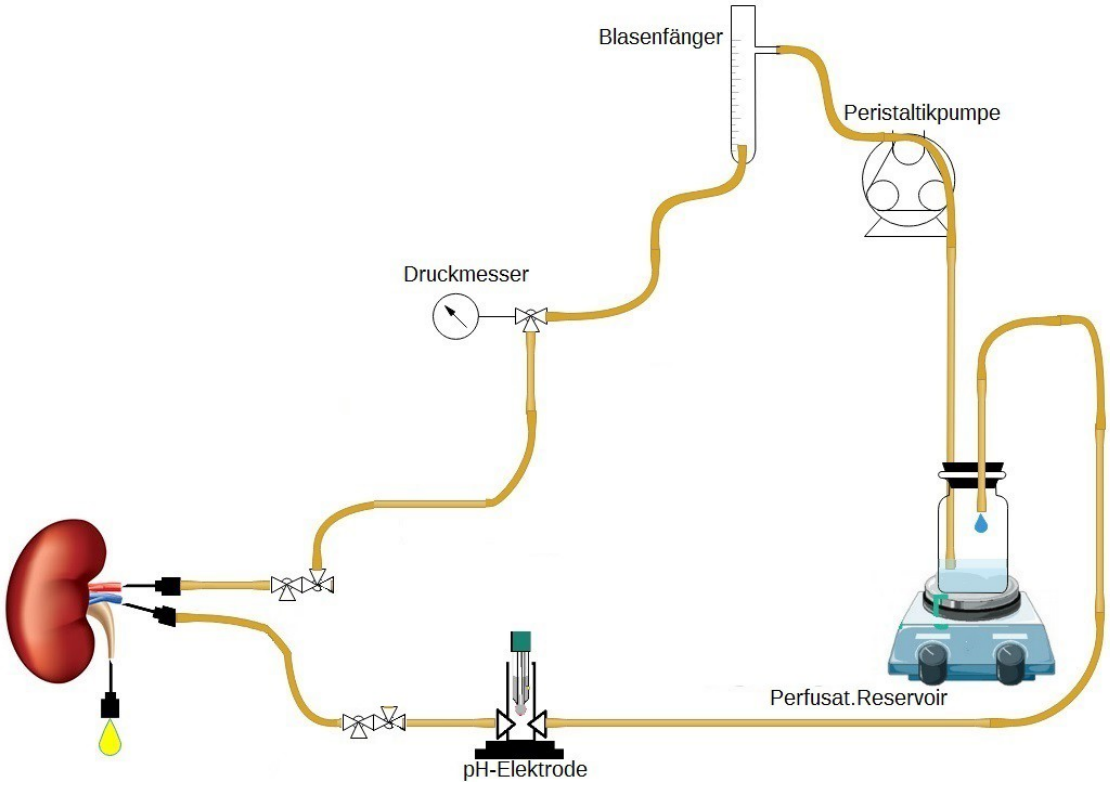


Abbildung 7: Versuchsaufbau: *Das Perfusat gelangte aus dem auf der Heiz-und Rührplatte platzierten Reservoir mit Hilfe einer Peristaltikpumpe durch einen Blasenfänger und über einen Druckmesser in die A. Renalis. Aus der V. Renalis gelangte das Perfusat über einen 4 Wege-Hahn zur Probenentnahme und eine pH-Elektrode zurück in das Reservoir. In der Spülphase wurde an den sich vor der Niere befindenden 4-Wege-Hahn eine Perfusorspritze mit dem Spülpuffer angeschlossen. Modifiziert nach* (Jägers, 2017)

3.2.1.6 Perfusionsmedium

Das Basismedium bestand aus 200 ml KH-Puffer und Urokinase (150 µl/30 ml).
Die Urokinase wurde in Form einer Lösung aus 10.000 IU gelöst in 2000 µl KH-Puffer angesetzt. Hiervon wurden 150 µl zu 0,03l KH-Puffer hinzugegeben.

Aus dem Basismedium wurde durch verschiedene Zusätze (Tabelle 7) am Versuchstag der Perfusionspuffer, Bovines-Serum-Albumin-Puffer (BSA-Puffer), hergestellt.

Zusatz	Konzentration
BSA	50 g/l
Aminosäure-Gemisch	60 ml/l
Inulin	0,5 g/l → 50mg/dl

Tabelle 7: Zusätze BSA-Puffer

Die Zusammensetzung des BSA-Puffers wurde auf folgende Parameter überprüft:

Na	127,04 mmol/l
Ca	0,692 mmol/l
Cl	100,2 mmol/l
K	6,175 mmol/l
Glu	95,72 mg/dl
pH	7,3-7,4
Osm	258,852 mOsm/l

Tabelle 8: Baseline Perfusionspuffer

Das Aminosäure-Gemisch (Tabelle 4) wurde in 1 M NaOH gelöst, nach Herstellung aliquotiert und bei -80°C eingefroren.
Je nach Versuchsgruppe (siehe 3.2.1.7) wurden darüber hinaus weitere Substanzen wie Ascorbinsäure als Antioxidans, Enzyme in Form von Superoxiddismutase und Katalase und vermehrt Glutamin und Glutamat als zusätzliche Energiesubstrate, sowie APOCs zugesetzt (Tabelle 9). Der pH-Wert des Perfusats wurde nach Begasung mit Carbogengas auf 7,3-7,45 eingestellt.
Die Synthese der Sauerstoffträger erfolgte ebenfalls am Versuchstag.
Es wurden 5 ml BSA-Puffer (5 %) und 1 ml PFD (Perfluordecalin) in ein 15 ml Falcon überführt. Das Falcon wurde in einem Eisbad (-20°) für 90 Sekunden bei 100 % Ultraschallintensität entsprechend 400 Watt, einer Amplitude von 210 µm und einer Frequenz von 24 kH unter einer Sonotrode platziert. Das Eisbad wurde so platziert, dass sich die Spitze der Sonotrode etwa 1,5 cm oberhalb des Bodens des Eisbades auf Höhe des Phasenübergangs von BSA-Puffer und PFD befand. Es wurden 20 ml Kapselsuspension zu 80 ml Perfusionspuffer hinzugefügt.
So entstand ein Perfusat mit 4 vol% der auf PFC (Perfluorcarbon) und Albumin basierenden APOCs, in 5 %iger Albuminlösung. (Sloviter et al., 1967; Wrobeln, 2013)

3.2.1.7 Versuchsgruppen

Die Versuche wurden in fünf Gruppen durchgeführt (Tabellle 9). Versuchsgruppe 1 (Kontrolle HD (Hoher Druck)) beinhaltete 3 Nieren, die mit dem 5 %igen BSA-Puffer ohne APOCs oder Zusätze unter einem Druck in der *Arteria renalis* zwischen 85 mmHg und 120 mmHg perfundiert wurden. Versuchsgruppe 2 (APOCs HD) beinhaltete 4 Nieren, die mit dem 5 %igen BSA-Puffer und 4 vol% APOCs unter dem selben Druck (85-120 mmHg) perfundiert wurden. Zur Versuchsgruppe 3 (Kontrolle ND (Niedriger Druck)) zählten 6 Nieren, die lediglich mit dem 5 %igen BSA-Puffer unter einem niedrigeren Druck zwischen 60 mmHg und 85 mmHg perfundiert wurden. Versuchsgruppe 4 (APOCs ND) bestand aus 5 Nieren, die mit 5 %igem BSA-Puffer und 4 vol% APOCs bei 60-85 mmHg perfundiert wurden.
In Versuchsgruppe 5 (APOCs ND +VitC+Glu+SOD/KAT) wurden 7 Nieren mit 5 %igem BSA-Puffer, 4 vol% APOCs, Enzymen (Superoxiddismutase (1 U/l) und Katalase (1 U/l)) und Ascorbinsäure (500 µM) bei 60-85 mmHg perfundiert. Zusätzlich wurde hier weitere Energie bereitgestellt, indem die Konzentration von Glutamat von 2,6 mM auf 3 mM und von Glutamin von 2,98 mM auf 5 mM erhöht wurde.
Außerdem wurden 3 Nieren nach näherungsweise 0 min (Negativkontrolle, 0 min Ischämie) und 4 Nieren nach 120 min Ischämie, direkt nachdem sie mit NaCl blutleer gespült worden waren (Positivkontrolle, 120 min Ischämie) entnommen.

Versuchsgruppe	Zusammensetzung des Perfusionsmediums
Kontrolle HD	BSA-Puffer 5 %
APOCs HD	BSA-Puffer 5 % + 4 vol% APOCs
Kontrolle ND	BSA-Puffer 5 %
APOCs ND	BSA-Puffer 5 % + 4 vol% APOCs
APOCs ND +VitC+Glu+SOD/Kat	BSA-Puffer 5 % + 4 vol% APOCs + 1 U/l Superoxiddismutase + 1 U/l Katalase + 500 µM Ascorbinsäure + je 5 mM Glutamin und Glutamat

Tabelle 9: Zusammensetzung der Perfusionsmedien

3.2.1.8 Versuchsvorbereitung

Als erste vorbereitende Maßnahme wurde nach Tötung des Tieres und ersten im Versuchsablauf beschriebenen Präparationsschritten das Perfusionssystem aufgebaut. Zunächst erfolgten die Kalibrierungen des Druck-Doms, des pH-Meters und der Sauerstoffelektrode. Nachdem alle Schläuche, 3-Wege-Hähne und Geräte miteinander verbunden worden waren, erfolgte die Synthese der APOCs und die Fertigstellung des Perfusionspuffers. Hierzu wurden je nach Versuchsgruppe der Aminosäure-Mix, APOCs und Zusätze hinzugefügt. Der fertiggestellte modifizierte Perfusionspuffer wurde zur Begasung auf dem Magnet-Heizrührer platziert. Über die entsprechende Kanüle wurde er mit Carbogengas (95 % O_2, 5 % CO_2) mit 4 l/min begast. Nach der Begasung erfolgte die Einstellung des pH-Werts auf 7,3-7,45 mittels 0,1 M NaOH und 0,1 M HCL.
Des Weiteren wurde das Basismedium, welches in der Äquilibrierphase als Spülpuffer genutzt wurde, aus Basispuffer und Urokinase hergestellt.

3.2.1.9 Versuchsablauf

Als erster Schritt im Versuchsablauf erfolgte die Narkotisierung und Tötung des Tieres. Die Eröffnung des Tieres und Säuberung der benötigten Gefäße, sowie das Legen der Ligaturen und die Punktion der Blase zur Entnahme des 0 min-Urins wurden umgehend durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt wurden auch die Negativkontrollen (0 min-Kontrollen) entnommen und direkt fixiert (siehe 3.2.1.4).
In alle anderen Nieren wurde 120 min nach Tötung des Tieres der erste Katheter in die *Arteria renalis* gelegt. Die Positivkontrollen (120 min-Kontrollen) wurden 2-3 min mit 0,9 % NaCl blutfrei gespült und anschließend fixiert (siehe 3.2.1.4). In allen anderen Nieren wurden der Venenkatheter und der Ureterkatheter gelegt und das Organ in das Organbad transferiert, sowie die O2C-Sonde angelegt und ein erstes Spektrum aufgenommen, während das Basismedium 10 min mit einer Flussrate von 60 ml/h mittels Perfusor durch die Niere gespült wurde. Des Weiteren wurde eine Perfusatprobe aus dem Reservoir als 0 min-Probe entnommen. Nach Ablaufen der 10-minütigen Spülphase wurde mit Hilfe des 3-Wege-Hahns auf den Perfusionspuffer umgeschaltet. Sobald der Perfusionspuffer im Organ angekommen war, fiel der Perfusiondruck ab und die Flussrate konnte entsprechend erhöht werden. An diesem Punkt konnte der Venenkatheter an das

Perfusionssystem angeschlossen werden, um eine rezirkulierende Perfusion zu ermöglichen. Von nun an wurden alle 10 min der Perfusionsdruck, die Perfusionsflussrate und der pH-Wert notiert. Außerdem wurden alle 30 min Perfusat- und Urinproben entnommen. Die Perfusion wurde 180 min lang aufrecht erhalten, bevor das Organ vom System getrennt und in 4 %igem Formaldehyd fixiert wurde (Abb. 8).

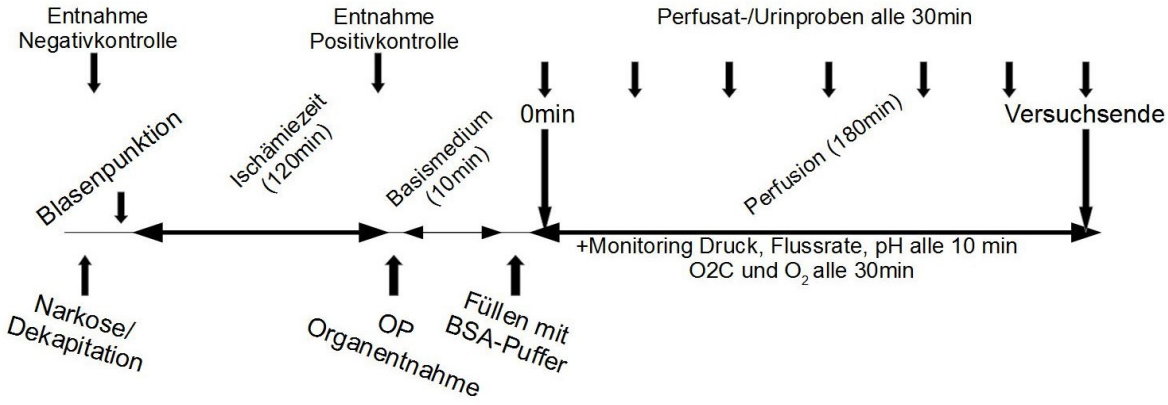


Abbildung 8: Versuchsablauf

3.2.2 Untersuchungsparameter

3.2.2.1 Perfusionsflussrate

Die Perfusionsflussrate wurde im Versuch gemäß den Veränderungen des Perfusionsdrucks (60-85 mmHg, Versuchsgruppen ND, bzw. 85-120 mmHg Versuchsgruppen HD) angepasst, da eine druckkontrollierte Perfusion durchgeführt wurde.
Die Einheit der Peristaltikpumpe, rpm (rounds per minute), wurde über Auffangen der pro min gepumpten Volumina in Eppendorfgefäße in µl/min umgerechnet.

3.2.2.2 pH-Wert

Der pH-Wert wurde im Versuchsverlauf mit Hilfe einer pH-Elektrode gemessen, bevor das Perfusat nach Durchlaufen der Niere zurück in das Reservoir gelangte.
Die Apparatur, in die die pH-Elektrode eingebracht wurde, wurde auf einer Rührplatte positioniert. Der pH-Wert der Urinproben wurde mit Hilfe eines ABL 715 Serie BGA(Blutgasanalyse)-Geräts bestimmt.

3.2.2.3 Urinflussrate

Der Urin wurde alle 30 min aus dem Ureterkatheter-Reservoir mit einer Pipette entnommen und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Die Menge wurde notiert und auf µl/min umgerechnet.

3.2.2.4 Cytochromspektren

Mit Hilfe des O2C-Geräts werden optisch aktive Substanzen bestimmter Wellenlängen (500 nm-800 nm) detektiert und quantifiziert. Weißlicht, welches von dem Gerät abgegeben wird, trifft im mitochondrialen Gewebe auf die Cytochrome der Atmungskette und wird entsprechend absorbiert, gestreut und von der Sonde anschließend detektiert. Durch die blutfreie Perfusion ist es störungsfrei ohne Einfluss des Hämoglobins möglich die Cytochrome zu detektieren und somit Rückschluss darauf zu gewinnen, in wie weit die Niere noch zur oxidativen Phosphorylierung in der Lage ist.
Nachdem zu Beginn der Perfusion die O2C-Sonde dem Organ aufgelegt worden war, wurde die Niere mit Aluminiumfolie abgedeckt, um Streuung zu vermeiden. Anschließend wurde eine 0 min-Messung durchgeführt und darauffolgend alle 30 min ein weiteres Spektrum über ca. 10 Sekunden aufgenommen.
Bei den Wellenlängen 550 nm (Cytochrom c), und 565nm (Cytochrom b) können die einzelnen Cytochrome abgelesen werden. (LEA Medizintechnik)
Je niedriger die Absorption bei diesen Wellenlängen, desto mehr Cytochrom liegt im oxidierten Zustand vor. Diese sind eine notwendige Voraussetzung für eine funktionierende mitochondriale Atmungskette. (Dutkowski et al., 2003)

3.2.2.5 Osmolarität

Die Osmolarität wurde mit Hilfe eines ABL 715 Series BGA-Geräts in den Urin- und Perfusatproben bestimmt. Entsprechend der Formel:
mOsm/l= 2x cNa^+ (Natriumkonzentration)+ cGlu (Glukosekonzentration)
wurde die Osmolarität aus der Natrium- und Glukosekonzentration der Probe berechnet. (Referenzbuch der ABL700 Serie)

3.2.2.6 Sauerstoffsättigung und Sauerstoffverbrauch

Die Sauerstoffsättigung des mit Carbogen begasten Perfusionspuffers wurde vor dem Start der Perfusion mit Hilfe einer Clark-Elektrode bestimmt. Die Messung erfolgte über die Potentialdifferenz zwischen einer Platinkathode und einer ringförmigen Silberanode.
Um sicher zu stellen, dass nur Sauerstoff an die Elektrode gelangt, wurde über die Kathode eine Teflonmembran gelegt, sowie ein Stück Papier, welches als Elektrolytbrücke zwischen Kathode und Anode diente, platziert. Die Sauerstoffelektroden wurden nicht in das Perfusionssystem eingebaut, um zu garantieren, dass die ermittelten Werte von Druck und Perfusionsflussrate unabhängig sind. Zur Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs erfolgte die Messung der Potentialdifferenz im Perfusat vor und nach Passage der Niere.
Die Berechnung des Sauerstoffverbrauchs erfolgte nach folgender Gleichung:
(Partialdruckdifferenz vor/hinter der Niere x 0,96 x Henry-Koeffizient Wasser + Partialdruckdifferenz vor/hinter der Niere x 0,04 x Henry-Koeffizient PFD) x Perfusionszeitvolumen = ((pO_2 vor der Niere – pO_2 nach der Niere) x 0,96 x 3,006 x 10–5 ml O_2 x ml–1 x mmHg–1 + (pO_2 vor der Niere – pO2 nach der Niere) x 0,04 x 5,566 x 10–4 ml O_2 x ml–1 x mmHg–1) x 0,56 ml x g Niere–1 x min–1 (Kurt, 1996)

3.2.2.7 Inulin-Clearance/GlomeruläreFiltrationsrate (GFR)

Um die Inulin-Clearance und somit die GFR bestimmen zu können, wurde das Perfusat mit Inulin versetzt, das im Glomerulus frei filtriert, aber im Tubulussystem weder resorbiert noch sezerniert wird. Es kann in den Urin- und Perfusatproben mittels Anthron nachgewiesen werden.

Dazu wurde zunächst das Anthron-Reagenz hergestellt, indem 70 ml >95 % H2SO4 langsam zu 30 ml H_2O pipettiert wurden. Die verdünnte H2SO4 wurde unter ständigem Rühren mit 200 mg Anthron versetzt. Anschließend wurden 350 µl der Perfusatproben zu 4 ml Anthron-Reagenz in ein 15 ml Falcon gegeben und gemischt. Nach 10 min Inkubation bei 57°C und 450 rpm im Thermomixer wurde die Extinktion bei 620 nm photometrisch bestimmt. Diese Methode funktioniert, da die Fruktose-Moleküle des Inulins unter der Schwefelsäure bei 57°C hydrolisiert werden und sich Hydroxymethylfurfural bildet, welches wiederum mit Anthron einen grün-bläulichen Farbkomplex bildet. Dieser kann photometrisch bei 620 nm nachgewiesen werden. (Poola et al., 2002)
Grundsätzlich wird die GFR anhand folgender Formel berechnet:

GFR= (Urinzeitvolumen [ml/min] x Inulinkonzentration im Urin [g/l]) / Inulinkonzentration im Plasma [g/l]

Angepasst an die IPK lautet die Formel:
GFR= (Filtratzeitvolumen [ml/min] x Inulinkonzentration im Filtrat [g/l]) / Inulinkonzentration im Perfusat [g/l]

Aufgrund des Mangels an Filtratvolumen wurde die Inulinkonzentration im Filtrat indirekt über den Inulinverlust im Perfusat berechnet:
Inulinkonzentration im Filtrat= Ausgangskonzentration von Inulin im Perfusat- aktuelle Konzentration von Inulin im Perfusat
Folgende modifizierte Formel zur Berechnung der GFR wurde in dieser Arbeit verwendet:
GFR (ml/min)=((Inulin−Ausgangskonzentration im Perfusat (mg/ml)-aktuelle Inulin-Konzentration im Perfusat (mg/ml)) x Filtratvolumen (ml/min)/ Inulin−Ausgangskonzentration im Perfusat (mg/ml)

Es wurde exemplarisch eine Messung mit TCA (Trichloressigsäure)-Fällung durchgeführt, um deren Einfluss auf die Messwerte zu ermitteln. Hierzu wurden 100 µl Probe vor der Zugabe des Anthron mit 300 µl 30 %iger TCA versetzt; die gefällten Proteine wurden 5 min bei 9,6k rpm bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Vom Überstand wurden anschließend 350 µl Probe entnommen.

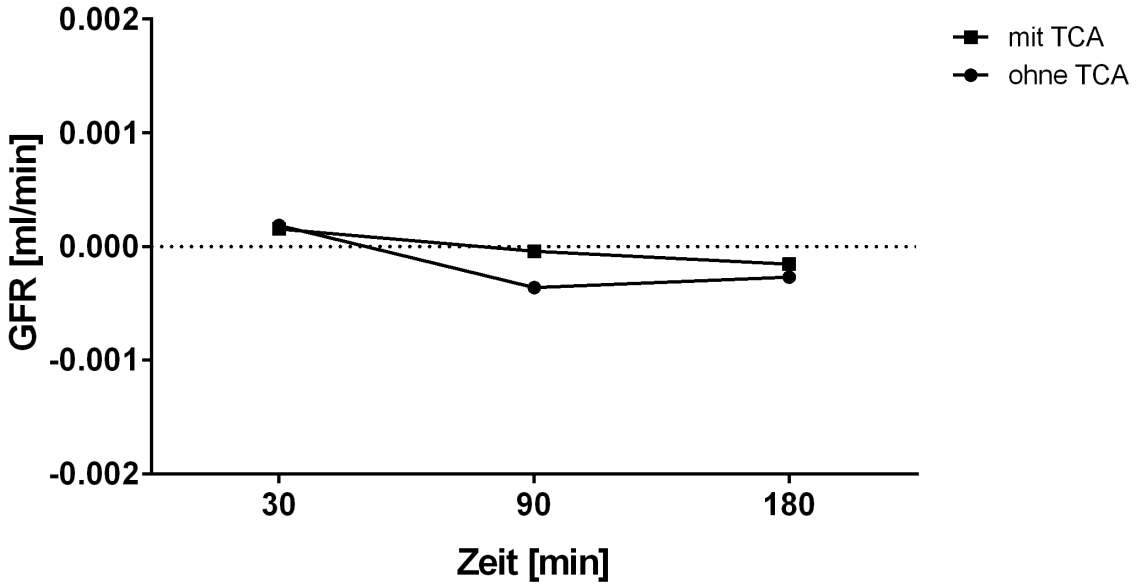


Abbildung 9: TCA-Fällung: *Im Vergleich der GFR ohne TCA- und mit TCA-Fällung zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.*

Unter TCA-Fällung zeigten sich keine relevanten Messunterschiede (Abb. 9).

3.2.2.8 Elektrolyte/Fraktionelle Exkretion von Na^+/K^+/Glukose

Die Elektrolyt-/Glukosekonzentration wurde mit Hilfe eines ABL 715 Serie BGA-Geräts in den Urin- und Perfusatproben bestimmt. Die Urinproben wurden dazu im Verhältnis 1:3 mit Urinverdünner verdünnt. Mit Hilfe folgender Formel konnte anschließend die fraktionelle Exkretion von Natrium, Kalium und Glukose berechnet werden.
Hier beispielsweise für Natrium aufgeführt:

Fraktionelle Exkretion Na+ [%]= Na+(Urin)[mg/dl]* Inulin (Perfusat) [mg/dl]* 100/Na^+(Perfusat)[mg/dl]* Inulin (Urin) [mg/dl] (Koul et al., 2015)

Die Rückresorption wurde anschließend über das Verhältnis von Ausscheidung zu Aufnahme (Menge im Perfusat) bestimmt.

3.2.2.9 Histologische und immunhistochemische Untersuchungen

Alle histologischen Präparate wurden direkt nach Beendigung des Versuchs 24 h-72 h in 4 % Formalin fixiert, in der zentralen Pathologie des Uniklinikum Essen dehydriert, in Paraffin eingebettet und am Miktrotom in 1-2 µm dicke Schnitte geschnitten. Alle Schnitte wurden vor weiteren Schritten bei 65 °C deparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe hydriert. Nach Durchlaufen der Färbung durchliefen die Präparate zwecks Dehydrierung eine aufsteigende Alkoholreihe bevor sie eingedeckelt wurden.
Die Schädigung wurde für die PAS (periodic acid-Schiff)-, TNFα (Tumor-necrosis-factor)-AK(Antikörper)- und TNFα-Rezeptor-1-AK-Färbung sowie
TUNEL(TdT-mediated dUTP-X nick end labeling)-Färbung jeweils mit einem Score von 1-5 bewertet. Dabei wurde nach folgendem Score eingeteilt:
0: 0,00 %, 1: <10 %, 2: 10-25 %, 3: 26-45 %, 4:46-75 %, 5: >75 %
Es wurden im äußeren Cortex und im äußeren Nierenmark jeweils 5 Gesichtsfelder verblindet mit einer 20-fachen Vergrößerung im Scanscope Viewer beurteilt und der Score gemittelt. (Oh et al., 2008; Yamada et al., 2004; Wu et al., 2010)

3.2.2.9.1 Histologie

Die Detektion der histologischen Schädigung erfolgte durch eine PAS (Periodic acid Schiff)-Färbung, die mehrwertige Alkohole und dementsprechend die aus Zucker bestehende Glykokalix anfärbt.
Die Schnitte wurden mit 0,5 % Perjodsäure oxidiert bevor sie durch das Schiffs Reagenz angefärbt und mit Mayer‘s Hematoxylin gegengefärbt wurden. Durch die Perjodsäure wurden zunächst Hydroxylgruppen in der Glykokalyx zu Carbonylgruppen oxidiert. Diese wurden, nach Abwaschen der Perjodsäure, mit dem Schiff‘schen Reagenz unter Bildung eines roten Farbstoffs reduziert und somit angefärbt.
Die Schnitte wurden hinsichtlich epithelialer Nekrosen, ödematöser Veränderungen, Verlust des tubulären Bürstensaums und Dilatation der Tubuli verblindet unter einem Lichtmikroskop beurteilt. (Oh et al., 2008)

3.2.2.9.2 Immunhistochemie

Immunhistochemisch wurde die zelluläre Schädigung über die Expression von TNFα und TNFα-Rezeptor-1 bestimmt. (Donnahoo et al., 1999) Hierzu wurden ebenfalls 1-2 µm dicke Schnitte angefertigt und deparaffiniert und hydriert. Bevor die Färbung durchgeführt wurde, wurden die Schnitte vorbearbeitet, um eine selektive Färbung zu erzielen. Hierzu wurden die Schnitte zwecks Protein-Demaskierung 15 min in Citratpuffer gekocht, die endogene Peroxidase-Aktivität durch 10-minütige Einwirkung in Wasserstoffperoxid unterdrückt, sowie die generalisierte Anfärbung von Proteinen durch den einstündigen Proteinblock verhindert. (Arfian et al., 2012) Nach diesen Schritten erfolgte die Inkubation mit den Primär- und Sekundärantikörpern wie durch He et al beschrieben. Es wurden hier Phospho-MLKL mouse monoclonal antibody (biologo), TNF-α rabbit polyclonal antibody und TNFα-Rezeptor-1 rabbit polyclonal antibody als Primärantikörper in der Verdünnung 1/200 verwendet. Als Sekundärantikörper fungierten biotinylated Goat Anti-Rabbit IgG Antibody, bzw. polyclonal Rabbit Anti-Mouse IgG der Firma Sigma in einer Verdünnung von 1/200. Die Schädigung wurde über die prozentuale Fläche der exprimierenden, bräunlich gefärbten und somit geschädigten Bereiche des Nierengewebes bestimmt. Entsprechend des allgemeingültigen Scores wurde diese prozentuale Fläche beurteilt. Außerdem erfolgte eine Einteilung der Schädigung entsprechend der Färbungsintensität von 0 (keine Färbung) über 1 (leicht gelblich) und 2 (bräunlich) bis 3 (dunkelbraun). (Blum et al., 2017; He et al., 2013) Die ermittelten Scores von Intensität und gefärbter Fläche wurden gemittelt.

3.2.2.9.3 Enzymatische Bestimmung der DNA-Fragmentation

Mit Hilfe der TUNEL-Färbung wurden Fragmentierungen in der DNA (Desoxyribonucleinacid) detektiert, um Rückschlüsse auf den Grad der apoptotischen Schädigung zu ziehen. Das Prinzip beruht auf der Anknüpfung markierter Desoxyribonukleotide, wie dUTP, an freie 3‘ OH-Enden von DNA-Bruchstücken mittels Desoxynucleotidy-Transferase. Die Dektetion der mit einem Fluoreszenzmarker markierten Desoxyribonukleotide erfolgte anschließend am Fluoreszenzmikroskop. (Forbes et al., 2000) Es wurde entsprechend des von Sigma gelieferten Färbeprotokolls verfahren. Hierbei wurden die Schnitte zunächst 20 min mit Proteinase K in 10 mM

Tris-HCL behandelt, um Nukleasen zu deaktivieren, die die Färbung behindern könnten, bevor für 60 min bei 37°C im Dunkeln das TUNEL-Reagenz (Sigma), die Desoxyribonuklotidyltranferase, auf die Schnitte aufgetragen wurde. Das Eindeckeln erfolgte mittels DAPI (4‘6-Diamidin-2‘-phenylindol-dihydrochlorid) Mounting Medium (Vectashield). Die Schnitte wurden innerhalb von 2 Tagen nach Färbung unter einem Leica SP8 8 STED super-resolution Confocal und FLIM Mikroskop mit einem HC PL APO CS2- Objektiv in 40-facher Vergrößerung betrachtet. Leica LAS AF 3 wurde als Software verwendet. Die Beurteilung erfolgte in fünf über die gesamte Niere verteilten Gesichtsfeldern. Es wurden mit Hilfe von ImageJ zunächst alle durch das DAPI Medium gefärbten Zellkerne und anschließend die durch das TUNEL-Reagenz detektierten apoptotischen Kerne gezählt. Daraus wurde der prozentuale Anteil der geschädigten Zellen berechnet und mit Hilfe des bekannten Scores eingeteilt.

3.2.3 Statistische Auswertung

Die im Ergebnisabschnitt dargestellten Daten aus den Tierversuchen beinhalten die Mittelwerte der jeweiligen Gruppe ± SEM (Standardfehler; Standard Error of the Mean). Der SEM wurde ab 3 Einzelwerten berechnet. Die statistische Signifikanz zwischen den Versuchsgruppen wurde mittels mehrfachem, ungepaartem t-Test ohne Annahme einer gemeinsamen Standardabweichung mit anschließender Holm-Sidak post-hoc Analyse ermittelt. Als statistisch signifikant galt eine Überschreitungswahrscheinlichkeit (p-Wert) von * $p < 0,05$. In den Diagrammen wurde die Signifikanz gegenüber der Kontrolle ND mit *, x, + und # gekennzeichnet. Alle nicht gekennzeichneten Werte zeigten keine Signifikanz.
In Diagrammen der histologischen Auswertung wurden die Mittelwerte ± SD dargestellt. Die Signifikanz gegenüber der Kontrolle ND wurde mit * gekennzeichnet. Die Anzahl der * gibt dabei die Stärke der Signifikanz an: * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$.
Nicht signifikante Ergebnisse wurden mit n.s. gekennzeichnet. Auch hier wurde der mehrfache, ungepaarte t-Test mit anschließender Holm-Sidak post-hoc Analyse verwendet. Alle Analysen wurden mit Software der Firma Graph Pad Software (Graph Pad Prism 6.05, La Jolla, USA) durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Vorversuche

In Vorversuchen wurde zunächst getestet, ab welcher Ischämiezeit eine im histologischen Schnitt deutliche Schädigung gesehen wird. Hierzu wurden insgesamt 15 Nieren nach 5 min, 30 min, 60 min, 90 min und 120 min Ischämiezeit und kurzer Spülung des Organs mit NaCl untersucht. Hierbei ergab sich, dass nach 30 min und 60 min histologisch noch keine starke Schädigung zu erkennen war. Nach 90 min konnten bereits Zeichen starker Schädigung (epitheliale Nekrosen, ödematöse Veränderungen, Verlust des tubulären Bürstensaums und Dilatation der Tubuli) erkannt werden und nach 120 min konnte sicher von einer starken Schädigung ausgegangen werden.

4.2 Normotherme isolierte Perfusion nach 120 min Ischämie

4.2.1 Perfusionsflussrate

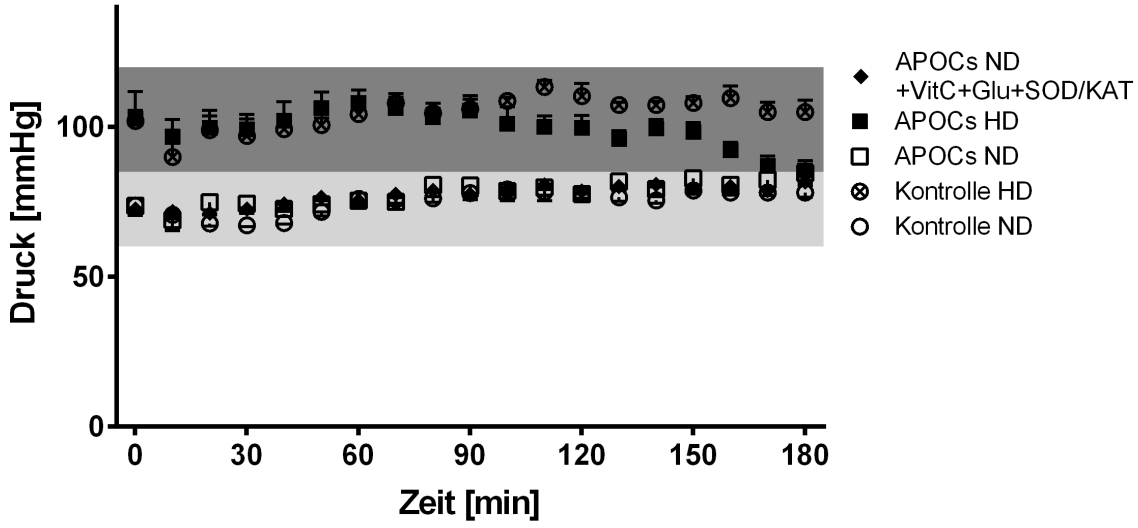


Abbildung 10: Perfusionsdruck: *Der Druck konnte in allen Perfusionsgruppen im Zielbereich gehalten werden. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM.*

Der Zieldruck von 60-85 mmHg, bzw. 85-120 mmHg konnte in allen Gruppen durch Anpassung der Perfusionsflussrate aufrecht erhalten werden (Abb. 10).

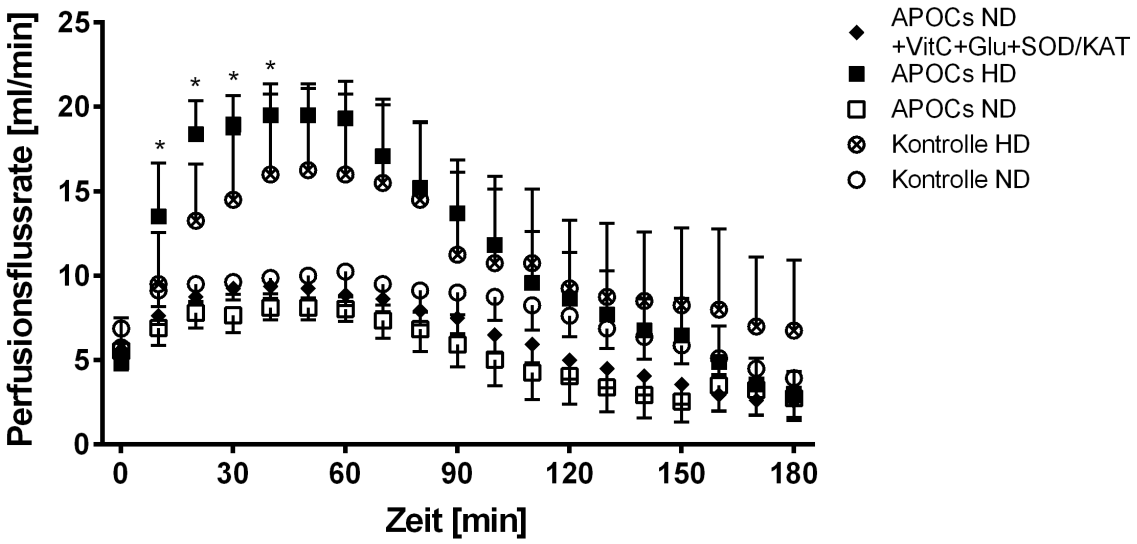


Abbildung 11: Perfusionsflussrate: *Die Perfusionsflussrate musste in allen Gruppen, der druckkontrollierten Perfusion geschuldet, nach ca. 60 min stetig reduziert werden. Die höchsten Flussraten, aber auch der höchste Regulationsbedarf waren hierbei in der Gruppe APOCs HD zu messen. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM. *p < 0,05, APOCs HD verglichen mit der Kontrolle ND.*

Die Perfusionsflussrate konnte jedoch druckkontrolliert in keiner Versuchsgruppe konstant gehalten werden (Abb. 11). In den Hochdruckgruppen war die Perfusionsflussrate mit durchschnittlich 10,24 ml/min (Kontrolle HD) und 11,74 ml/min (APOCs HD) grundsätzlich höher als in den Gruppen, in denen mit niedrigem Druck perfundiert wurde. In allen Gruppen musste der Fluss nach 60 min reduziert werden, um den geplanten Druck (60-85 mmHg, bzw. 85-120 mmHg) aufrecht zu erhalten. In der Kontrolle HD und der Gruppe APOCs HD war in den folgenden 60 min eine Reduktion um 6,75 ml/min bzw. 10,69 ml/min nötig, um den Zieldruck aufrecht zu erhalten. Nach 110 min war die Flussrate in der Gruppe APOCs HD so stark gesunken, dass sie unter der Flussrate in der Kontrolle HD lag.

In den Gruppen mit niedrigem Druck war die Reduktion innerhalb der folgenden 60 min des zuvor schon niedriger eingestellten Flusses mit 2,63 ml/min (Kontrolle ND),

3,98 ml/min (APOCs ND) und 3,87 ml/min (APOCs ND +VitC+Glu+SOD/KAT) geringer. In der Kontrolle HD wurde die Flussrate weiter bis auf 6,75 ml/min reguliert, während sie in der Gruppe APOCs HD bis auf 3 ml/min reduziert werden musste. In der Kontrolle ND lag die Flussrate nach 180 min noch bei 3,94 ml/min, in der Gruppe APOCs ND bei 2,75 ml/min und in der Gruppe APOCs ND +VitC+Glu+SOD/KAT bei 2,57 ml/min. Die geringste Regulation der Flussrate war somit in der Kontrolle ND nötig, gefolgt von den Gruppen APOCs ND und APOCs ND +VitC+Glu+SOD/KAT.

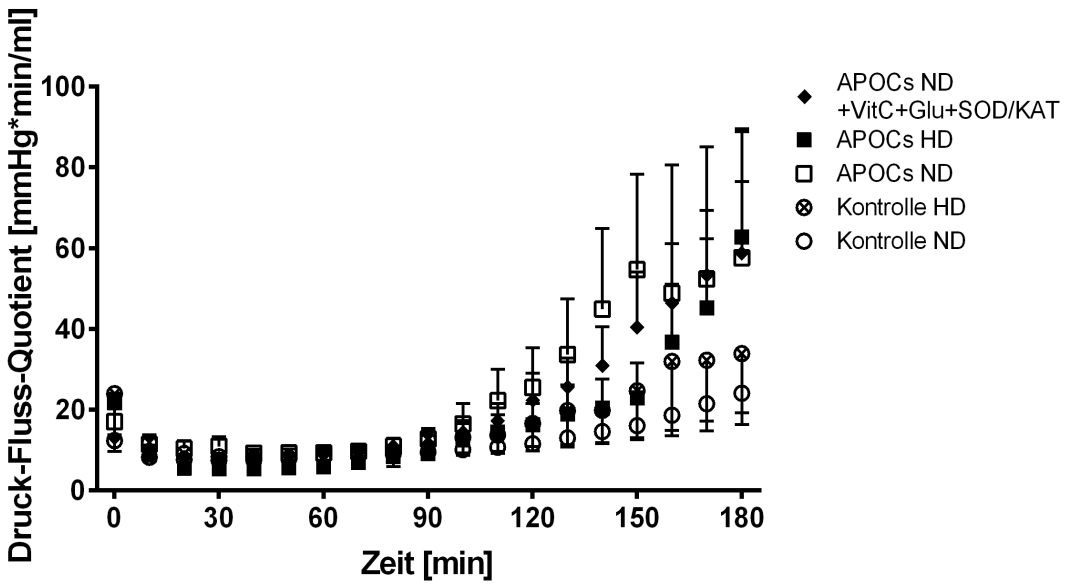


Abbildung 12: Druck-Fluss-Quotient: *Der Druck-Fluss-Quotient stieg in allen Gruppen ab 90 min verstärkt an. Während in den APOCs-freien Gruppen insgesamt nur ein geringer Anstieg erfolgte, kam es in den APOCs-Gruppen zu starken Anstiegen von bis zu 60 mmHg*min/ml. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM.*

Nach Berechnung des Druck-Fluss-Quotienten (Abb. 12) zeigte sich ab 90 min ein in den verschiedenen Gruppen jeweils unterschiedlich stark ausgeprägter Anstieg des Quotienten. Während in der Kontrolle ND nur ein leichter kontinuierlicher Anstieg zu verzeichnen war, zeigte sich in der Kontrolle HD besonders ab 160 min schon ein etwas größerer Anstieg. In der Gruppe APOCs ND erfolgte ebenfalls während der Perfusion über 150 min hinaus ein großer Anstieg auf Maximalwerte bis über 60 mmHg*min/ml. In den Gruppen APOCs HD und APOCs ND +VitC+Glu+SOD/KAT kam es bereits nach 110 min zu einem sichtlichen Anstieg des Quotienten auf Werte bis knapp unterhalb derer der Gruppe APOCs ND.

4.2.2 pH-Wert

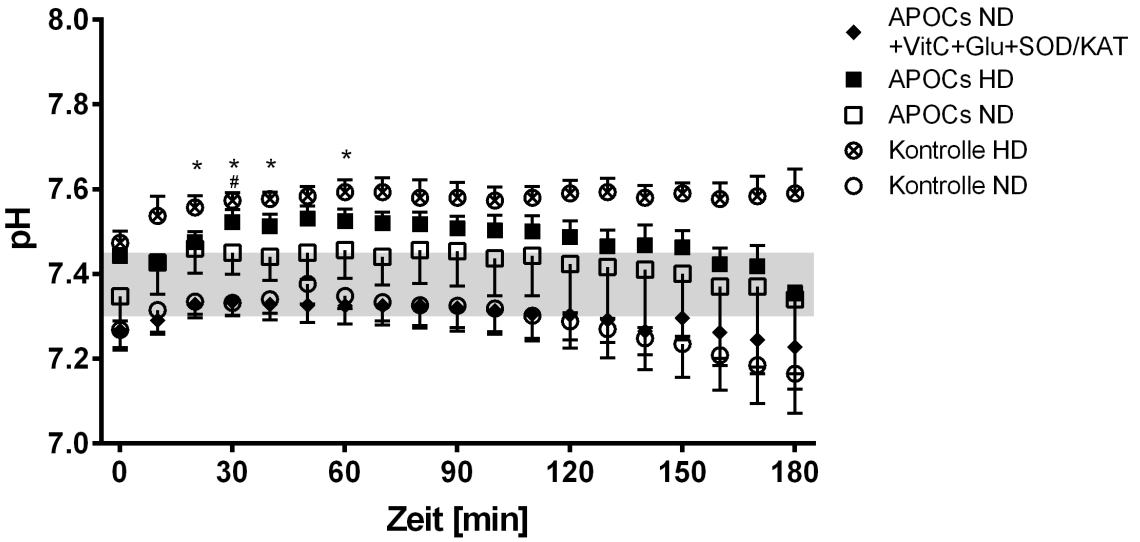


Abbildung 13: pH Perfusat: *Der pH-Wert des Perfusats, ermittelt über eine pH-Elektrode während der Perfusion, zeigte keine drastischen Veränderungen innerhalb der Gruppen. In allen Gruppen, bis auf die Kontrolle HD, kam es nach einem vorherigen Anstieg zu einem leichten Abfall des pH-Werts. Der Bereich zwischen 7,3 und 7,45 ist grau unterlegt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM. *p < 0,05, Kontrolle HD verglichen mit der Kontrolle ND; # p < 0,05, APOCs HD verglichen mit der Kontrolle ND.*

Abb. 13 zeigt, dass der auf 7,3-7,45 eingestellte pH-Wert in der Kontrolle HD im Verlauf der Perfusion mit der Zeit bis auf 7,59 anstieg, während er in den übrigen Gruppen, nach einem vorherigen leichten Anstieg bis 60-90 min auf Werte unterhalb des 0 min-Werts abfiel (Gruppen APOCs HD, APOCs ND+VitC+Glu+SOD/KAT, Kontrolle ND) oder nach einem leichten Anstieg auf den Ursprungswert abfiel (Gruppe APOCs ND). Signifikant war der Unterschied jedoch nur zwischen der Gruppe APOCs HD und der Kontrolle ND bei 30 min und 60 min, bzw. zwischen Kontrolle HD und Kontrolle ND nur bei 30 min. In der Kontrolle ND sank der pH-Wert bis auf 7,1. In den APOCs-haltigen Gruppen sank der pH-Wert auf 7,23 bis 7,35.
In der Gruppe APOCs ND +VitC+Glu+SOD/KAT sank der pH-Wert somit nur leicht unter den Ursprungs-pH-Wert. Die geringsten Schwankungen des pH-Werts wurden in der Gruppe APOCs ND festgestellt.

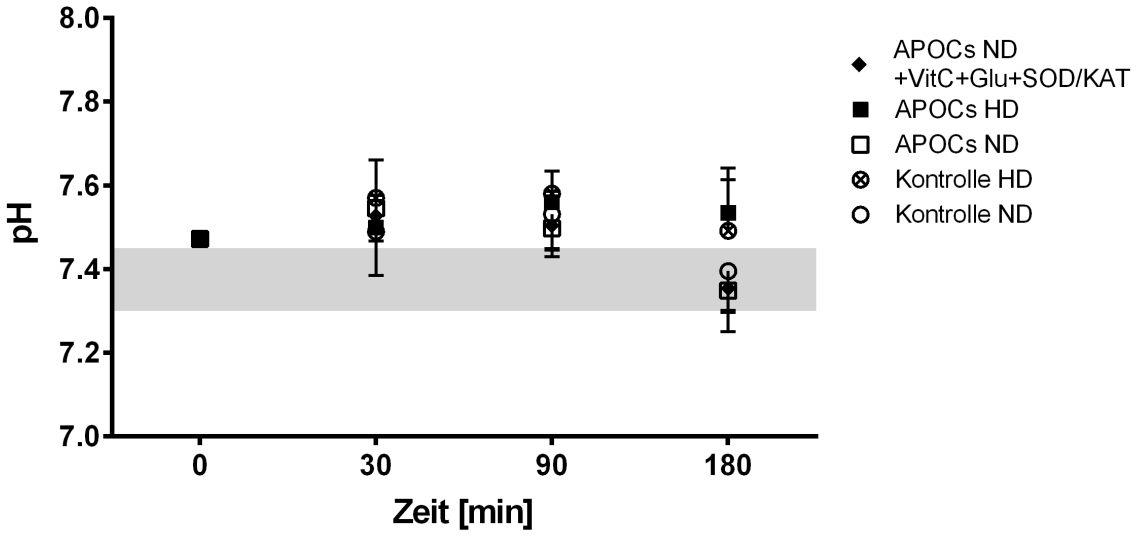


Abbildung 14: pH Perfusat aus BGA: *In der pH-Wert-Bestimmung des BGA-Geräts zeigte sich in der 180 min-Messung der Kontrolle ND und der Gruppen APOCs ND und APOCs ND +VitC+Glu+SOD/KAT ein Abfall. Der Bereich zwischen 7,3 und 7,45 ist grau unterlegt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM.*

Zusätzlich wurde der pH-Wert des Perfusats über eine Blugasanalyse bestimmt (Abb. 14). Hier zeigten sich in der 30 min- und 60 min-Messung nur geringe Unterschiede zwischen den Perfusionsgruppen. Die Unterschiede waren in diesem Messverfahren wesentlich geringer ausgeprägt als in der Messung über die pH-Elektrode im System. Aber auch hier zeigten sich in den Hochdruckgruppen tendenziell höhere pH-Werte, die in der 180 min-Messung nur einen geringen Abfall auf 7,49 (Kontrolle HD) bzw. 7,53 (Gruppe APOCs HD) zeigten. Der pH-Wert dieser Gruppen lag somit in der 180 min-Messung noch auf dem Niveau der pH-Werte der übrigen Gruppen in der 30 min und 90 min-Messung. In den Gruppen APOCs ND und APOCs ND +VitC+Glu+SOD/KAT, sowie der Kontrolle ND kam es nach stabilen Werten in der 30 min- und 90 min-Messung (7,49-7,54) zu einem Abfall in der 180 min-Messung auf 7,35-7,4. Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren in keiner Messung signifikant.
Der mittels BGA-Gerät gemessene Urin-pH-Wert lag über die gesamte Versuchsdauer in allen Gruppen bei 7,35.

4.2.3 Urinflussrate

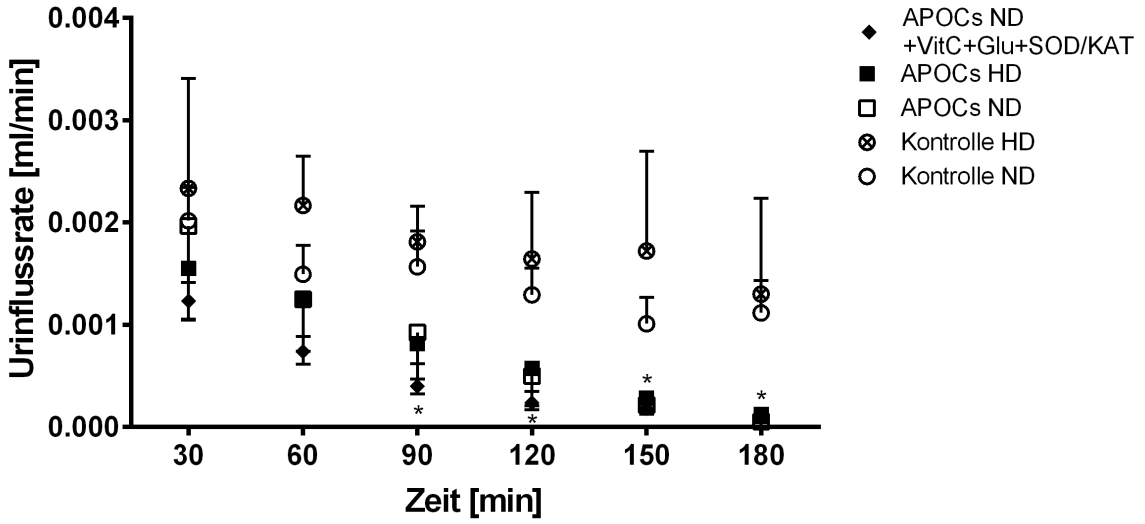


Abbildung 15: Urinflussrate: *Die Urinflussrate reduzierte sich in allen Gruppen während der Perfusion. In der Gruppe APOCs ND wurden nur 4 der 5 Nieren ausgewertet, da auf Grund von Problemen mit der Ureterkatheterisierung bei einer Niere keine Werte erhoben werden konnten. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM.*
**p < 0,05, APOCs ND+VitC+Glu+SOD/KAT verglichen mit der Kontrolle ND.*

Die Urinflussrate sank mit der Dauer der Perfusion (Abb. 15). In der Kontrolle HD, gefolgt von der Kontrolle ND, wurden insgesamt die höchsten Urinflussraten festgestellt, während in der Gruppe APOCs ND +VitC+Glu+SOD/KAT die geringste Urinflussrate gemessen wurde. Die Urinproduktion in den APOCs-freien Gruppen lag dauerhaft über der Urinproduktion der APOCs-Gruppen. Innerhalb der APOCs-Gruppen wurde in der Gruppe APOCs HD die höchste Urinflussrate gemessen. In den Gruppen APOCs ND und HD, sowie APOCs ND +VitC+Glu+SOD/KAT wurde nach 180 min Perfusion kaum noch Urinproduktion festgestellt, während in der Kontrolle HD und der Kontrolle ND noch ein Urinfluss zu messen war.

4.2.4 Cytochromspektren

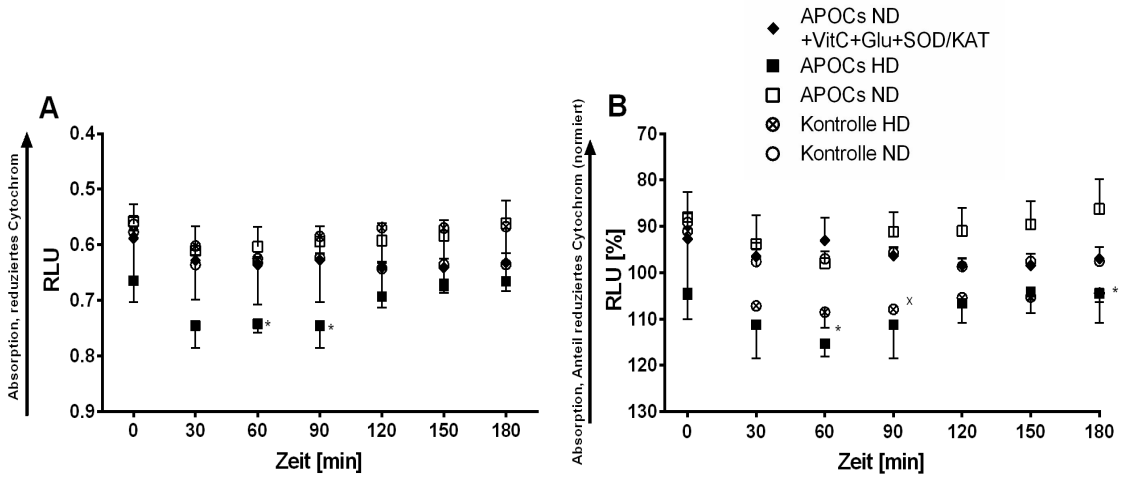


Abbildung 16: Zeitabhängiger Verlauf Cytochrom C: *A: Rohdaten, B: Normierung auf Absorptionsmaxima nach näherungsweise 0 min Ischämie; Im zeitabhängigen Verlauf der Absorptionsmaxima bei 555 nm (Cytochrom c) wird deutlich, dass bis zur 90 min-Messung die Werte der Gruppe APOCs HD weit unterhalb der Werte der übrigen Gruppen lagen, bevor sie sich ab 120 min annäherten. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM.*
**p < 0,05, APOCs HD verglichen mit der Kontrolle ND, X p < 0,05 Kontrolle HD verglichen mit der Kontrolle ND.*

Betrachtet man nur die Absorption bei 555 nm (Abb. 16) lässt sich der zeitabhängige Verlauf der Absorptionsmaxima für das Cytochrom c beurteilen. Es zeigt sich, dass die Werte (bis auf die, der Gruppe APOCs HD) bis 60 min sehr nah beieinander lagen. Während die Werte dieser Gruppen in der 0 min-Messung noch bei 0,56-0,59 RLU lagen, stiegen sie bis zur 30 min- und 90 min-Messung auf 0,6-0,64 RLU an. Ab 90 min sieht man die tendenzielle Differenz höherer Absorptionsmaxima in den Gruppen APOCs ND +VitC+Glu+SOD/KAT und Kontrolle ND, im Vergleich zur Gruppe APOCs ND und Kontrolle HD. Es wird deutlich wie sich diese Tendenz bis 180 min weiter fortsetzt.
Die Werte der Kontrolle HD und Gruppe APOCs ND fielen nach einem Abfall in der 90 min-Messung auf 0,58-0,6 RLU im weiteren Versuchszeitraum nur noch minimal ab. Die Werte der Kontrolle ND und der Gruppe APOCs ND +VitC+Glu+SOD/KAT hingegen stiegen in der 120 min-Messung nochmal minimal auf 0,64 RLU an, veränderten sich im weiteren Zeitraum jedoch ebenfalls kaum mehr.

Insgesamt kam es nach der ersten Messung bei 0 min zu einem Anstieg in allen Gruppen. Es wird hier deutlich, dass die Werte der Gruppe APOCs ND +VitC+Glu+SOD/KAT und Kontrolle ND weitgehend mit leichten Schwankungen stabil blieben, während die Werte der Gruppe APOCs ND und Kontrolle HD kontinuierlich fielen. Die Absorptionsmaxima der Gruppe APOCs HD lagen bereits in der 0 min-Messung signifikant niedriger als in den übrigen Gruppen. In der Messung nach 30 min fiel die gemessene Absorption in dieser Gruppe weiter ab, bevor sie bis zur 90 min-Messung stabil blieb. Ab der 120 min-Messung stiegen die Absorptionsmaxima dieser Gruppe und näherten sich den Werten der übrigen Gruppen mehr und mehr an.

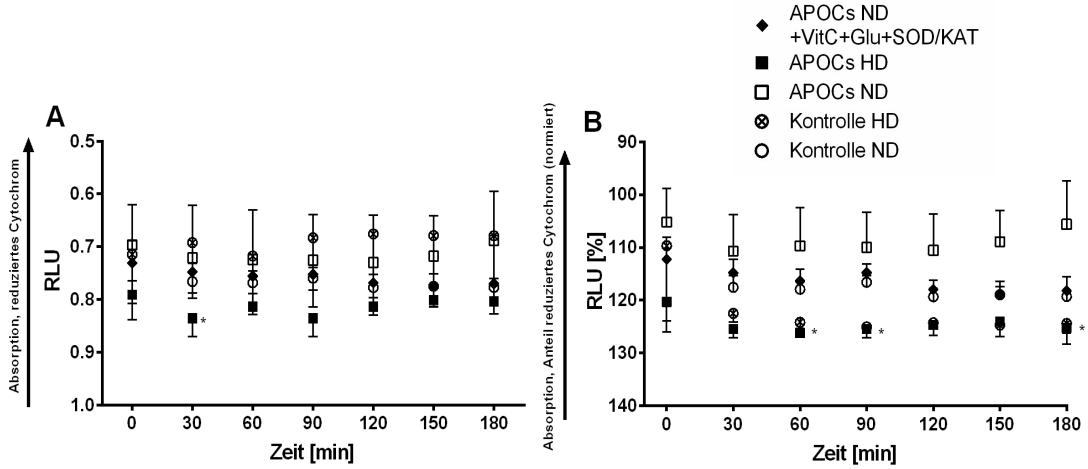


Abbildung 17: Zeitabhängiger Verlauf Cytochrom B

*A: Rohdaten, B: Normierung auf Absorptionsmaxima nach näherungsweise 0 min Ischämie; In den Absorptionsmaxima bei 565 nm (Cytochrom b) wird deutlich, dass Unterschiede zwischen den Gruppen hier bereits ab der 30 min-Messung zu sehen waren. Während die Werte der Gruppe APOCs ND noch lange in einem der 0 min-Messung ähnlichen Bereich blieben, kam es in den übrigen Gruppen hier direkt zu größeren Differenzen. Es zeigt sich, dass bis zur 90 min-Messung die Werte der Gruppe APOCs HD auch hier weit unterhalb der Werte der übrigen Gruppen lagen. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM. *p < 0,05, APOCs HD verglichen mit der Kontrolle ND.*

Auch bei der Betrachtung der Absorption für das Cytochrom b (Abb. 17) bestätigen sich die Ergebnisse der vorherigen Auswertung. Bereits ab 30 min zeigten sich die beschriebenen Differenzen zwischen den Gruppen. Insgesamt zeigt sich hier, dass die Werte der Kontrolle HD von 30 min an auf einem niedrigem Niveau lagen (0,69 RLU), während sich die Werte der Gruppe APOCs ND, nachdem sie sich nach einem Anstieg nach der ersten Messung bis 120 min recht stabil zwischen 7,2 und 7,3 RLU hielten, diesen annäherten. In der 0 min-Messung lagen die Werte der Kontrolle HD knapp über den Werten der 30 min-Messung. Für die Werte der Gruppe APOCs ND konnte von 0 min auf 30 min ein leichter Anstieg verzeichnet werden, wohingegen es in der Kontrolle HD hier zu einem Abfall kam. Die Werte der Kontrolle ND und der Gruppe APOCs ND +VitC+Glu+SOD/KAT stiegen im gesamten Versuchsablauf gesehen an. Der größte Anstieg lag zwischen der 0 min- und 30 min-Messung. Die Werte lagen ab 30 min mit 0,745-0,77 RLU (Gruppe APOCs ND +VitC+Glu+SOD/KAT) bzw. 0,765-0,78 RLU (Kontrolle ND) auf einem Niveau, welches sich bis 180 min mit nur geringem Anstieg hielt. Die Werte der Gruppe APOCs HD lagen im gesamten Messzeitraum zwischen 0,79 und 0,84 RLU und somit dauerhaft oberhalb derer der übrigen Gruppen. Auch für das Cytochrom b zeigte sich hier ein ähnlicher Verlauf wie für das Cytochrom c. Ab 120 min näherten sich auch hier die zuvor hohen Absorptionsmaxima für die Gruppe APOCs HD den Werten der übrigen Gruppen an.

4.2.5 Osmolarität

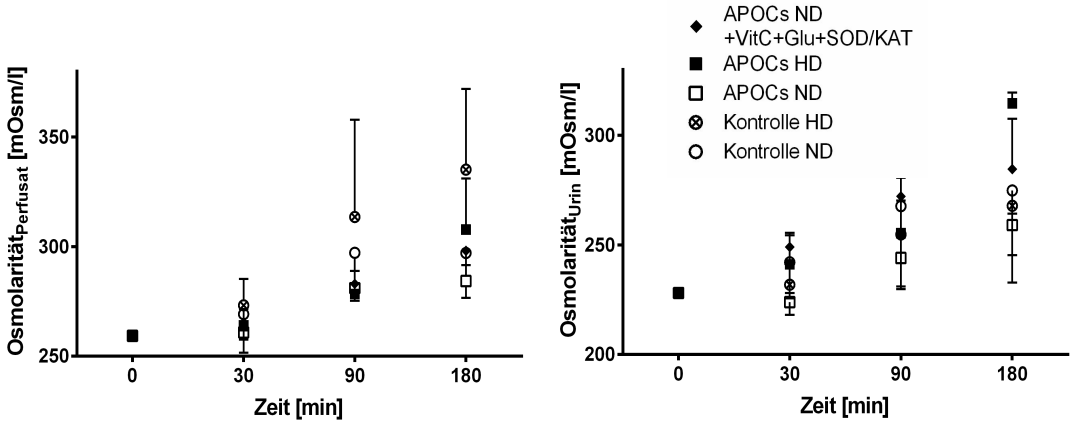


Abbildung 18: Osmolarität Perfusat: *Die Osmolarität stieg in allen Gruppen sowohl im Perfusat als auch im Urin im Versuchsablauf an. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM.*

Die Osmolarität im Perfusat stieg in allen Versuchsgruppen im Laufe der Perfusion an (Abb. 18). In der Messung des Perfusats nach 30 min konnte noch in keiner Gruppe eine signifikante Erhöhung der Osmolarität gemessen werden. Der größte Anstieg der Perfusion konnte in der Kontrolle HD festgestellt werden. Hier stieg die Osmolarität von 262,75 mOsm/l (0 min) auf 335,13 mOsm/l (180 min). Die Osmolarität stieg in dieser Gruppe bereits nach 90 min Perfusion stark an (313,47 mOsm/l). In den Gruppen APOCs HD sowie APOCs ND +VitC+Glu+SOD/KAT erfolgte ein kontinuierlicher Anstieg der Osmolarität auf 307 mOsm/l (Gruppe APOCs HD) bzw. 298 mOsm/l (Gruppe APOCs ND +VitC+Glu+SOD/KAT), während die Osmolarität in der Kontrolle ND mit 297-298 mOsm/l und in der Gruppe APOCs ND mit 283-284 mOsm/l nach 90 min konstant blieb. Allerdings lag die Osmolarität in der Kontrolle ND schon in der Messung nach 90 min höher als in den APOCs-Gruppen.

Die Osmolarität im Urin stieg ebenfalls in allen Versuchsgruppen bis 180 min an.
Nach 30 min lagen die Werte der Kontrolle HD (232 mOsm/l) und der Gruppe APOCs ND (224 mOsm/l) unter den Werten der übrigen Gruppen (242-249 mOsm/l). Auch in der 90 min-Messung wurden die niedrigsten Werte in der Kontrolle HD (255 mOsm/l) und der Gruppe APOCs ND (244 mOsm/l) bestimmt. Außerdem stimmte die Osmolarität der Kontrolle HD hier mit der Osmolarität der Gruppe APOCs HD überein.
In der 180 min-Messung fielen besonders der hohe Wert (315 mOsm/l) und der große Anstieg um 70 mOsm/l in der Gruppe APOCs HD auf. In den übrigen Gruppen stieg die Osmolarität in der 180 min-Messung im Vergleich zur 90 min-Messung nochmal um 7-15 mOsm/l an.

4.2.6 Sauerstoffsättigung des Perfusats und Sauerstoffverbrauch der Niere

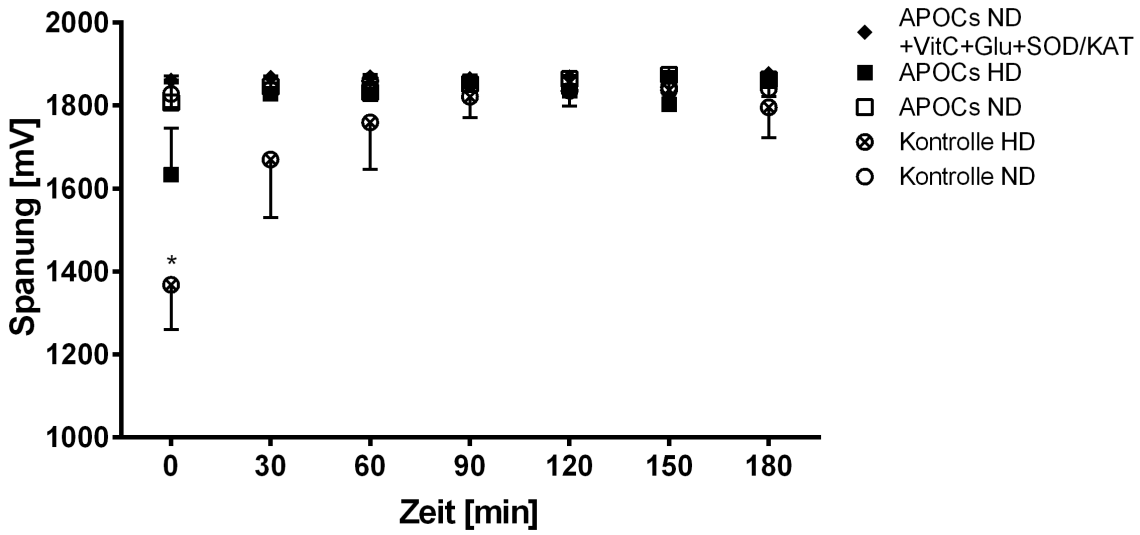


Abbildung 19: Sauerstoffkonzentration Perfusat – 0 min: *Die Sauerstoffkonzentration des Perfusats vor Eintritt in die Niere konnte in allen Gruppen bis zum Versuchsende stabil gehalten werden. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM. *p < 0,05, Kontrolle HD verglichen mit der Kontrolle ND.*

Die Messung der Spannung gilt als Maß für die Sauerstoffkonzentration des Perfusats. Die Ziel-Konzentration konnte bei einer Messung von 1800 mV in allen Gruppen erreicht werden (Abb. 19). Sie wurde außerdem in allen Versuchsgruppen stabil aufrecht erhalten. Insgesamt zeigten sich lediglich geringe Schwankungen und Unterschiede zwischen den Gruppen.

Hierbei kann, bei Annahme einer vollständigen Äquilibrierung mit Carbogengas, von vernachlässigbaren systemischen Fehlern ausgegangen werden. Das verzögerte Erreichen der Spannung von 1800 mV, vor allem in der Kontrolle HD, steht im Zusammenhang mit technischen Fehlern in der Versuchsdurchführung, die in nachfolgenden Versuchen eliminiert wurden.

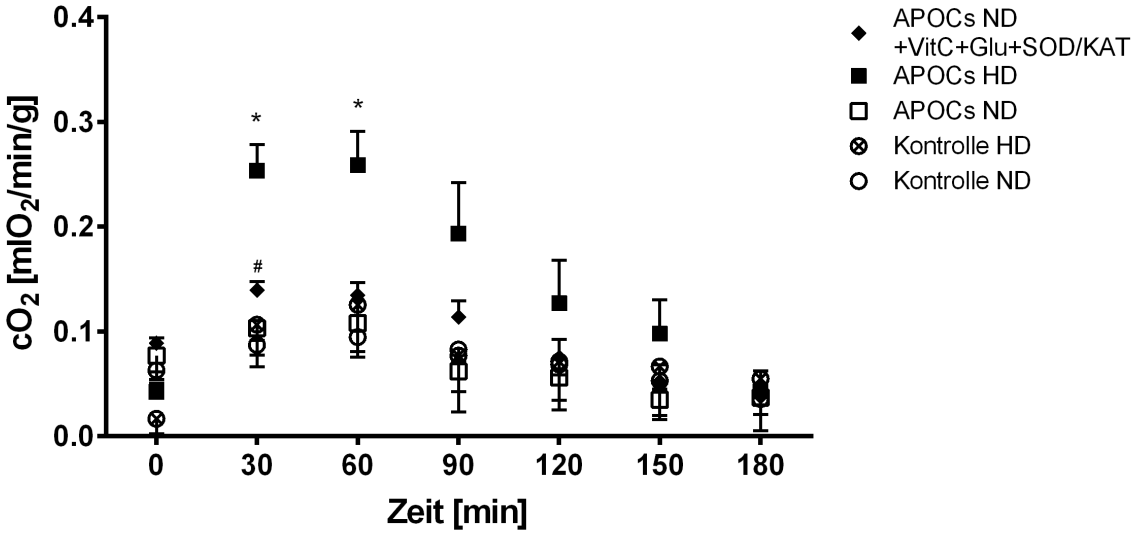


Abbildung 20: Sauerstoffverbrauch: *Der Sauerstoffverbrauch nahm nach einem anfänglichen Anstieg in allen Gruppen ab. In der Gruppe APOCs HD wurde während der gesamten Perfusion der höchste Verbrauch gemessen. In den Messungen der ersten Versuche der Hochdruckgruppen kam es durch technische Fehler zu niedrigeren Werten. Während des Versuchs stieg die Sauerstoffkonzentration des Perfusats jedoch auch hier auf die gewünschten Werte an. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM.*p < 0,05, APOCs HD verglichen mit der Kontrolle ND; # p < 0,05, APOCs ND+VitC+Glu+SOD/KAT verglichen mit der Kontrolle ND.*

Der Sauerstoffverbrauch stieg bis 60 min in allen Gruppen an, bevor er anschließend kontinuierlich abfiel (Abb. 20). In fast allen Gruppen lag der Sauerstoffverbrauch dabei nie über 0,15 mlO_2/min/g. Lediglich in der Gruppe APOCs HD konnten in der 30 min- und 60 min-Messung signifikant erhöhte Werte über 0,2 ml O_2/min/g erreicht werden. Auch hier begann ab 60 min jedoch ein Abfall des Sauerstoffverbrauchs. Die Werte der Gruppe APOCs ND +VitC+Glu+SOD/KAT lagen in den übrigen Messungen noch am höchsten, während die Werte der Kontrolle ND und der Gruppe APOCs ND am niedrigsten waren.

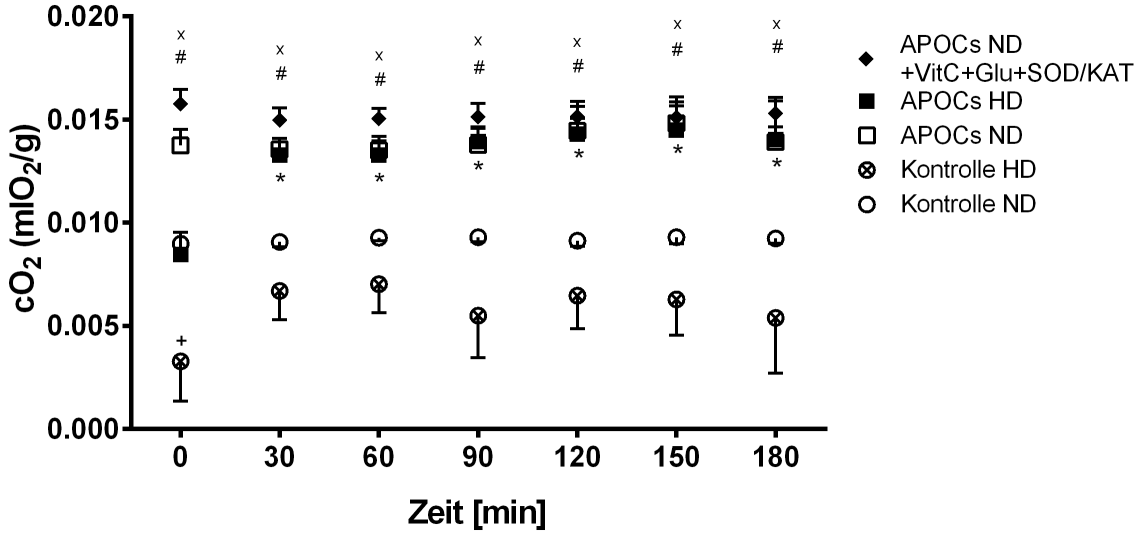


Abbildung 21: Sauerstoffverbrauch modifiziert: *Bei Betrachtung des Sauerstoffverbrauchs in ml ohne Berücksichtigung der Flussrate zeigten sich für alle Gruppen vergleichsweise konstante Werte. Unter Kapselzufuhr lag hier der Verbrauch dauerhaft im höheren Bereich. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM. *p < 0,05, APOCs HD verglichen mit der Kontrolle ND; + p< 0,05, Kontrolle HD verglichen mit der Kontrolle ND; # p < 0,05, APOCs ND verglichen mit der Kontrolle ND, X p < 0,05, APOCs ND +VitC+Glu+SOD/KAT verglichen mit der Kontrolle ND.*

Erfolgte die Berechnung des Sauerstoffverbrauchs ohne Berücksichtigung der Flussrate, zeigen sich deutlich andere Verhältnisse zwischen den Gruppen (Abb. 21). Hier waren die Werte in der Kontrolle HD denen der Kontrolle ND unterlegen. In beiden Gruppen lagen die Werte jedoch unter 0,01 ml O_2. In der Gruppe APOCs ND +VitC+Glu+SOD/KAT wurde mit 0,015 ml der höchste Wert ermittelt. Aber auch in den Gruppen APOCs ND und APOCs HD lagen die Werte deutlich über denen der Kontrollgruppen. In allen Gruppen waren die Werte über den Versuchszeitraum hinweg mit leichten Schwankungen stabil.

4.2.7 Glomeruläre Filtrationsrate

Abbildung 22: GFR: *Es wurde in allen Gruppen eine sehr niedrige GFR bestimmt. Während die Werte in der Kontrolle ND noch etwas niedriger waren, unterschieden sich die Werte der restlichen Gruppen kaum. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM.*

Die GFR war in allen Versuchsgruppen sehr gering (Abb. 22). Sie erreichte in den meisten Bestimmungen negative Werte. In der Kontrolle ND wurden die niedrigsten Werte bestimmt. In der 180 min-Messung lag die GFR hier unter -0,0002 ml/min. Die Werte der übrigen Gruppen unterschieden sich kaum. Lediglich die erste Bestimmung nach 30 min in der Gruppe APOCs HD ergab mit gemittelt 0,00008 ml/min einen geringfügig höheren Wert als in den übrigen Gruppen.

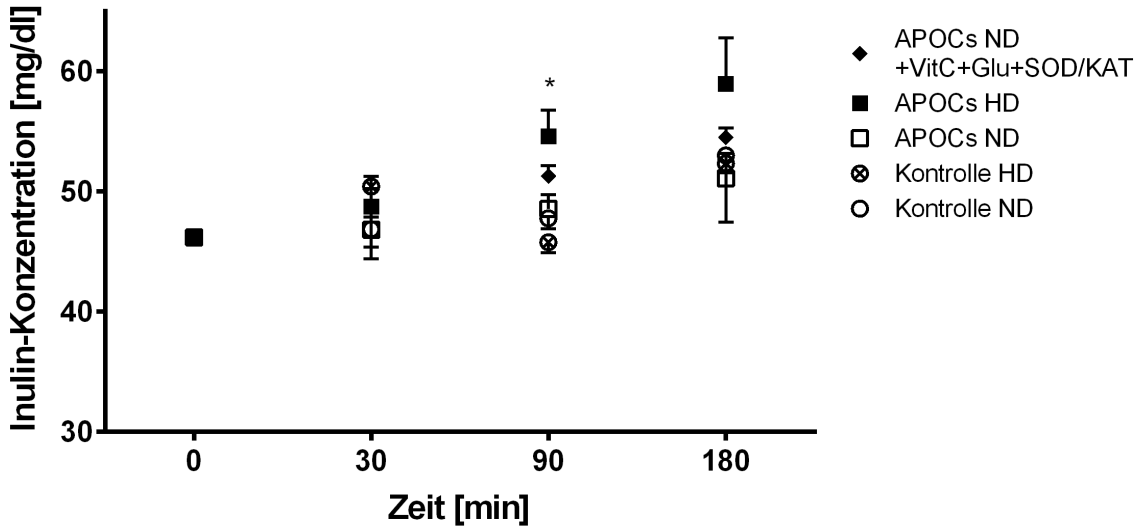


Abbildung 23: Inulinkonzentration Perfusat: *Die Inulinkonzentration im Perfusat zeigte in allen Gruppen insgesamt einen Anstieg. Die höchsten Werte wurden in der Gruppe APOCs HD gemessen. Lediglich in der Kontrolle HD wurde in der 90 min-Messung ein Abfall im Vergleich zur Baseline gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM.*
**p < 0,05, APOCs HD verglichen mit der Kontrolle ND.*

Betrachtet man lediglich die im Perfusat gemessene Inulinkonzentration wird deutlich, dass sich die Werte in der Messung nach 30 min kaum unterschieden (Abb. 23).
Ab 90 min jedoch kann man sehen, dass es tendenzielle Unterschiede zwischen den Gruppen gab. Insgesamt stieg die Inulinkonzentration in allen Gruppen an. Die Werte der Kontrolle HD lagen in der 90 min-Messung mit 45 mg/dl am niedrigsten. Hier konnte ein Abfall im Vergleich zur 30 min-Messung festgestellt werden. In der Kontrolle ND und der Gruppe APOCs ND wurden hier Werte zwischen 47 und 49 mg/dl gemessen. Diese Werte lagen nur minimal oberhalb derer der 30 min-Messung. In den Gruppen APOCs HD und APOCs ND +VitC+Glu+SOD/KAT kam es nach 90 min zu einem wesentlich größeren Anstieg der Konzentration auf Werte über 50 mg/dl.
Nach 180 min ließ sich ein Wiederanstieg der Inulinkonzentration auf 50 mg/dl in der Kontrolle HD erkennen. In den übrigen Gruppen stieg die Konzentration im Vergleich zur vorherigen Messung weiter an. Während die Inulinkonzentration in den Gruppen APOCs ND +VitC+Glu+SOD/KAT und APOCs ND lediglich um 3,23mg/dl bzw. 2,5mg/dl stieg,

stieg die Konzentration in den Gruppen APOCs HD und der Kontrolle ND um über 5mg/dl. In der Gruppe APOCs HD wurden Werte von fast 60mg/dl erreicht.

4.2.8 Elektrolyte/Fraktionelle Exkretion von Na^+-/K^+/Glukose

4.2.8.1 Natrium

Exemplarisch wurde für die Gruppe APOCs ND +VitC+Glu+SOD/KAT die fraktionelle Exkretion von Natrium berechnet (Tabelle 10).

	Na^+ (Perfusat) [mg/dl]	Na^+ (Urin) [mg/gl]	Inulin (Perfusat) [mg/dl]	Inulin (Urin) [mg/dl]	$FeNa^+$ [%]
30 min	281,51	288,15	45,8	4,2	1116,12
90 min	282,031	297,5	45,48	4,52	1061,38
180 min	282,62	289,61	45,66	4,34	1078,09

Tabelle 10: Exemplarische Berechnung der fraktionellen Exkretion von Natrium

Auf Grund des starken Einflusses der niedrigen Urinmenge und der hohen Osmolarität auf die Inulinkonzentration im Perfusat und somit die Berechnung der fraktionellen Exkretion wurden weitere Ergebnisse lediglich in Form der Konzentration der Elektrolyte und Glukose festgehalten.

In den Auswertungen zur Natrium-, Kalium-, sowie Glukosekonzentration im Urin fehlt auf Grund zu geringer Urinproduktion in der Kontrolle HD der 30 min-Wert einer Niere, zwei 180 min-Werte in der Gruppe APOCs HD, zwei 180 min-Werte in der Gruppe APOCs ND, sowie vier 180 min-Werte in der Gruppe APOCs ND +VitC+Glu+SOD/KAT. In der Gruppe APOCs ND konnte zusätzlich bei der Perfusion einer Niere auf Grund von Problemen mit der Ureterkatheterisierung keine Messung erhoben werden.
Für die gemittelten 0 min-Werte aller Gruppen wird in den folgenden Diagrammen keine Standardabweichung angegeben.

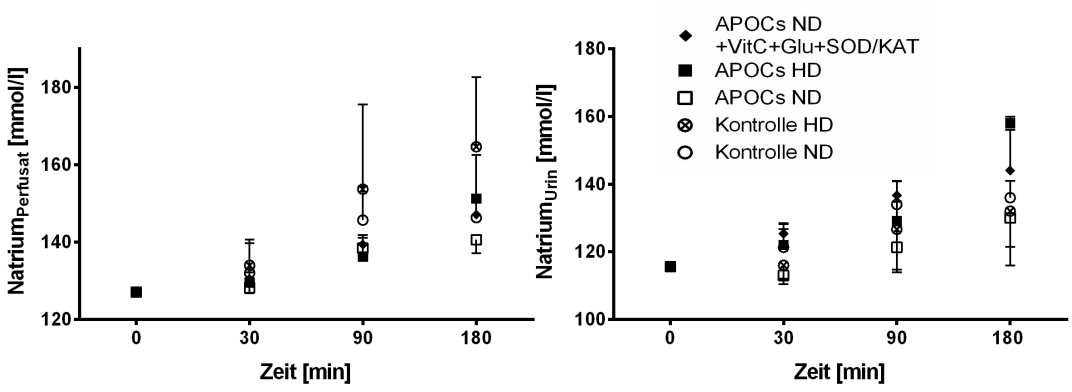


Abbildung 24: Natriumkonzentration: *Insgesamt stieg die Natriumkonzentration sowohl im Perfusat, als auch im Urin an. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM.*

Die Natriumkonzentration im Perfusat (Abb. 24) stieg in allen Gruppe im Versuchszeitraum an. In der ersten Messung nach 30 min zeigte sich ein erster leichter Anstieg, jedoch noch kein deutlicher Unterschied zwischen den Gruppen. In den nach 90 min entnommenen Proben zeigten sich mit Werten von 145 mmol/l bzw. 153 mmol/l in der Kontrolle ND bzw. Kontrolle HD bereits erhöhte Werte im Vergleich zu den übrigen Gruppen. Vor allem in der Kontrolle HD stieg die Natriumkonzentration noch weiter stark an. Hier wurden Werte von 165 mmol/l erreicht. Nach 180 min wurde in der Kontrolle ND und der Gruppe APOCs ND kein weiterer größerer Anstieg gemessen. Zu diesem Zeitpunkt kam es wiederum in der Gruppe APOCs HD zu einem Anstieg von 15 mmol/l, sowie einem Anstieg von 8 mmol/l in der Gruppe APOCs ND +VitC+Glu+SOD/KAT.

Die Natriumkonzentration im Urin zeigte insgesamt eine ansteigende Tendenz.
In den Messungen nach 30 min wurden in der Kontrolle HD und der Gruppe APOCs ND mit 116 mmol/l bzw. 113 mmol/l etwas niedrigere Konzentrationen gemessen als in den übrigen Gruppen (> 121 mmol/l). In der 90 min-Messung kam es in allen Gruppen zu einem weiteren Anstieg. In der Gruppe APOCs ND wurde in allen Messungen die niedrigste Natriumkonzentration ermittelt. Die Konzentration in der 90 min-Messung lag nach einem Anstieg im Vergleich zur 30 min-Mesung bei 121 mmol/l. In der Kontrolle ND und der Gruppe APOCs ND +VitC+Glu+SOD/KAT wurden Werte über 133 mmol/l gemessen, während die Konzentrationen in der Gruppe APOCs HD und der Kontrolle HD unter 130 mmol/l lagen.

In der letzten Messung nach 180 min wurde in der Kontrolle ND kaum eine Veränderung der Konzentration gemessen. In den übrigen Gruppen kam es zu einem weiteren Anstieg. In der Gruppe APOCs HD stieg die Konzentration mit einem Anstieg von über 31 mmol/l auf 158 mmol/l am stärksten an.

4.2.8.2 Kalium

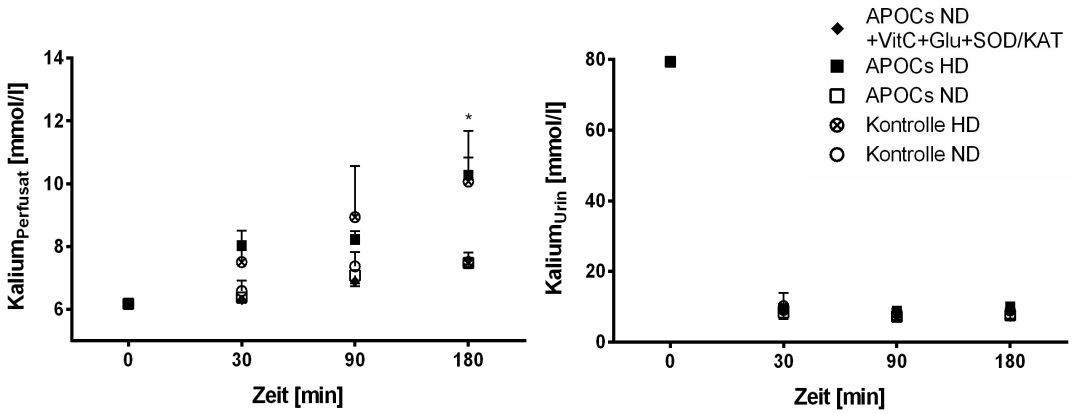


Abbildung 25: Kaliumkonzentration: *Die Kaliumkonzentration stieg im Perfusat in allen Gruppen im Verlauf an. Im Urin hingegen fiel sie bereits in der ersten Messung nach 30 min im Vergleich zum Blasenurin stark ab. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM. *p < 0,05, APOCs HD verglichen mit der Kontrolle ND.*

Die Kaliumkonzentration im Perfusat stieg mit längerer Perfusionsdauer in allen Gruppen an (Abb. 25). In den Gruppen mit niedrigem Druck zeigte sich lediglich ein geringer Anstieg. In der Messung nach 180 min waren die Werte mit 7,5 mmol/l in allen drei Gruppen nahezu identisch. Ein wesentlich größerer Anstieg konnte in den Hochdruckgruppen beobachtet werden. Nachdem in der Gruppe APOCs HD in der 30 min-Messung ein Anstieg von 6 mmol/l auf 8 mmol/l erfolgte, stieg die Konzentration in der Folgemessung nur noch minimal. In der Messung nach 180 min konnte erneut ein großer Anstieg auf über 10 mmol/l gemessen werden. Die Kaliumkonzentration in der Kontrolle HD stieg kontinuierlich an und erreichte ebenfalls 10 mmol/l.

Während im Blasenurin für die Kaliumkonzentration noch Werte von fast 80 mmol/l gemessen wurden, fiel die Konzentration in allen Gruppen bereits in der ersten Messung nach 30 min auf unter 10 mmol/l ab. In allen Gruppen kam es in der 90 min-Messung zu einem weiteren Abfall der Kaliumkonzentration, bevor in der 180 min-Messung die Konzentration wieder anstieg. In der Kontrolle ND kam es nach einem erneuten Abfall um 2 mmol/l in der 90 min-Messung zu einem eher geringen Anstieg in der 180 min-Messung. In der Kontrolle HD lagen die Werte insgesamt 1-1,5 mmol/l über denen der Kontrolle ND, zeigten jedoch einen ähnlichen Verlauf. In der Gruppe APOCs ND betrug der Abfall 1,2 mmol/l, bevor die Konzentration um 0,4 mmol/l anstieg.
In der Gruppe APOCs HD war der Anstieg in der 180 min-Messung mit über 1,5 mmol/l auf 10 mmol/l besonders deutlich. In der Gruppe APOCs ND +VitC+Glu+SOD/KAT kam es zunächst zum größten Abfall von 2 mmol/l, bevor die Konzentration wieder auf 8,8 mmol anstieg. Insgesamt lag die Konzentration in den Hochdruckgruppen über der Konzentration in den mit niedrigem Druck perfundierten Gruppen. Die Werte der Gruppe APOCs ND +VitC+Glu+SOD/KAT lagen in der 30 min- und 180 min-Messung jedoch sehr nah an den in den Hochdruckgruppen erhobenen Werten.

4.2.8.3 Glukose

Auch hier wurde darauf verzichtet eine Rückresorption zu berechnen, da durch die niedrige Urinflussrate keine aussagekräftigen Werte berechnet werden konnten.
Stattdessen wurden auch hier die Werte in Perfusat und Urin verglichen.

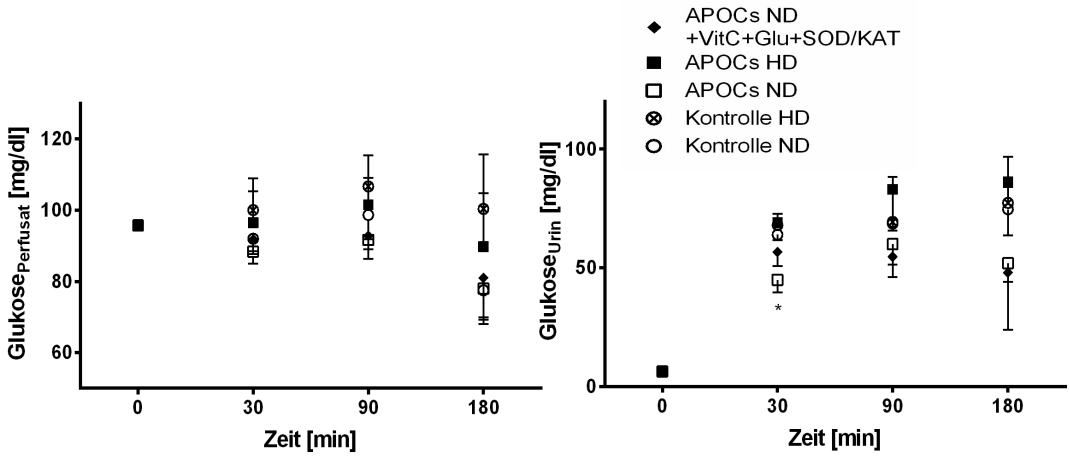


Abbildung 26: Glukosekonzentration: *Die Glukosekonzentration im Perfusat lag in den Hochdruckgruppen über den gesamten Versuchszeitraum über der der übrigen Gruppen. Hier erfolgte bis 90 min ein Anstieg der Konzentration, bevor es in der 180 min-Messung zu einem Abfall kam. In den übrigen Gruppen kam es nach einem anfänglichen Abfall der Konzentration nach 30 min, zunächst zu einem Anstieg der Konzentration, gefolgt von einem erneuten Abfall nach 180 min. Die Glukosekonzentration im Urin stieg in allen Gruppen schon in der ersten Messung stark an. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM. *p < 0,05, APOCs ND verglichen mit der Kontrolle ND.*

Der stärkste Abfall der Glukosekonzentration im Perfusat wurde in der Gruppe APOCs ND und Kontrolle ND, gefolgt von der Gruppe APOCs ND +VitC+Glu+SOD/KAT beobachtet (Abb. 26). In den beiden Hochdruckgruppen wurde bis 90 min ein Anstieg der Konzentration gemessen. In der 180 min-Messung zeigte sich dann ein Abfall, der in der Kontrolle HD aber mit einem Wert von 100 mg/dl noch über dem Wert der 0 min-Messung lag. In der Gruppe APOCs HD erfolgte ein Abfall über 10 mg/dl auf unter 90 mg/dl und somit unter den Wert der 0 min-Messung von 96 mg/dl. Die Werte der Gruppe APOCs ND +VitC+Glu+SOD/KAT, sowie der Gruppe APOCs ND und Kontrolle ND lagen bereits in der 30 min-Messung unter dem 0 min-Wert. In der Messung nach 90 min zeigte sich in allen drei Gruppen ein Anstieg der Konzentration. Lediglich in der Kontrolle ND lag der

Anstieg bei mehr als 3 mg/dl, womit die Konzentration auf 89,7 mg/dl, und somit knapp über den Wert der 0 min-Messung, stieg. In der 180 min-Messung fiel die Konzentration auch in diesen Gruppen erneut stark ab. Die niedrigsten Werte wurden hier mit 68,8 mg/dl in der Gruppe APOCs ND erreicht. In der Kontrolle ND und der Gruppe APOCs ND +Vitc+Glu+SOD/KAT lagen die Werte mit 77-81 mg/dl auch noch deutlich unter denen der Hochdruckgruppen.

Im Urin zeigte sich in allen Gruppen bereits ab 30 min ein starker Anstieg der Glukosekonzentration im Urin. Hier wurde die niedrigste Konzentration mit 40 mg/dl nach 30 min in der Gruppe APOCs ND gemessen. Auch die Konzentration der Gruppe APOCs ND +VitC+Glu+SOD/KAT lag mit 57 mg/dl unter der Konzentration, die in den übrigen Gruppen gemessen wurde (>64 mg/dl). Während die Konzentration in der Gruppe APOCs ND +VitC+Glu+SOD/KAT zwischen 30 min und 180 min stetig leicht abfiel, stieg sie in der Gruppe APOCs ND zunächst von 45 mg/dl auf 60 mg/dl an, bevor sie wieder auf 52 mg/dl abfiel. Die Konzentrationen in der Kontrolle HD und der Kontrolle ND unterschieden sich zu den verschiedenen Messzeitpunkten kaum. Insgesamt stieg die Konzentration hier stetig an und erreichte Werte von über 75 mg/dl. Die Werte lagen hier dauerhaft über denen der Gruppen APOCs ND und APOCs ND +VitC+Glu+SOD/KAT. Die dauerhaft höchsten Werte wurden in der Gruppe APOCs HD gemessen.
Nach 30 min lagen die zugehörigen Werte noch nah bei denen der Kontrollgruppen, bevor die Konzentration in der 90 min-Messung auf über 80 mg/dl anstieg. In der 180 min-Messung wurde der Höchstwert von 86 mg/dl gemessen.

4.2.9 Histologische und immunhistochemische Auswertung

4.2.9.1 Histologie

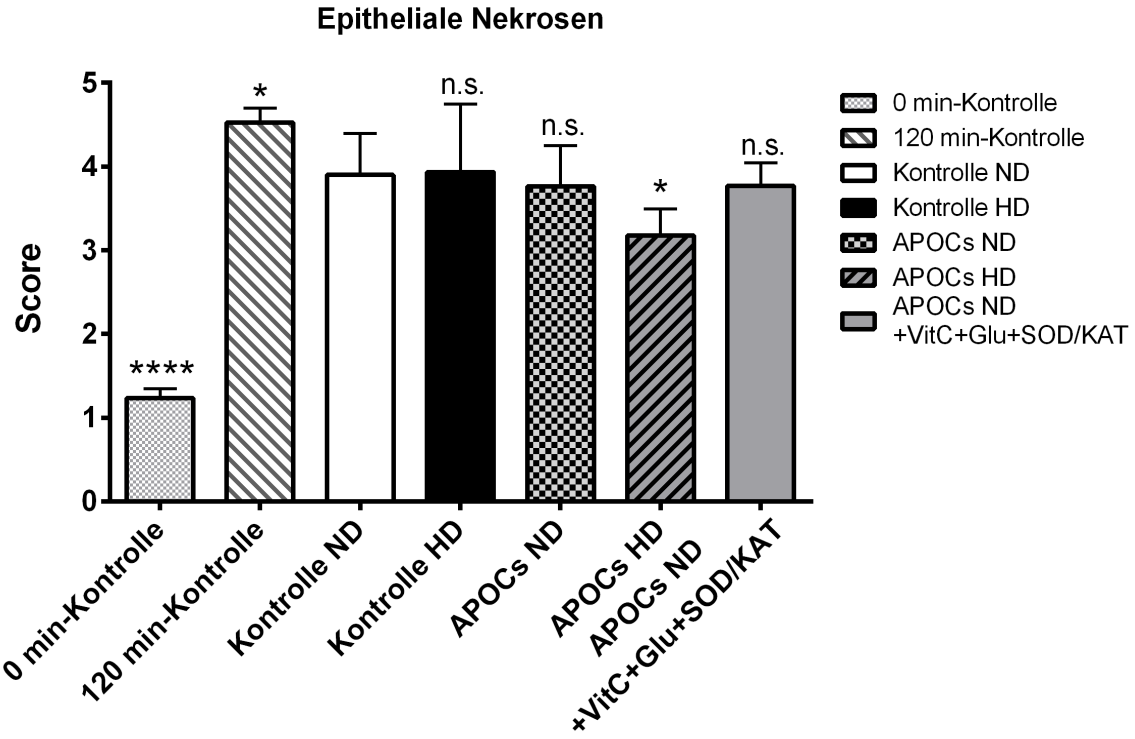


Abbildung 27: Epitheliale Nekrosen: *Die Menge der epithelialen Nekrosen lag in allen Perfusionsgruppen unter der Menge der epithelialen Nekrosen in der 120 min-Kontrolle. Innerhalb der Gruppen konnten, bis auf eine geringere Ausprägung in der Gruppe APOCs HD, keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD. * p < 0,05; **p<0,01; ***p<0,001; n.s. = nicht signifikant, verglichen mit der Kontrolle ND.*

In der PAS-Färbung wurde in der 120 min-Kontrolle für die epithelialen Nekrosen ein signifikant höherer Score (4,5) ermittelt als für die epithelialen Nekrosen in den perfundierten Nieren (Abb. 27). Der Score der 0 min-Kontrolle lag mit 1,23 weit unter den Scores der 120 min-Kontrolle und der Perfusionsgruppen.
Der Score in den perfundierten Nieren war in den verschiedenen Gruppen weitgehend identisch (3,76-3,93). Lediglich in der Gruppe APOCs HD konnte eine signifikant geringere Schädigung nachgewiesen werden. Hier betrug der Score 3,18.

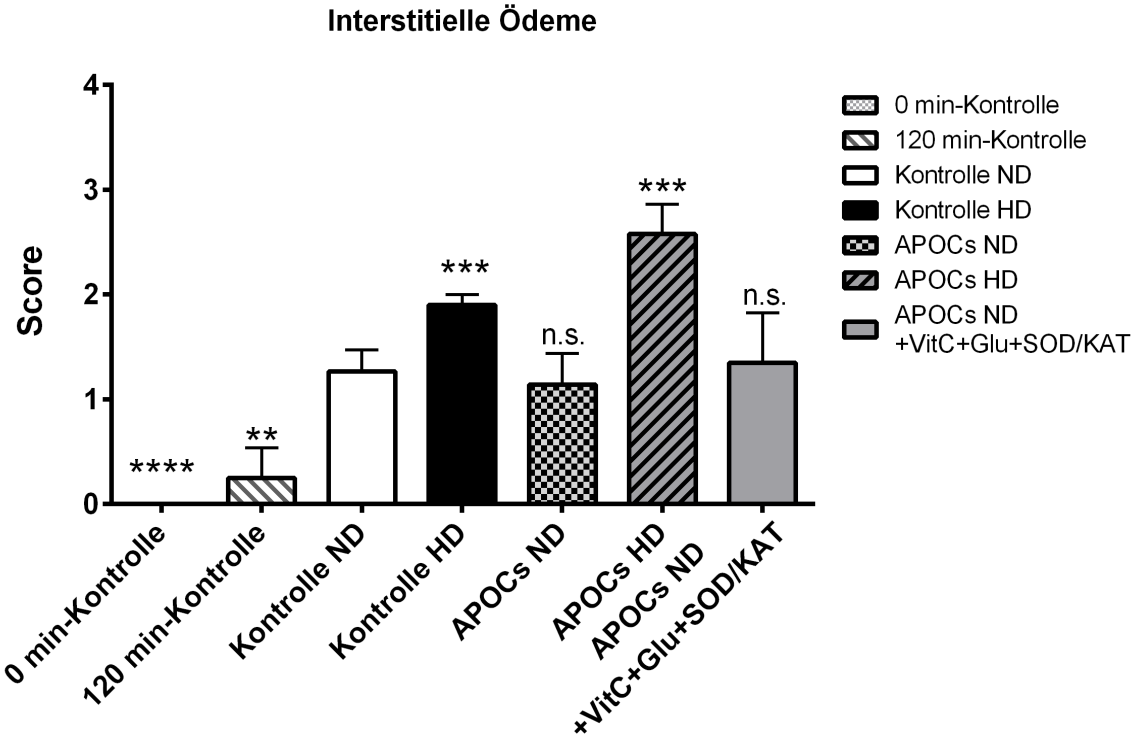


Abbildung 28: Interstitielle Ödeme: *In der Auswertung der interstitiellen Ödeme zeigten sich signifikant stärkere Schädigungen sobald mit erhöhtem Druck perfundiert wurde. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD. * p < 0,05; **p<0,01; ***p<0,001; n.s. = nicht signifikant, verglichen mit der Kontrolle ND.*

Sowohl in der 0 min-Kontrolle, als auch in der 120 min-Kontrolle wurde eine signifikant geringere Schädigung (0-0,25) ermittelt als in den Perfusionsgruppen (Abb. 28). In der Kontrolle HD wurden mit einem Score von 1,9 signifikant vermehrt interstitielle Ödeme nachgewiesen, während der Score in den Nieren, die mit niedrigem Druck, aber ebenfalls ohne APOCs, perfundiert wurden, wesentlich geringer war (1,26). Der Score der Gruppe APOCs HD lag mit 2,58 ebenfalls signifikant über dem Score der Kontrolle ND. Der Score der Kontrolle ND unterschied sich kaum von denen der Gruppe APOCs ND und der Gruppe APOCs ND +VitC+Glu+SOD/KAT.

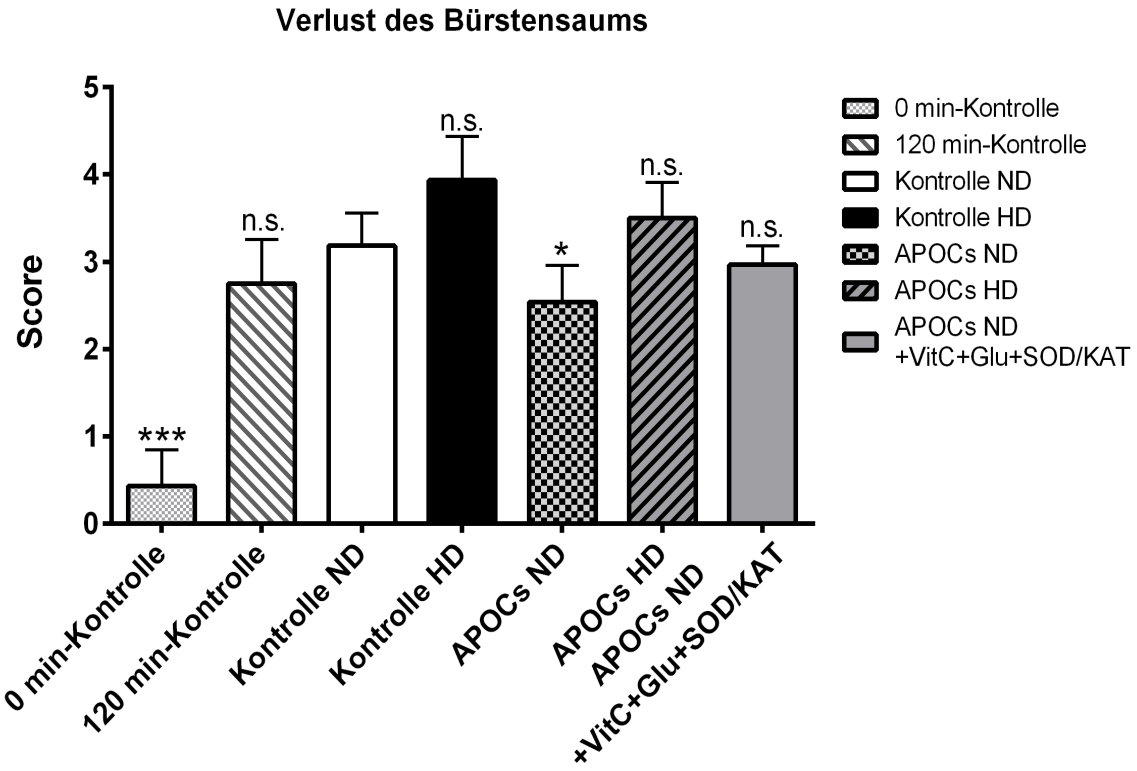


Abbildung 29: Verlust des Bürstensaums: *Der Verlust des Bürstensaums war in den mit hohem Druck perfundierten Nieren ausgeprägter als in den mit niedrigem Druck perfundierten Nieren. In der Gruppe APOCs ND zeigte sich eine signifikant geringere Schädigung als in der Kontrolle ND. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD. * p < 0,05; **p<0,01; ***p<0,001; n.s. = nicht signifikant, verglichen mit der Kontrolle ND.*

Der Verlust des Bürstensaums war in den Perfusionsgruppen (>2,96), bis auf die Gruppe APOCs ND (2,75), etwas stärker ausgeprägt als in der 120 min-Kontrolle (5,5). In der 0 min-Kontrolle lag der Score unter 0,5 (Abb. 29).
Die stärkste Ausprägung fand sich auch hier mit einem Score von 3,9 in der Kontrolle HD. In der Gruppe APOCs ND konnte hier ein signifikant niedrigerer Score ermittelt werden als in der Kontrolle ND. Insgesamt wurden die höchsten Scores in den mit hohem Druck perfundierten Gruppen ermittelt.

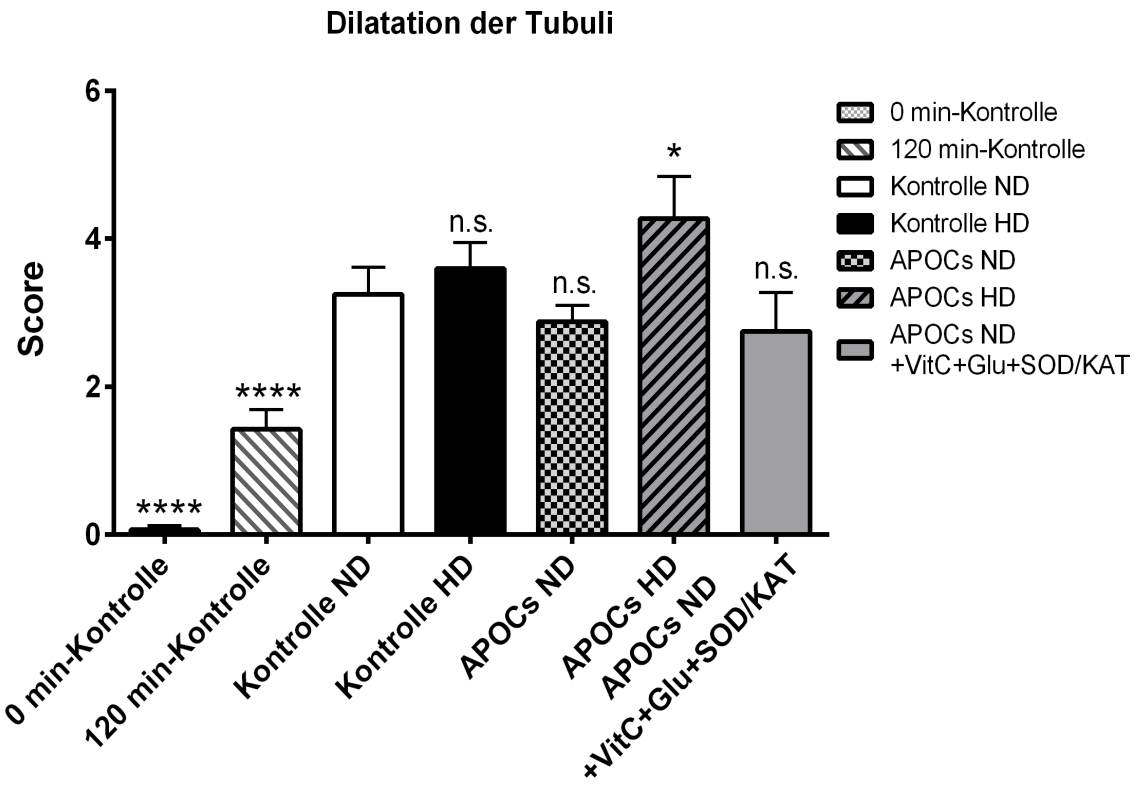
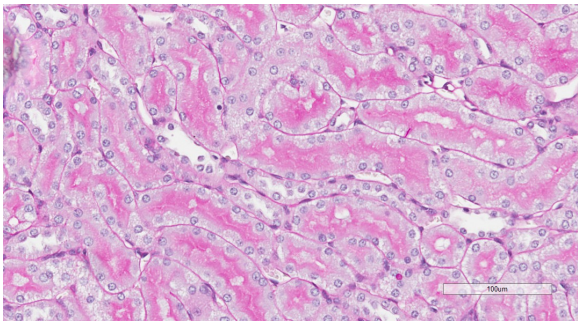


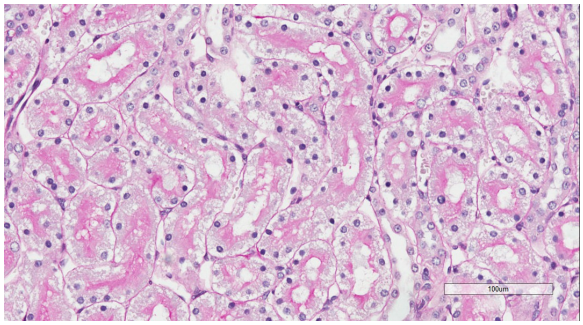
Abbildung 30: Dilatation der Tubuli: *Die Dilatation der Tubuli war in der Kontrolle HD am stärksten ausgeprägt, während in der Gruppe APOCs ND und der Gruppe APOCs ND +VitC+Glu+SOD/KAT eine tendenziell geringere Schädigung festzustellen war. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD. * p < 0,05; **p<0,01; ***p<0,001; n.s.= nicht signifikant, verglichen mit der Kontrolle ND.*

Die Dilatation der Tubuli war nach Perfusion ausgeprägter als zum Zeitpunkt null in den 120 min-Kontrollnieren (Abb. 30). Der Score lag in allen Perfusionsgruppen über 2,75 während er in der 120 min-Kontrolle 1,425 betrug. In der 0 min-Kontrolle wurde lediglich eine minimale Dilatation ermittelt (0,066). Auch in der Auswertung der Dilatation der Tubuli fand sich die stärkste Schädigung in den Hochdruckgruppen (v.a. Gruppe APOCs HD, hier signifikant höher als in der Kontrolle ND (4,28)), gefolgt von der Kontrolle ND (3,25). Die geringste Schädigung wurde hier ebenfalls in den Gruppen APOCs ND und APOCs ND +VitC+Glu+SOD/KAT detektiert. Hier lag der Score mit 2,75 bis 2,88 somit unter dem Score der Kontrolle ND, unterschied sich jedoch nicht signifikant.

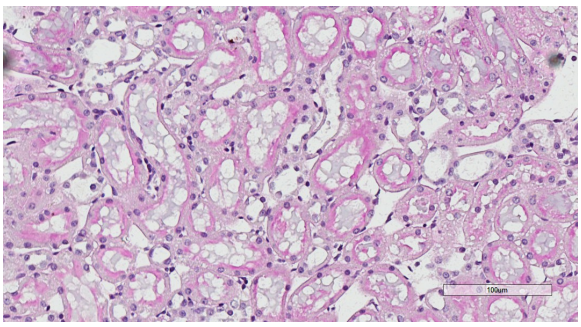
Exemplarisch werden in Abb. 31 typische Bildausschnitte der einzelnen Gruppen in der PAS-Färbung dargestellt.



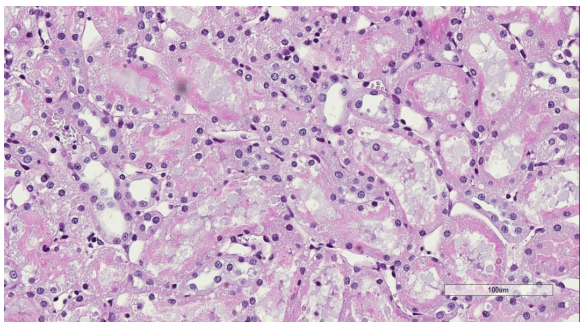
0 min-Kontrolle



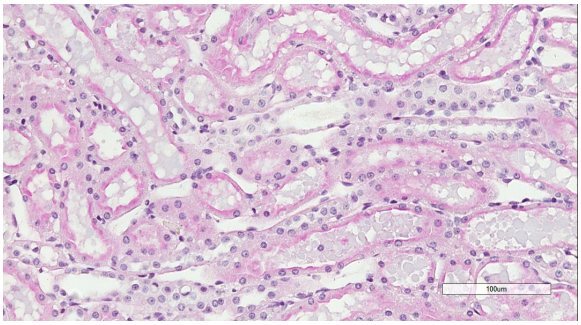
120 min-Kontrolle



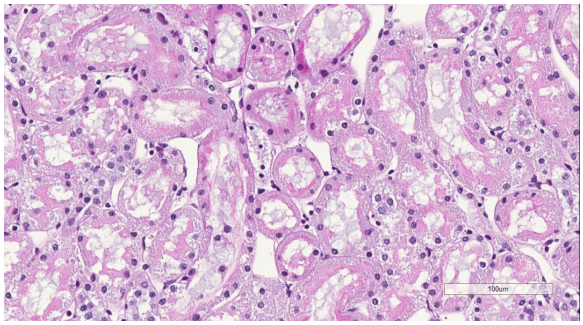
Kontrolle HD



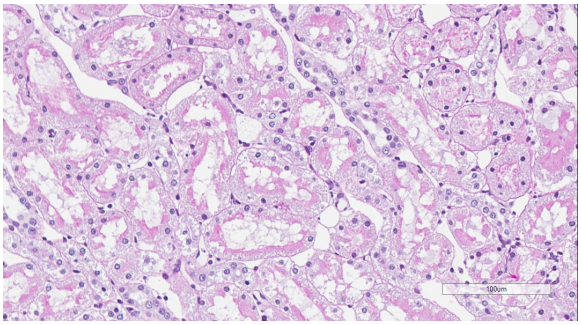
Kontrolle ND



APOCs HD



APOCs ND



APOCs ND +VitC+Glu+SOD/KAT

Abbildung 31: PAS-Färbung

4.2.9.2 Immunhistochemie

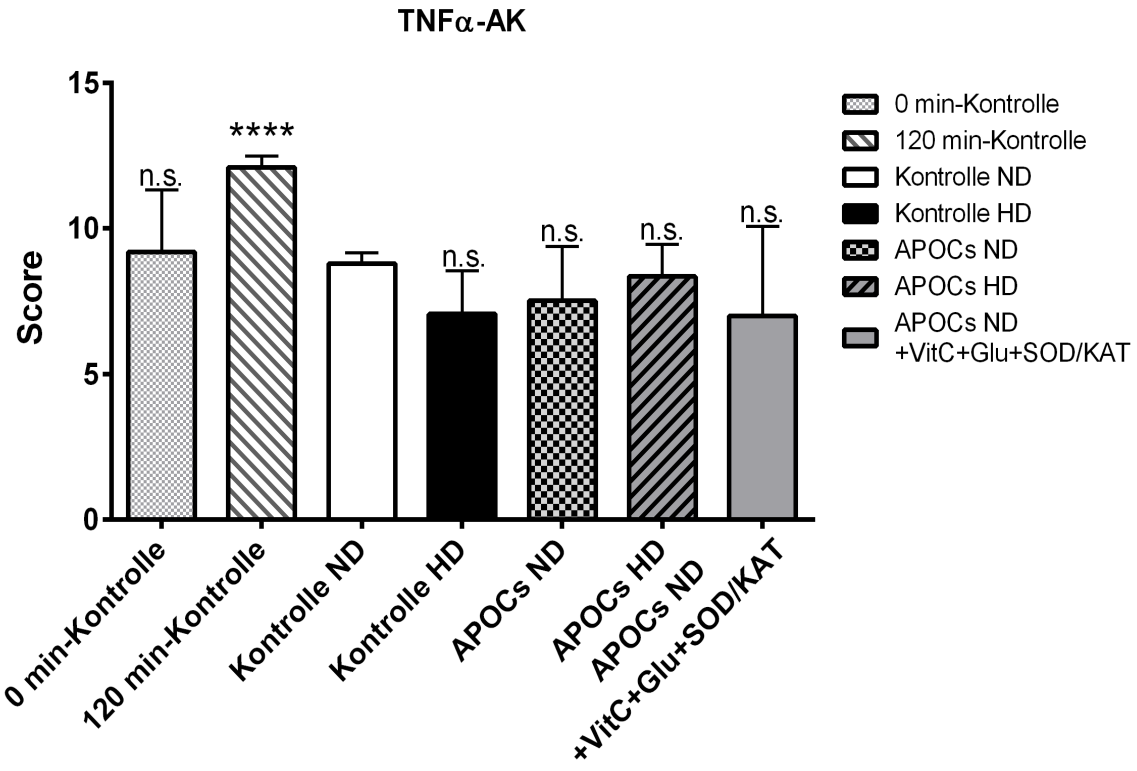
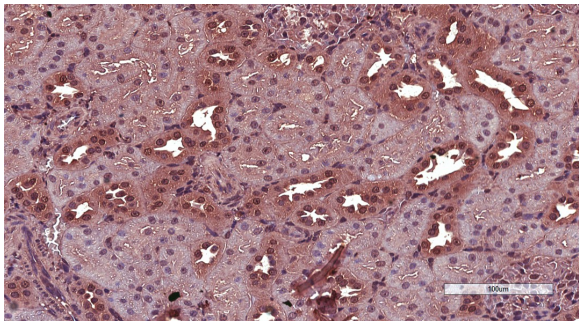


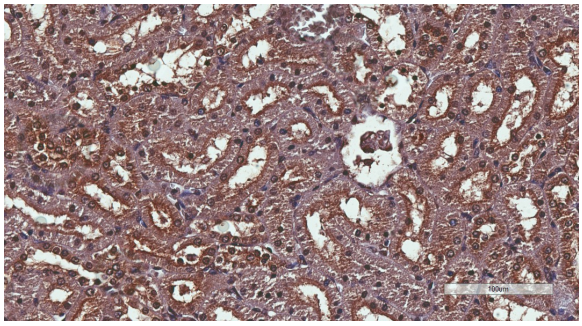
Abbildung 32: TNFα-AK-Färbung: *In der TNFα-AK-Färbung zeigte sich in den Perfusionsgruppen eine geringere bzw. weniger Färbung als in der 120 min-Kontrolle. Innerhalb der Perfusionsgruppen gab es keine signifikanten Unterschiede. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD. * p < 0,05; **p<0,01; ***p<0,001; n.s. = nicht signifikant, verglichen mit der Kontrolle ND.*

In der immunhistochemischen Färbung mit einem Antikörper gegen TNFα ließ sich in der 120 min-Kontrolle mit 12,1 Scorepunkten eine im Vergleich zur Kontrolle ND signifikant stärkere Schädigung nachweisen als in den Perfusionsgruppen (Abb. 32). Der Score der 0 min-Kontrolle hingegen lag mit einem Score von 9,2 knapp über dem der Kontrolle ND. Die geringste Schädigung mit einem durchschnittlichen Score von 7-7,5 zeigte sich in der Kontrolle HD und den Gruppen APOCs ND und APOCs ND +VitC+Glu+SOD/KAT, wohingegen die stärksten Schädigungen innerhalb der Perfusionsgruppen in der Kontrolle ND (8,8) und der Gruppe APOCs HD (8,35) ermittelt wurden. Die Unterschiede waren hier sehr gering und nicht signifikant.

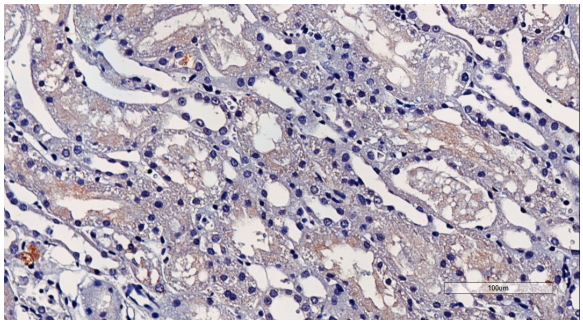
Exemplarisch werden in Abb. 33 typische Bildausschnitte der einzelnen Gruppen in der TNFα-AK-Färbung dargestellt.



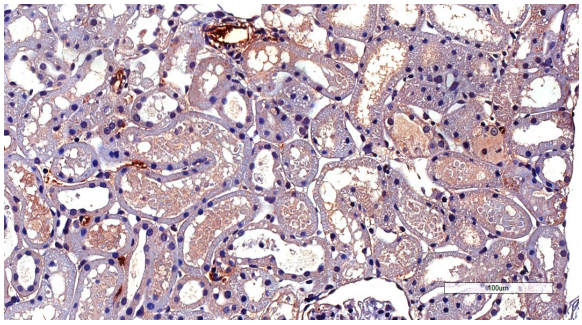
0 min-Kontrolle



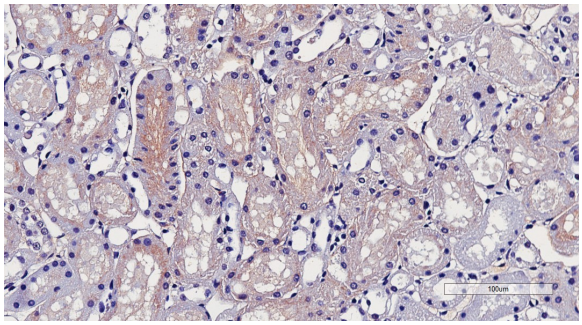
120 min-Kontrolle



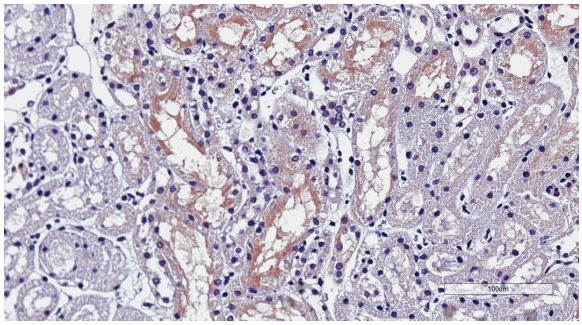
Kontrolle HD



Kontrolle ND

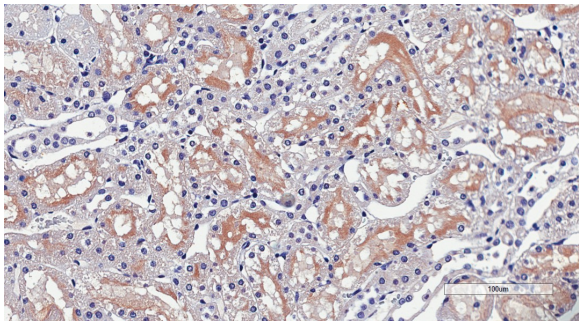


APOCs HD



APOCs ND

Abbildung 33: TNFα-AK-Färbung



APOCs ND +VitC+Glu+SOD/KAT

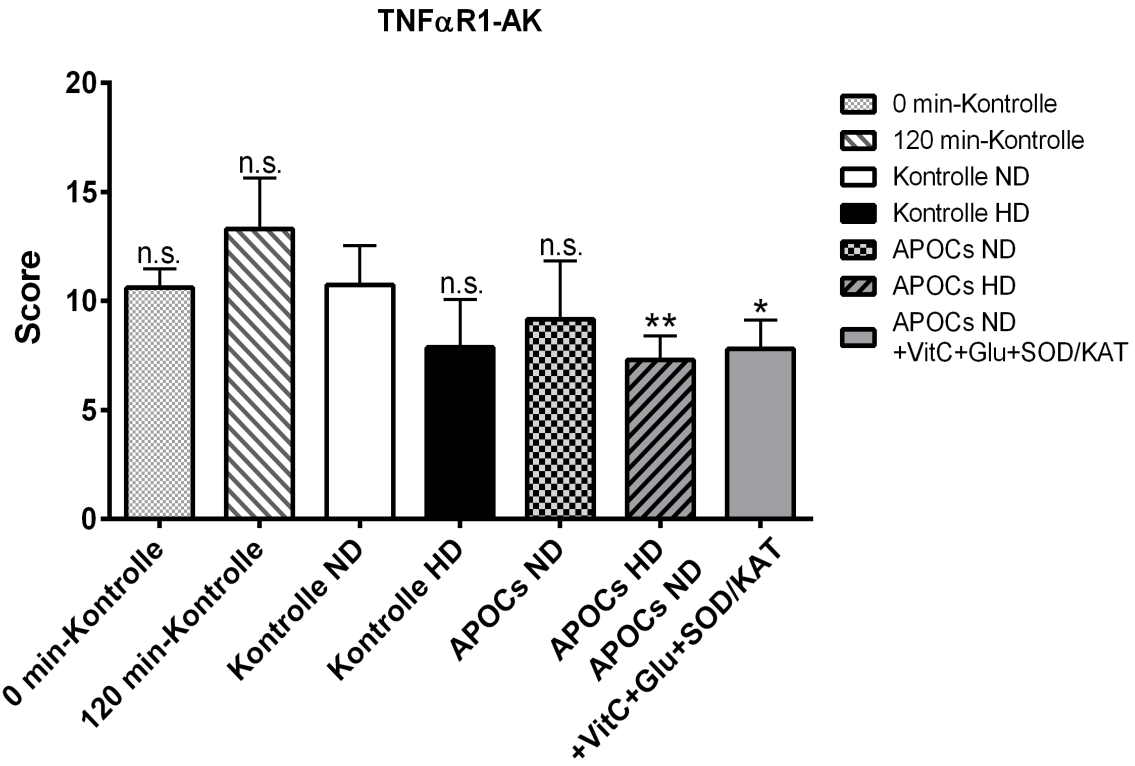
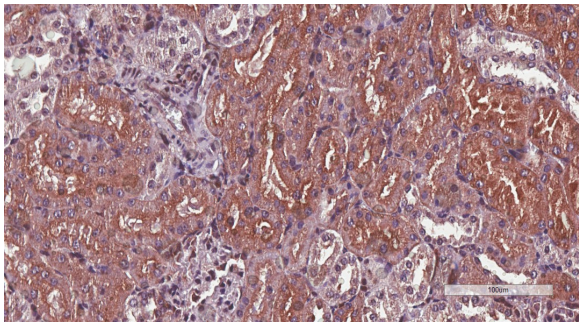


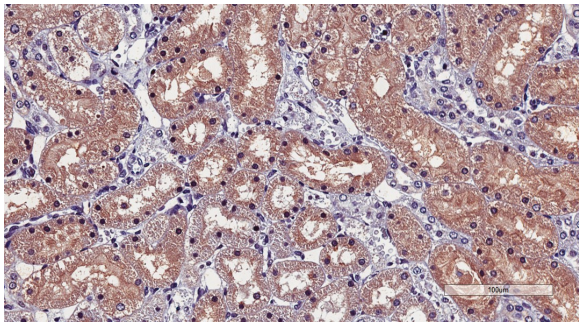
Abbildung 34: TNFα-Rezeptor-AK-Färbung: *Die TNFα-Rezeptor-AK-Färbung war in den Perfusionsgruppen geringer ausgeprägt als in der 120 min-Kontrolle. Der Score in den Gruppen APOCs HD und APOCs ND +VitC+Glu+SOD/KAT war signifikant niedriger gegenüber dem Score der Kontrolle ND. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD. * p < 0,05; **p<0,01; ***p<0,001; n.s. = nicht signifikant, verglichen mit der Kontrolle ND.*

In der Auswertung der TNFα-Rezeptor-AK-Färbung war die Schädigung mit einem Score von 13,3 ebenfalls in der 120 min-Kontrollgruppe am größten (Abb. 34). Der Score der 0 min-Kontrolle war nur geringfügig niedriger als der der Kontrolle ND (10,73).
Hier zeigte sich die geringste Schädigung in den mit hohem Druck perfundierten Nieren, sowie den Nieren der Gruppe APOCs ND +VitC+Glu+SOD/KAT (7,3-7,9). Signifikanz zeigte sich hier in den Gruppen APOCs HD und APOCs ND +VitC+Glu+SOD/KAT im Vergleich zur Kontrolle ND. In den mit niedrigem Druck perfundierten Nieren erhielten die Nieren der Kontrolle ND den höchsten Score.

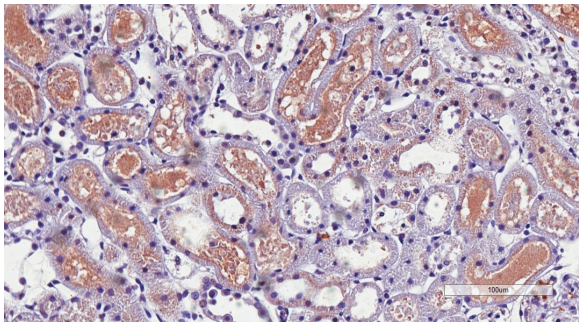
Exemplarisch werden in Abb. 35 typische Bildausschnitte der einzelnen Gruppen in der TNFα-Rezeptor-AK-Färbung dargestellt.



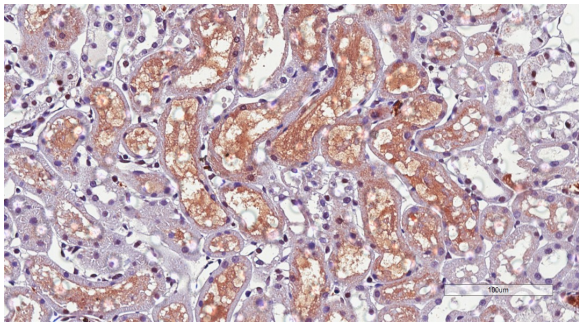
0 min-Kontrolle



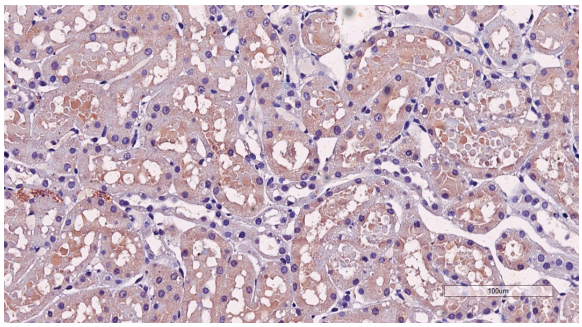
120 min-Kontrolle



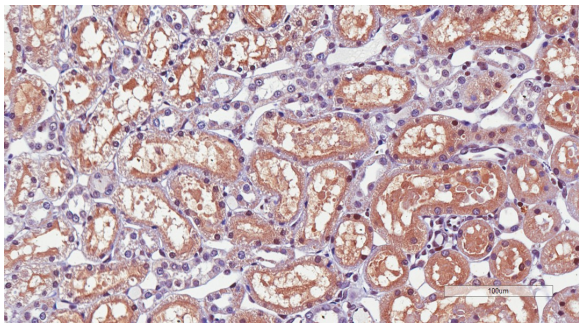
Kontrolle HD



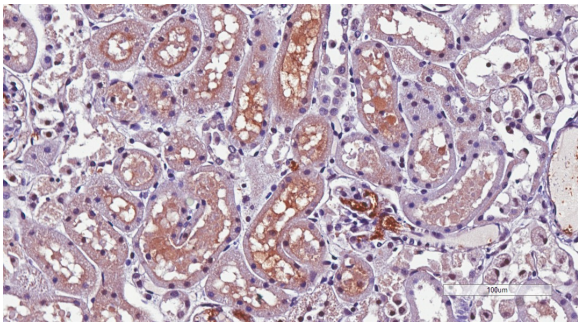
Kontrolle ND



APOCs HD



APOCs ND



APOCs ND +VitC+Glu+SOD/KAT

Abbildung 35: TNFα-Rezeptor-AK-Färbung

In allen immunhistochemischen Färbungen zeigte sich schon in der 0 min-Kontrolle eine ausgeprägte Präsenz der detektierten Schädigungsmarker, die teilweise über der Expression in den Perfusionsgruppen lag.

4.2.9.3 Enzymatische Bestimmung der DNA-Fragmentation

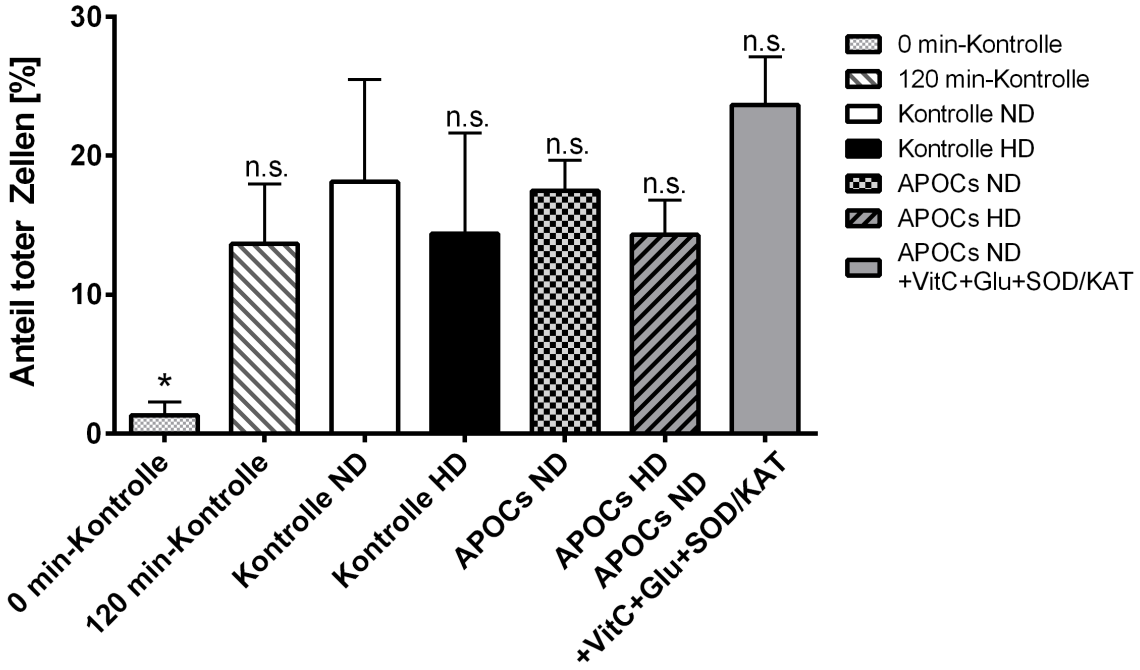
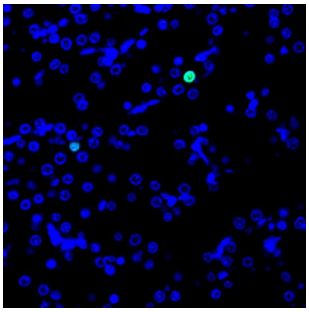


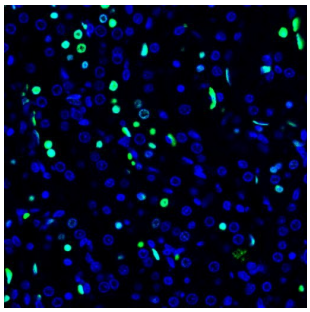
Abbildung 36: TUNEL-Färbung*: In der TUNEL-Färbung wurde in allen Nieren eine vergleichbare Schädigung detektiert. Lediglich der Anteil toter Zellen in der 0 min-Kontrolle lag signifikant unter dem Anteil in den übrigen Gruppen. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD. * p < 0,05; **p<0,01; ***p<0,001; n.s. = nicht signifikant, verglichen mit der Kontrolle ND.*

In der TUNEL-Färbung wurde in der 0 min-Kontrolle ein Anteil toter Zellen von nur 1,3 % nachgewiesen (Abb. 36). Die 120 min-Kontrolle und die Perfusionsgruppen zeigten keine signifikanten Unterschiede. Tendenziell wurde in der Gruppe APOCs ND +VitC+Glu+SOD/KAT mit 23,7 % ein höherer Anteil toter Zellen ermittelt als in den übrigen Gruppen. Der geringste Anteil innerhalb der Perfusionsgruppen fand sich mit 14,3-14,4 % in den Hochdruckgruppen.

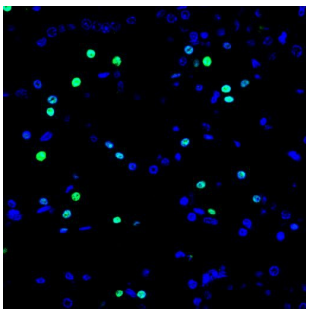
Exemplarisch werden in Abb. 37 typische Bildausschnitte der einzelnen Gruppen in der TUNEL-Färbung dargestellt.



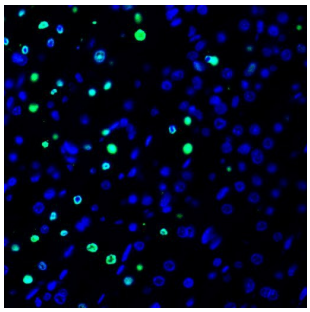
0 min-Kontrolle



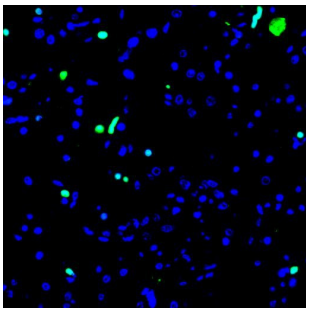
120 min-Kontrolle



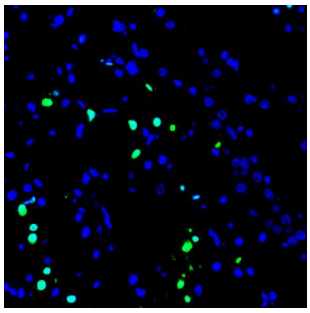
Kontrolle HD



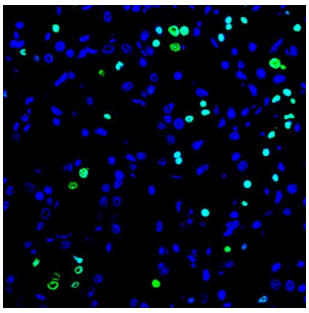
Kontrolle ND



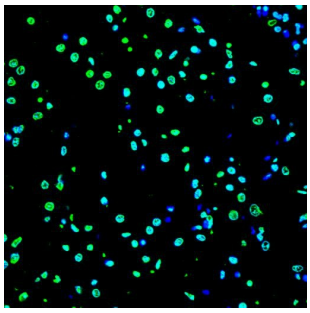
APOCs HD



APOCs ND



APOCs ND +VitC+Glu+SOD/KAT



Positivkontrolle

Abbildung 37: TUNEL-Färbung

5 Diskussion

In allen Versuchsgruppen musste bei druckkontrollierter Perfusion die Flussrate stark reduziert werden, so dass lediglich bei einem Druck von 80-100 mmHg noch Flussraten aufrechterhalten werden konnten, die eine ausreichende Sauerstoffversorgung gewährleisten können.

Obwohl die Rattenniere der menschlichen Niere sowohl anatomisch als auch physiologisch nicht identisch ist, ist die Ratte trotzdem als Versuchstier für die isolierte normotherme Perfusion mit Sauerstoffträgern geeignet. (Russell et al., 1959)
Bei der Versuchsdurchführung wurden Druck, Perfusions- und Urinflussrate, sowie pH-Wert, Oxygenierung und Temperatur des Perfusats kontinuierlich kontrolliert.
Somit konnte die Stabilität und Funktionalität der Nieren im gesamten Versuchszeitraum beurteilt werden. Hierbei zeigte sich, dass hinsichtlich einer druckkontrollierten Perfusion im Bereich 60-80 mmHg/bzw. 80-120 mmHg starke Anpassungen der Perfusionsflussrate vorgenommen werden mussten (Abb. 11, S. 44). In den durchgeführten Versuchen zeigten sich für die mit hohem Druck perfundierten Nieren bis 90 min Flussraten von über 15 ml/min, was nach Taft im akzeptablen Bereich liegt, in dem eine ausreichende Sauerstoffversorgung gewährleistet werden kann. (Taft, 2004) Danach kam es zum Abfall der Flussrate. In den mit niedrigem Druck perfundierten Gruppen wurden maximal Flussraten von 10 ml/min erreicht. Nach Taft lägen diese Werte somit zu niedrig, um die Versorgung mit Sauerstoff zu gewähren; jedoch muss beachtet werden, dass es unter anderem durch die Zugabe der APOCs zu einer erniedrigten Flussrate kommen kann. (Maack, 1980) Durch Schurek wurden ebenfalls Flussraten von nur 6-10 ml/min beobachtet. (H. J. Schurek et al., 1975) Es wurde in diesen Gruppen außerdem mit 60-80 mmHg mit einem deutlich niedrigerem Druck gearbeitet als in anderen Studien. (H. J. Schurek et al., 1981; Taft, 2004; Chang et al., 2013) Das Ziel bei der Wahl dieses niedrigen Drucks war es, das Nierengewebe zu schonen. (Brezis et al., 1984)
Nicht überraschend ist es, dass die Flussrate in den Hochdruckgruppen über der Flussrate der übrigen Gruppen lag. Es zeigte sich jedoch außerdem, dass in der Gruppe APOCs HD zum Ende der Perfusion, die Flussrate trotz hohem Druck ebenfalls stark reduziert werden musste, während die Flussrate der Kontrolle ND trotz niedrigem Druck weniger stark reduziert werden musste.

Durch den Zusatz der APOCs floss bei gleichem Druck weniger Perfusat durch die Nieren.

Um die Verhältnisse besser beurteilen zu können, wurde der Druck-Fluss-Quotient bestimmt (Abb. 12, S. 45). Hierbei zeigte sich, dass in den APOCs-freien Gruppen ein niedrigerer Quotient ermittelt wurde, der außerdem weniger stark anstieg als in den APOCs-haltigen Gruppen; folglich zeigte sich auch hier, dass in den APOCs-freien Gruppen bei gleichem Druck mehr Perfusat durch das Organ floss als in den Gruppen, die APOCs enthielten. Es kann also nicht ausgeschlossen werden, dass die APOCs zu einer voranschreitenden Verstopfung der Nierenkapillaren geführt haben. Bei inhomogener Teilchengröße von Sauerstoffträgern ähnlich der APOCs kam es in vorherigen Studien auch zum hier vorliegenden Problem des steigenden Drucks bei sinkender Flussrate. (Franke et al., 1978) Den APOCs wird jedoch auch die Fähigkeit zugeschrieben Gase, unter anderem den Vasodilatator Stickstoffmonoxid, in relevanten Konzentrationen lösen zu können. Durch die Entfernung des endogenen Stickstoffmonoxids aus dem System haben die APOCs somit auch selbst eine vasokonstriktorische Wirkung, was diese Beobachtung ebenfalls erklären würde. Außerdem entsteht durch den Zusatz der APOCs eine Suspension mit erhöhter Viskosität, was ebenfalls einen geringeren Druck-Fluss-Quotienten in den APOCs-Gruppen verursachen könnte. (Rafikova et al., 2004)
Durch die Rezirkulation kommt es zu einer Veränderung des Perfusats im Versuchsablauf. Unter anderem kommt es zu einem Verbrauch des zugesetzten Arginins, welches über die Entstehung des Endothelium-derived relaxing factor NO einen reduzierenden Einfluss auf den Perfusionswiderstand hat. (Radermacher et al., 1991).
Den gegenteiligen Effekt hat Endothelin, welches als starker Vasokonstriktor gilt und vom Endothel der Gefäße selbst produziert werden kann. Über die Auswirkungen des Endothelin für die isoliert perfundierte Niere ist noch nicht viel bekannt. Es ist jedoch ein möglicher Einflussfaktor für die sinkende Perfusionsflussrate, die in diesem Fall einem steigenden Perfusionswiderstand geschuldet wäre. (Kohan et al., 2011)
Eppstein beschrieb den Zusatz aller 20 Aminosäuren als einen weiteren Faktor, der zu einer Reduktion der Flussrate führt. Jedoch sollte dies in Kauf genommen werden, da es erst durch Zusatz aller Aminosäuren zu einer Verbesserung der Funktionsparameter kommt. (Epstein et al., 1982) Ähnliche Problematik in Form eines starken Abfalls der Flussrate

nach 90 min unter druckkonstanter Perfusion zeigte sich bereits in früheren Studien. (Hartwig, 1988) Es konnte jedoch durch die Verwendung eines Dialysators zu Gunsten einer Regeneration des Perfusionsmediums ein Erfolg erzielt werden. (Schafer, 1997; H. J. Schurek et al., 1975) Eine Stabilisierung der Flussrate konnte in einigen Studien außerdem durch die Zugabe von Verapamil erzielt werden, wodurch die Autoregulation der Niere jedoch nicht mehr zum Tragen kommt. (H. J. Schurek et al., 1976)
Ein bekanntes Problem ist die Denaturierung des Albumins, die durch die Schaumbildung bei direkter Begasung begünstigt werden kann. Diese Denaturierung würde zu einem Funktionsverlust des Albumins führen, was einen zu niedrigen kolloidosmotischen Druck zur Folge hätte. Dies wiederum würde die geringen Perfusionsflussraten erklären, sollte jedoch auch zu einer erhöhten GFR führen. Es ist möglich, dass der Effekt auf die GFR durch andere gravierendere Vorgänge wie z.B. das Verstopfen der Kapillaren verschattet wurde. Es sollte über eine indirekte Begasung mit Hilfe eines Oxygenators oder Dialysators nachgedacht werden. (H.J. Schurek, 2016)

Die Nieren konnten scheinbar über die eigenständige Bereitstellung von Substraten einen ausreichend stabilen pH-Wert aufrechterhalten. In den Gruppen Kontrolle ND und APOCs ND +VitC+Glu+SOD/KAT kam es nicht zur Autophagie und somit zur Aktivierung apoptotisch wirkender Signalwege, wodurch es zum tendenziellen Abfall des pH-Werts kam.

Die Messung des pH-Werts durch das im System eingebaute pH-Meter wurde mit fortschreitender Perfusion unzuverlässig. Durch die teils sehr geringen Flussraten konnte im Reservoir der Elektrode keine adäquate Erneuerung des Perfusats erfolgen, wodurch verfälschte Werte ermittelt wurden (Abb. 13, S. 46). Aus diesem Grund wurde in der Auswertung zusätzlich auf die Werte der blutgasanalytischen Messung zurückgegriffen (Abb. 14, S. 47). Hierbei wurde deutlich, dass in der Messung durch die pH-Elektrode zwischen den Gruppen wesentlich größere Schwankungen des pH-Werts gemessen wurden als durch die Messung des BGA-Geräts. Insgesamt lagen in beiden Messungen die Werte der Hochdruckgruppen jedoch über den Werten der übrigen Gruppen.
In den Messungen mit Hilfe der eingebauten pH-Elektrode zeigten sich innerhalb der

ND Gruppen im Versuchsverlauf für die Gruppe APOCs ND +VitC+Glu+SOD/KAT und die Kontrolle ND niedrigere Werte als in der Gruppe APOCs ND. In der Gruppe APOCs ND kam es bei einem Überangebot an Sauerstoff bei gleichzeitigem Substratmangel zur Autophagie wie z.B. in Form des Abbaus körpereigener Proteine, wodurch Substrate für den Citratzyklus bereitgestellt werden können. (Gorner et al., 2002) Autophagie führt über komplexe Signalwege zur Inhibition apoptotischer, nekrotischer und inflammatorischer Vorgänge. (Eisenberg-Lerner et al., 2009)
In der Kontrolle ND fehlte das Überangebot an Sauerstoff, während es in der Gruppe APOCs ND +VitC+Glu+SOD/KAT zu keinem Substratmangel kam, da hier Glutamin und Glutamat in höherer Konzentration zugesetzt wurden. Dies führte dazu, dass aufgrund einer scheinbar ausreichenden Versorgung mit Substraten keine Autophagie erfolgte, während jedoch die Versorgung mit allen Substraten, bis auf Glutamat und Glutamin, eigentlich mangelhaft war. Daher wurde in der Gruppe APOCs ND +VitC+Glu+SOD/KAT und der Kontrolle ND durch die fehlende Inhibition der Apoptose der pH-Wert gesenkt. (Lagadic-Gossmann et al., 2004) Die mit hohem Druck perfundierten Gruppen zeigen die entsprechenden Verhältnisse nicht. Die Inhibition apoptotischer Vorgänge durch vermehrte Autophagie in der Gruppe APOCs ND lässt sich in der histologischen Auswertung nicht nachvollziehen. Jedoch zeigte sich in der TUNEL Färbung ein höherer Schädigungsgrad der Zellkerne in der Gruppe APOCs ND +VitC+Glu+SOD/KAT, in der ohne den Prozess der Autophagie keine Inhibition der Apoptose erfolgte.
In den Gruppen, in denen mit niedrigem Druck perfundiert wurde, kam es nach 180 min zum Abfall des pH-Werts. Die Niere tendiert dazu im Laufe der Perfusion den pH-Wert in den für sie günstigen leicht sauren Bereich anzupassen.
Da die Perfusion der Hochdruckgruppen in den ersten Versuchen durchgeführt wurde, wurde hier mit 7,45 noch ein etwas höherer, aber noch physiologischer pH-Wert angesetzt. In den Versuchen der übrigen Gruppen wurde nach der Erkenntnis, dass in der Niere unter niedrigeren pH-Werten der metabolische Umsatz steigt, ein pH-Wert von 7,3-7,4 angesetzt. (Bowman, 1970) Wie in Absatz 1.1.2.3 beschrieben, werden durch einen reduzierten pH-Wert des Perfusats vor allem in der Anfangsphase der Reperfusion außerdem Zellschäden durch einen gesteigerten Calcium-Einstrom und folgende Mitochondrienmembranschädigungen mit Ausschüttung von Enzymen, reduziert.

Es zeigte sich, dass die Nieren ohne Zusatz von im Zielbereich puffernden Substanzen, und somit scheinbar über die eigenständige Bereitstellung von Substraten, in der Lage waren den pH-Wert stabil zu halten. In keiner der Gruppen kam es zu einem Zusammenbruch des Säure-Basen-Haushalts.

Es kam vermutlich bedingt durch die Spülphase mit kristalloidem Puffer zu keiner relevanten Urinproduktion.

Die Urinflussrate war in allen Gruppen sehr gering und lag weit unterhalb der von Taft angesetzten Grenze von 0,03 ml/min (Abb. 15, S. 48). (Taft, 2004) Im vorliegenden Modell wurde jedoch mit ischämischen Nieren gearbeitet. Bei der Perfusion ischämischer Nieren wurden auch in anderen Studien Werte weit unterhalb von 0,03 ml/min gemessen. (Bazzano et al., 2015) Weitere mögliche Gründe für geringe Urinflussraten sind ein zu geringer hydrostatischer Druck oder ein Verschluss des Filters durch einen zu hohen onkotischen Druck in der Spülphase mit KH-Puffer. Letzteres scheint ein wesentlicher Punkt zu sein. Im Nachhinein stellte sich in Gesprächen mit Prof. Pagel aus Lübeck, einem erfahrenen Wissenschaftler auf dem Gebiet der Nierenperfusion, heraus, dass vor Perfusion mit kolloidhaltiger Lösung nicht kristalloid gespült werden darf.
Schurek beschrieb 1981 außerdem die Probleme eines ureteralen Rückstaus bei inadäquater Kanülierung des Ureters. Zu diesem Phänomen kommt es bei Nutzung eines zu kleinlumigen Ureterkatheters. Da der verwendete Katheter (24G Venenverweilkatheter) jedoch mit 0,7 mm Durchmesser eine Durchflussrate von 13 ml/min besitzt, welche weit über dem tatsächlichen Urinfluss liegt, lässt sich dieses Phänomen ausschließen. Schurek wies außerdem darauf hin, dass es besonderer Vorsicht bei der Katheterisierung des Ureters bedarf, da bei einem Vorschieben des Katheters in die Nähe des Nierenbeckens die Gefahr einer Einblutung bestehe, welche ebenfalls zu einem Rückstau führe und somit Ursache für einen geringen Urinfluss sein könne. (H. J. Schurek et al., 1981)
Ein negativer Einfluss der APOCs ist naheliegend, da in den APOCs-freien Gruppen die Urinflussrate geringfügig höher war als in den APOCs-Gruppen. Lediglich höherer Druck war nicht ausreichend, um eine Urinflussrate auf dem Niveau der APOCs-freien Gruppen zu erreichen. Dies zeigt sich in den im Vergleich zu den Werten der APOCs-freien Gruppe

niedrigeren Werten der Gruppe APOCs HD. Dies spricht ebenfalls dafür, dass das Problem hier unter anderem in den APOCs liegt (Abb. 24, S. 59).
Durch die Zugabe der APOCs entsteht eine Suspension mit erhöhter Viskosität. Dies kann ein weiterer Einflussfaktor auf die geringere Flussrate in den APOCs-haltigen Gruppen sein, denn je visköser das Perfusionsmedium, desto niedriger ist die Markperfusion. Je niedriger die Markperfusion, desto höher ist der osmotische Gradient und je höher der osmotische Gradient, desto höher ist die Urinkonzentrierung. (Lieberthal et al., 1987)
Hier sei bereits darauf hingewiesen, dass durch die Probleme in der Urinproduktion die teilweise sehr geringen Probenzahlen pro Gruppe zu einer Unzuverlässigkeit in der Auswertung geführt haben können. Alle aus dem Urin erhobenen Werte können somit lediglich als Orientierung dienen.

Da die Urinflussrate ein entscheidender Parameter in der Berechnung der GFR ist, waren die Werte, wie erwartet, unphysiologisch niedrig (Abb. 22, S. 56). Sowohl bei Betrachtung der GFR, als auch der Inulinkonzentration des Perfusats für sich, zeigten sich tendenziell höhere Werte in den mit hohem Druck perfundierten Gruppen. Jedoch waren auch diese Werte noch weit von gewünschten Ergebnissen entfernt. Wie bereits bezüglich der Drucksteigerung beschrieben konnte in ähnlichen Studien durch den Einbau eines Dialysators, auch bezüglich der GFR, eine Verbesserung erzielt werden. Dies legt nahe, dass es durch Abbauprodukte, die nicht aus dem rezirkulierenden Perfusat entfernt werden, zu einer Schädigung des Filters in der Niere kommt.
Da innerhalb der Nieren einer Gruppe und auch teilweise innerhalb der Doppelmessungen einzelner Proben große Abweichungen ermittelt wurden, sind diese Werte bei geringer Gruppengröße unzuverlässig. Es wurde mittels einer Beispielmessung, in der in Inulin-Quantifizierung eine Proteinfällung durch TCA erfolgte, der Einfluss der Proteine auf die Messung untersucht (Abb. 9, S. 39). Es zeigte sich jedoch, dass hier kein signifikanter Unterschied bestand und auch nach Proteinfällung Werte gemessen wurden, die weiterhin weit von physiologischen Werten entfernt waren.

Unter hohem Druck mit Zusatz der APOCs wurden signifikant höhere Werte für das oxidierte Cytochrom C sowie ein höherer Sauerstoffverbrauch ermittelt, so dass davon auszugehen ist, dass die Atmungskette unter diesen Bedingungen am besten arbeiten konnte. Dies bestätigt sich außerdem durch die verminderte Zahl an epithelialen Nekrosen und einer verminderten TNFα-AK-Rezeptor-Expression in dieser Gruppe.

Um die Frage beantworten zu können, ob die Sauerstoffversorgung der Niere ausreichend war, um den Stoffwechsel der Niere zu erhalten, wurden die Cytochrome c (555 nm) und b (565 nm) der Atmungskette im 30 min-Abstand photometrisch bestimmt. Am Komplex III der Atmungskette erfolgt die Reduktion von gebundenem Ferri-Cytochrom c innerhalb der Cytochrom-c-Reduktase, wobei die Reduktionsäquivalente vom Q-Komplex (via Komplex b) zur Verfügung gestellt werden. Das gebildete Ferrous-Cytochrom c dissoziiert vom Komplex III und diffundiert zum Komplex IV. Das Ferrous-Cytochrom c wird am Komplex IV wieder zum Ferri-Cytochrom c oxidiert, dissoziiert dort ab und re-diffundiert zum Komplex III. Insgesamt können vier Moleküle Ferrous-Cytochrom c am Komplex IV oxidiert werden. Die vier aufgenommenen Elektronen werden dann genutzt, um am Komplex IV molekularen Sauerstoff zu zwei Molekülen Wasser zu reduzieren, wobei zwei Protonen von der Matrix in den Intermembranraum gepumpt werden, oder um Komplex IV zu regenerieren. Somit können mit Hilfe der gemessen (Ferrous)-Cytochrome Rückschlüsse auf die Stoffwechselaktivität der Tubuluszellen der Niere getroffen werden. In allen Gruppen, außer der Gruppe APOCs HD, zeigte sich eine Zunahme von reduziertem Cytochrom c. Die Zunahme von oxidiertem Cytochrom c in der Gruppe APOCs HD reflektiert eine funktionierende Atmungskette im Zeitraum von 0-90 min; danach nahm auch in dieser Gruppe der Anteil an reduziertem Cytochrom c stark zu (Abb. 16, S. 49). Passend dazu zeigt sich vor allem zwischen 30 min und 60 min ein signifikant höherer Sauerstoffverbrauch in der Gruppe APOCs HD im Vergleich zu den übrigen Gruppen (Abb. 20, S. 54). Sowohl die Zahl der epithelialen Nekrosen als auch die Expression des TNFα-AK-Rezeptors waren ebenfalls in der Gruppe APOCs HD im Vergleich zu den übrigen Gruppen vermindert (Abb. 27, S. 64/Abb. 34, S. 71).
Eine erfolgreiche Sauerstoffversorgung konnte hier scheinbar die Entstehung struktureller Schäden signifikant reduzieren.

Durch das technisch bedingte Fehlen von Cytochrom a/a3-Messwerten kann nicht sicher gesagt werden, ob zusätzlich zum Energiemangel (Akkumulation von oxidiertem Cytochrom b und c) auch ein Sauerstoffmangel vorlag.

Der höchste Sauerstoffverbrauch konnte durch eine Perfusion mit hohem Druck und den Zusatz von APOCs erreicht werden.

Bezieht man nun aber den Sauerstoffverbrauch der Niere mit ein zeigt sich vor allem nach Berechnung ohne Berücksichtigung der Flussrate (Abb. 21, S. 55), dass die Nieren in den APOCs-Gruppen ausreichend mit Sauerstoff versorgt gewesen sein müssen.
Bei der Berechnung des Sauerstoffverbrauchs wurde das höhere Potential zur Lösung von Sauerstoff bei gleichem Partialdruck in den APOCs-Gruppen berücksichtigt. In der Auswertung des Sauerstoffverbrauchs zeigt sich vor allem zwischen 30 min und 60 min ein im Vergleich zu den übrigen Gruppen signifikant höherer Verbrauch in der Gruppe APOCs HD (Abb. 20, S. 54). Dies ist mit Vorsicht zu beurteilen, da durch die Berücksichtigung der Flussrate in der Berechnung der Einfluss dieser die Ergebnisse erklären könnte. Auch wenn die Werte der übrigen Gruppen recht nah beieinander lagen und einen Verbrauch von 0,15 ml O_2/min/g nicht überschritten, war zu erkennen, dass die Werte der Gruppe APOCs ND hier noch den höchsten Verbrauch zeigten. Es ist denkbar, dass hier ein Zusammenhang mit der besseren Arbeit der Atmungskette besteht (Abb. 16/17, S. 49 f.). Lässt man die Flussrate in der Berechnung außer Acht (Abb. 21, S. 55), so zeigt sich deutlich, dass der Verbrauch in den APOCs-freien Gruppen im gesamten Versuch unter dem der APOCs-Gruppen lag. Dies zeigt, dass, obwohl gleich viel Sauerstoff angeliefert wurde (Abb. 20, S. 54), durch die Präsenz der APOCs mehr Sauerstoff verbraucht werden konnte.
Auffällig ist auch, dass sich in der Berechnung ohne Berücksichtigung der Flussrate der Sauerstoffverbrauch in den einzelnen Gruppen über den Versuchszeitraum hinweg kaum veränderte. Die APOCs konnten somit scheinbar genug Sauerstoff anliefern, um die Niere, auch bei verringerter Flussrate und somit verlängerter Zeit bis zur Anlieferung neuer mit Sauerstoff beladener APOCs, zu versorgen.

Abb. 21 zeigt auch, dass trotz des verzögerten Erreichens des gewünschten Sauerstoffpartialdrucks (Abb. 19, S. 53) nach 60 min in der Kontrolle HD ein stabiler Sauerstoffverbrauch der Niere bereits nach 30 min erreicht wurde.

Unter hohem Druck kam es zum verstärkten Anstieg der Osmolarität im Perfusat und im Urin, während dieser Anstieg durch Zusatz der APOCs geringer ausfiel.

Bei der blutgasanalytischen Auswertung von Perfusat und Urin stand der Anstieg der Osmolarität im Vordergrund. Sowohl im Perfusat als auch im Urin stieg die Osmolarität in allen Gruppen im Verlauf der Perfusion an (Abb. 18, S. 51). Im Urin ist dies einfach durch die im Versuchsablauf sinkende Flussrate und somit für die Niere notwendige Konzentration des Urins mit harnpflichtigen Substanzen zu erklären. Die steigende Osmolarität im Perfusat könnte auf Ödembildungen innerhalb der Nieren hinweisen. Diese vermutete Ödembildung konnte histologisch nachgewiesen werden (Abb. 28, S. 65).
Des Weiteren ist es möglich, dass es in der Niere zur Produktion weiterer osmotisch aktiver Moleküle kommt, die in das Perfusat abgegeben werden. Möglich ist außerdem eine vermehrte Rückresorption osmotisch aktiver Stoffe. Es zeigte sich, dass in der Kontrolle HD eine höhere Osmolarität im Perfusat gemessen wurde. Unter hohem Druck konnte jedoch durch die Zugabe der APOCs ein Ansteigen der Osmolarität zwar nicht gestoppt, aber gebremst werde, so dass die Osmolarität in der Gruppe APOCs HD zum Zeitpunkt von 90 min sogar unter der Osmolarität der APOCs-freien Kontrolle ND lag.
Im Urin zeigten sich in der 30 min- und 90 min-Messung noch eng beieinander liegende Werte der einzelnen Gruppen, während in der 180 min-Messung besonders der weit höher liegende Wert der Gruppe APOCs HD auffiel. Obwohl hier eine sehr geringe Urinproduktion erfolgte, erklärt dies nicht den sehr viel höheren Wert im Vergleich beispielsweise zur Gruppe APOCs ND +VitC+Glu+SOD/KAT, in der nach 180 min ebenfalls eine sehr niedrige Urinflussrate gemessen wurde. Auch die vergleichsweise niedrige Osmolarität in der Gruppe APOCs ND, bei ebenfalls niedriger Urinflussrate, ist somit nicht zu erklären. Die Osmolarität stieg zwar in allen Gruppen im Versuchsablauf an, jedoch wurden, selbst unter Berücksichtigung der möglichen starken Schwankungen, keine physiologischen Werte erreicht. (Derelanko et al., 2001)

Die Ergebnisse der Messung der Osmolarität sollten lediglich als Orientierung dienen. Durch die Berechnung der Osmolarität aus der Natrium- und Glukosekonzentration ist die Berechnung nicht ausreichend zuverlässig. Es fehlt, vor allem im Urin, der Einbezug wichtiger osmotisch aktiver harnpflichtiger Substanzen wie z.B. Harnstoff, der einen hohen Anteil der Osmolarität ausmacht. Es ist davon auszugehen, dass die eigentliche Urin-Osmolarität weit über den gemessenen Werten liegt.

Unter Perfusion, vor allem mit hohem Druck, kam es zur Bildung ausgeprägter Ödeme, die einen Konzentrationsanstieg der Elektrolyte und der Osmolarität im Perfusat zur Folge hatten.

Eine Berechnung der Rückresorption erwies sich am Beispiel der Natrium-Rückresorption durch die geringe Urinproduktion als nicht sinnvoll (Tabelle 10, S. 58). Normalerweise sollten hier Werte im Bereich von 95 % erreicht werden. (H. J. Schurek et al., 1975) Ein Vergleich der tatsächlich gemessenen Konzentrationen der Elektrolyte und Glukose in Urin und Perfusat erwies sich im Rahmen dieser Arbeit dahingegen als zielführender (Abb. 24-26, S. 59 ff.).
Die Veränderungen der Natriumkonzentration im Perfusat stimmten nahezu mit denen der Osmolarität im Perfusat überein (Abb. 24, S. 59/Abb. 18, S. 51). Dies erklärt sich dadurch, dass die Berechnung der Osmolarität größtenteils aus der Natriumkonzentration erfolgt.
Es zeigte sich auch hier, dass ein erhöhter Druck evtl. über Ödembildung zu einer erhöhten Konzentration führt. Bei Betrachten der interstitiellen Ödeme in der PAS-Färbung zeigte sich, wie erwartet, dass ein hoher Druck zu massiven Ödemen führt (Abb. 28, S. 65). Während hier in den 0 min- und 120 min-Kontrollnieren keine bis minimale Ödeme ermittelt wurden, zeigten sich in den Kontrolle HD signifikant mehr Ödeme als in den Gruppen, in denen mit niedrigem Druck perfundiert wurde. Die Sauerstoffträger hatten hier keinen Einfluss auf das Ergebnis.
Ausgehend von einem physiologischen Mittelwert von 146 mmol/l kam es nach 90 min lediglich in der Kontrolle HD zur Überschreitung einer physiologischen Natriumkonzentration. (Derelanko et al., 2001) Nach 180 min zeigten sich auch in der Gruppe APOCs HD leicht erhöhte Werte von 151 mmol/l.

Die Ödembildung ließ sich durch die Zugabe der APOCs weder bei hohem, noch bei niedrigem Druck verhindern, war jedoch passend zum Anstieg der Natriumkonzentration, unter hohem Druck signifikant stärker ausgeprägt.

Die Natriumkonzentration im Urin stieg mit sinkendem Sauerstoffverbrauch, so dass es nahe liegt, dass durch mangelnde Energie für die Na/K-ATPase weniger Rückresorption erfolgen konnte.

Im Urin kam es durch die geringe Urinmenge und der resultierenden Konzentrierung ebenfalls zu einem Anstieg der Natriumkonzentration (Abb. 24, S. 59).
Man würde davon ausgehen, dass somit der Anstieg der Natriumkonzentration im Urin proportional zur Reduktion der Urinflussrate sein müsste. Dies trifft allerdings nur bedingt zu. Obwohl in der Gruppe APOCs ND eine ebenso geringe Urinflussrate gemessen wurde wie in den Gruppen APOCs HD und APOCs ND +VitC+Glu+SOD/KAT, stieg die Natriumkonzentration in der Gruppe APOCs ND sogar noch geringer als in der Kontrolle HD, in der die höchste Urinflussrate gemessen wurde. In der Kontrolle ND hingegen, in der die Urinflussrate auch vergleichsweise hoch war, stieg die Natriumkonzentration relativ stark an. Es ist möglich, dass durch die Zugabe der APOCs in der Gruppe APOCs ND eine verstärkte Rückresorption in der Niere erreicht wurde. Möglicherweise konnte dies in der Gruppe APOCs HD durch den hohen Druck bedingt nicht erreicht werden. Verwunderlich ist es dann jedoch, dass die Konzentration in der Kontrolle HD nur gering stieg. Die Zusätze der Gruppe APOCs ND +VitC+Glu+SOD/KAT schienen hier keinen positiven Einfluss zu haben. Bereits die Proben, die dem Blasenurin entnommen wurden lagen mit Werten über 115 mmol/l über dem physiologischen Mittelwert. Jedoch sind hier starke Schwankungen möglich. (Derelanko et al., 2001) Anstiege über 150 mmol/l, wie sie in der Gruppe APOCs HD zu finden waren, liegen jedoch nicht mehr im Bereich physiologischer Schwankungen.
Möglicherweise steigt die Natriumkonzentration über den Ausgangswert und physiologische Werte bei im Verlauf mangelnder Energie für die Na/K-ATPase und somit eingeschränkter Rückresorption. Hinweis darauf ist der Anstieg der Natriumkonzentration gleichzeitig mit einem sinkenden Sauerstoffverbrauch (Abb. 20, S. 54). Einen großen Einfluss auf die steigende Natriumkonzentration werden jedoch auch die stark sinkende

Flussrate und der somit sinkende renale Blutfluss haben. Damit sinkt ebenso die GFR, wodurch kaum Primärfiltrat und letztendlich kaum und sehr konzentriertes Ultrafiltrat entsteht.

Während die Kaliumkonzentration im Perfusat am ehesten ödem-bedingt in allen Gruppen anstieg, fiel die Konzentration im Urin ischämie-bedingt stark ab.

Die Kaliumkonzentration im Perfusat stieg im Versuchsablauf in allen Gruppen weit über physiologische Werte von 4,4 mmol/l hinaus an (Abb.25, S. 60). (Derelanko et al., 2001) Der größte Anstieg wurde dabei in den Hochdruckgruppen gemessen. Wie bereits unter den Veränderungen der Natriumkonzentration beschrieben könnten diese Veränderungen mit der Bildung von Ödemen zusammen hängen, denn auch hier zeigte sich histologisch die größte Ausprägung in den Hochdruckgruppen (Abb.28, S. 65).
Die Kaliumkonzentration fiel in allen Gruppen im Vergleich zum 0 min-Blasenurin im Proben-Urin stark ab, obwohl bereits die Konzentration im Blasenurin mit 79 mmol/l unterhalb physiologischer Werte lag. (Derelanko et al., 2001) Eine erniedrigte Kaliumkonzentration trat jedoch unter Ischämie auch in anderen Studien auf.(Bazzano et al., 2015) In den Hochdruckgruppen war der Konzentrationsabfall minimal geringer. In der 180 min-Messung kam es nochmal zu einem geringen Anstieg, was die Vermutung nahe legt, dass die Nieren hier im Verlauf der Perfusion das Kalium etwas besser resorbieren konnten. Dies ist trotz der im Verlauf vermutlich sinkenden Natrium-Rückresorption möglich, da Kalium größtenteils parazellulär ohne Transporter resorbiert wird.

Unter Perfusion mit erhöhtem Druck kam es bei ausreichender Energiebereitstellung über die Atmungskette zum Anstieg der Glukosekonzentration, während unter Perfusion mit niedrigem Druck die Glukosekonzentration bei Verbrauch von Glukose in der anaeroben Glykolyse abfiel.

Bezüglich der Glukosekonzentration im Perfusat wurde deutlich, dass in der Gruppe APOCs ND, sowie der Gruppe APOCs ND +VitC+Glu+SOD/KAT und Kontrolle ND ein Abfall der Glukosekonzentration erfolgte (Abb. 26, S. 62). Da dies in Zusammenhang mit einem erhöhten Glukoseverbrauch stehen könnte, lässt dies möglicherweise auf eine

erhöhte Stoffwechselaktivität in diesen Nieren schließen. In diesen Gruppen musste auf Grund der schlecht funktionierenden Atmungskette (Abb. 16/17, S. 49 f.) auf die anaeroben Glykolyse zurückgegriffen werden, um ausreichend ATP zu produzieren. Offensichtlich war der Glukoseverbrauch in den mit hohem Druck perfundierten Nieren geringer. Diese Nieren konnten über die gut funktionierende Atmungskette ausreichend ATP produzieren, so dass weniger Glukose für die anaerobe Glykolyse verbraucht wurde. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass diese (nicht signifikanten Unterschiede) ebenfalls durch die Ödembildung in den Hochdruckgruppen bedingt sind.
Insgesamt lagen alle gemessenen Glukosewerte (bis auf den 90 min-Wert von 106 mg/dl der Kontrolle HD) noch im Rahmen physiologischer und von der Nahrungsaufnahme abhängiger Schwankungen (70-100 mg/dl). (Wang et al., 2010)

Der Zusatz von APOCs führte zu einem verringerten Glukoseverlust über den Urin, während ein hoher Druck hier am ehesten über Schädigung der glomerulären Strukturen einen negativen Einfluss hatte.

In der Auswertung des Urins zeigte sich, dass in den Gruppen APOCs ND und APOCs ND +VitC+Glu+SOD/KAT die geringste Glukosekonzentration gemessen wurde (Abb. 26, S. 62). Somit wird deutlich, dass sich der Abfall der Glukose im Perfusat nicht nur auf einen größeren Tubulusschaden und eine erhöhte Ausscheidung zurückführen lässt, sondern ein Rückschluss auf den Verbrauch der Niere zulässig ist und die mit APOCs versorgten Nieren mehr Glukose rückresorbieren konnten.
Hier zeigte sich außerdem ein Unterschied zur Kontrolle ND. Dies bedeutet, dass nicht lediglich ein adäquater Druck zur verringerten Glukoseausscheidung führt, sondern außerdem die verbesserte Versorgung mit Sauerstoff durch die APOCs einen positiven Einfluss hat. Die Glukoseausscheidung war mit Werten um die 50mg/dl jedoch auch in diesen beiden Gruppen sehr hoch. Physiologisch sollte keine Glukose im Urin zu finden sein. (Derelanko et al., 2001)
Die Niere war somit nicht mehr dazu in der Lage Glukose vollständig aus dem Tubulus zu resorbieren. Positiv ist, dass sich diese Werte im Verlauf der Perfusion nicht mehr drastisch verschlechterten.

In der Gruppe APOCs ND +VitC+Glu+SOD/KAT konnte sogar ein stetiger Abfall der Glukosekonzentration im Urin beobachtet werden, was für eine Regeneration des Tubulussystems spricht. In der histologischen Auswertung zeigten sich jedoch in keiner Färbung Hinweise auf eine gegenüber den anderen mit niedrigem Druck perfundierten Gruppen verbesserten Zustand der Nieren durch die zugefügten Zusätze dieser Gruppe.

Die Zahl der epithelialen Nekrosen konnte unter Perfusion mit hohem Druck und APOCs reduziert werden. Auch die Glykokalix konnte durch den Zusatz der APOCs geschützt werden, während ein hoher Druck hier eher einen schädigenden Einfluss zeigte.

In der Auswertung der PAS-Färbung konnte in der Gruppe APOCs ND eine signifikant geringere Schädigung der Glykokalix festgestellt werden (Abb. 29, S. 66). Während die APOCs also eine schützende Funktion gegenüber der Glykokalix haben, hat ein hoher Druck auch hier negativen Einfluss auf das Ergebnis. Die Betrachtung der Dilatation der Tubuli und der interstitiellen Ödeme bestätigt diese Ergebnisse (Abb. 30, S. 67).
Unter dem Gebrauch von APOC zeigte sich auch hier eine tendenziell geringere Schädigung als in der Kontrolle ND. Unter hohem Druck war dieser positive Einfluss der APOC nicht mehr nachzuweisen. Die schädigende Wirkung des hohen Drucks ist somit dominant gegenüber dem positiven Einfluss der APOCs.
In allen Gruppen zeigten sich starke epitheliale Nekrosen (Abb. 27, S. 64).
In der Gruppe APOCs HD konnte eine signifikant geringere Schädigung gemessen werden. Möglicherweise konnte durch die höhere Flussrate in dieser Gruppe im Vergleich zu den Gruppen mit niedrigem Druck eine bessere Sauerstoffversorgung gewährleistet werden, so dass weniger Sauerstoffmangelschäden entstanden sind. Dies bestätigt sich auch durch die in dieser Gruppe erhöhten Werte für oxidiertes Cytochrom c und b (Abb. 16/17, S. 49 f.). Dagegen spricht, dass in der Kontrolle HD, in der es ebenfalls zu höheren Flussraten kam, keine signifikant geringere Zahl epithelialer Nekrosen festgestellt wurde. Ebenso dagegen spricht, dass der hohe Druck auf alle übrigen Parameter, die in der PAS-Färbung ausgewertet wurden, eher einen schädigenden Einfluss hatte. Hinsichtlich des Gebrauchs von APOCs konnte zwischen den Gruppen hier, ebenso wie in den immunhistochemischen Färbungen und der TUNEL Färbung, kein Unterschied festgestellt werden.

Die im Vergleich zur 120 min-Kontrolle nach Perfusion verbesserten Schädigungsparamter für die TNFα-AK-Expression und die Zahl epithelialer Nekrosen deuten auf ein Regenerationspotential der ischämischen Nieren hin.

Sowohl bei der Auswertung der epithelialen Nekrosen als auch in der Färbung mittels TNFα-AK zeigte sich eine im Vergleich zu den Perfusionsgruppen signifikant höhere Schädigung in der 120 min-Kontrolle (Abb. 32, S. 69). Die Anfärbung des TNFα-AK-Rezeptors zeigte ähnliche Ergebnisse (Abb. 34, S. 71). Auch wenn die Unterschiede zwischen 120 min-Kontrolle und Kontrolle ND nicht signifikant waren, zeigte sich tendenziell eine geringere Schädigung in allen Versuchsgruppen. Die Schädigung der Glykokalix lag lediglich in der Gruppe APOCs ND unterhalb der Schädigung in der 120 min-Kontrolle. Diese Ergebnisse sprechen für eine Regeneration des Tubulussystems und einen Abbau des TNFα und dessen Rezeptoren.
Dies lässt vermuten, dass durch die Perfusion eine Regeneration der nekrotisch geschädigten Tubuluszellen erzielt werden konnte. Die geringere Schädigung in der Auswertung der Anfärbung des TNFα-AK-Rezeptors in der Gruppe APOCs HD legt nahe, dass hier ein Zusammenhang mit der in dieser Gruppe verbesserten Sauerstoffversorgung besteht (Abb. 16/17, S. 49 f.).
In allen immunhistochemischen Färbungen zeigten sich auch in den 0 min-Kontrollnieren schon starke Schäden. Diese Organe wurden nicht blutleer gespült, um den Zeitraum zwischen Entnahme und Konservierung möglichst gering zu halten. Es ist möglich, dass durch das temperierte Blut, Stoffwechselprozesse und somit auch die inflammatorischen Vorgänge noch lange genug aufrechterhalten wurden, um die Niere strukturell zu schädigen.

6 Zusammenfassung

Es konnte gezeigt werden, dass Nieren trotz 120-minütiger Ischämie wieder adäquat perfundiert werden und geringfügig Urin produzieren können. Eine Versuchsdurchführung über 180 min konnte jedoch bezüglich einer stetigen Urinproduktion sowie eines über den gesamten Versuch druckkontrolliert gleichmäßigen Flusses noch nicht stabil aufrecht erhalten werden. Hier gilt es, das System noch weiter zu optimieren, um eine längerfristige konstante Perfusion zu ermöglichen. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Verwendung von Albumin-derived, perfluordecalin-based artificial oxygen carrier (APOCs) die Nieren besser dazu in der Lage sind, ihre physiologische Funktion, z. B. in Form der Verstoffwechselung der zugeführten Glukose, aufrecht zu erhalten.

Die APOCs waren über den gesamten Versuchsablauf dazu in der Lage, auch bei geringer Flussrate genügend Sauerstoff in der Niere zu lösen. Es zeigte sich, dass ein Druck im Bereich von 60-80 mmHg im Gegensatz zu 80-100 mmHg zu niedrig gewählt war, um eine ausreichende Versorgung der Niere zu gewährleisten.

In der histologischen Untersuchung zeigte sich, dass die Verwendung der Sauerstoffträger einen positiven Einfluss auf strukturelle Veränderungen wie die Aufrechterhaltung der Glykokalix hat. In einigen Ansätzen war unter Perfusion sogar eine beginnende Regeneration des Tubulussystems zu erkennen. Histologisch zeigte sich außerdem, dass Drücke oberhalb von 80 mmHg zu einer massiven Schädigung der Nierenarchitektur führen. Der Zusatz eines Reduktionsmittels wie Ascorbinsäure bewies sich als hilfreich, um eine Oxidation von Proteinen außerhalb der Atmungskette zu verhindern. Die APOCs sind somit eine gute Möglichkeit Nieren während einer *ex vivo* Perfusion mit genügend Sauerstoff zu versorgen. In weiteren Versuchen gilt es, das System und das Perfusionsmedium zu optimieren, um einen stabilen Fluss aufrecht zu erhalten und eine konsequente Urinproduktion zu ermöglichen. Gelingt dies, könnte mit der Verwendung von APOCs die Lagerung von Nieren vor Transplantation verbessert werden, so dass für die Patienten ein besseres Outcome erzielt werden könnte.

Es zeigten sich außerdem Hinweise auf ein bestehendes Regenerationspotential, welches, unter der Voraussetzung der Eliminierung der Schwachstellen des Systems, den Pool an nutzbaren Transplantaten vergrößern könnte. Dies würde hinsichtlich des massiven Organmangels für viele Patienten die Chance auf eine Nierentransplantation mit somit erhöhter Überlebenswahrscheinlichkeit und einen Gewinn an Lebensqualität bedeuten.

7 Literaturverzeichnis

1. Arfian, N., Emoto, N., Vignon-Zellweger, N., Nakayama, K., Yagi, K.,Hirata, K. (2012). ET-1 deletion from endothelial cells protects the kidney during the extension phase of ischemia/reperfusion injury. Biochem Biophys Res Commun 425, 443-449.

2. Barker, C. F.,Markmann, J. F. (2013). Historical overview of transplantation. Cold Spring Harb Perspect Med 3, a014977.

3. Bathini, V., McGregor, T., McAlister, V. C., Luke, P. P.,Sener, A. (2013). Renal perfusion pump vs cold storage for donation after cardiac death kidneys: a systematic review. J Urol 189, 2214-2220.

4. Bazzano, T., Restel, T. I., Porfirio, L. C., Souza, A. S.,Silva, I. S. (2015). Renal biomarkers of male and female Wistar rats (Rattus norvegicus) undergoing renal ischemia and reperfusion. Acta Cir Bras 30, 277-288.

5. Bekanntmachungen: Richtlinien zur Organtransplantation gemäß § 16 TPG. (2004). Deutsches Ärzteblatt International, 246.

6. Blum, M. F., Liu, Q., Soliman, B., Dreher, P., Okamoto, T., Poggio, E. D., Goldfarb, D. A., Baldwin, W. M., 3rd,Quintini, C. (2017). Comparison of normothermic and hypothermic perfusion in porcine kidneys donated after cardiac death. J Surg Res 216, 35-45.

7. Bowman, R. H. (1970). Gluconeogenesis in the isolated perfused rat kidney. J Biol Chem 245, 1604-1612.

8. Brezis, M., Rosen, S., Spokes, K., Silva, P.,Epstein, F. H. (1984). Transport-dependent anoxic cell injury in the isolated perfused rat kidney. Am J Pathol 116, 327-341.

9. Buehler, P. W., D'Agnillo, F.,Schaer, D. J. (2010). Hemoglobin-based oxygen carriers: From mechanisms of toxicity and clearance to rational drug design. Trends in Molecular Medicine 16, 447-457.

10. Buja, L. M. (2005). Myocardial ischemia and reperfusion injury. Cardiovasc Pathol 14, 170-175.

11. Castro, C. I.,Briceno, J. C. (2010). Perfluorocarbon-based oxygen carriers: review of products and trials. Artif. Organs 34, 622-634.

12. Centis, V.,Vermette, P. (2009). Enhancing oxygen solubility using hemoglobin- and perfluorocarbon-based carriers. Front Biosci (Landmark Ed) 14, 665-688.

13. Chang, H. H., Choong, B., Phillips, A.,Loomes, K. M. (2013). Isolated perfused rat kidney: a technical update. Exp Anim 62, 19-23.

14. Council, E. P. a. E. (2010). *European Commission (2010) Directive 2010/63/EU on protection of animals used for scientific purposes*. Ispra, Italy: Institute for Health and Consumer Protection Retrieved from http://eu.vlex.com/vid/protection-animals-used-scientific-purposes-223934282.

15. de Groot, H.,Rauen, U. (2007). Ischemia-reperfusion injury: processes in pathogenetic networks: a review. Transplant Proc 39, 481-484.

16. Derelanko, M. J.,Hollinger, M. A. (2001): Handbook of Toxicology, Second Edition: Taylor & Francis.

17. Donnahoo, K. K., Meng, X., Ayala, A., Cain, M. P., Harken, A. H.,Meldrum, D. R. (1999). Early kidney TNF-alpha expression mediates neutrophil infiltration and injury after renal ischemia-reperfusion. Am J Physiol 277, R922-929.

18. Dutkowski, P., Krug, A., Krysiak, M., Dunschede, F., Seifert, J. K.,Junginger, T. (2003). Detection of mitochondrial electron chain carrier redox status by transhepatic light intensity during rat liver reperfusion. Cryobiology 47, 125-142.

19. Eisenberg-Lerner, A., Bialik, S., Simon, H. U.,Kimchi, A. (2009). Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. Cell Death Differ 16, 966-975.

20. Elzoghby, A. O., Samy, W. M.,Elgindy, N. A. (2012). Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems. J Control Release 157, 168-182.

21. Epstein, F. H., Brosnan, J. T., Tange, J. D.,Ross, B. D. (1982). Improved function with amino acids in the isolated perfused kidney. Am J Physiol 243, F284-292.

22. Ferenz, K. B. (2015). Künstliche Sauerstoffträger-Wie lange muessen wir noch warten? Hämotherapie 25, 26-35.

23. Forbes, J. M., Hewitson, T. D., Becker, G. J.,Jones, C. L. (2000). Ischemic acute renal failure: long-term histology of cell and matrix changes in the rat. Kidney Int 57, 2375-2385.

24. Franke, H., Malyusz, M.,Runge, D. (1978). Improved sodium and PAH transport in the isolated fluorocarbon-perfused rat kidney. Nephron 22, 423-431.

25. Gorner, W., Durchschlag, E., Wolf, J., Brown, E. L., Ammerer, G., Ruis, H.,Schuller, C. (2002). Acute glucose starvation activates the nuclear localization signal of a stress-specific yeast transcription factor. EMBO J 21, 135-144.

26. Habler, O., Pape, A., Meier, J.,Zwissler, B. (2005). [Artificial oxygen carriers as an alternative to red blood cell transfusion]. Anaesthesist 54, 741-754.

27. Hamar, M.,Selzner, M. (2018). Ex-vivo machine perfusion for kidney preservation. Curr Opin Organ Transplant 23, 369-374.

28. Hartwig. (1988). *Zur Konversion von Thyroxin zu Trijodthyronin an der isoliert perfundierten Rattenniere mit Bestimmung des freien Thyroxins durch Equilibriumsdialyse*. Dissertation. Medizinische Hochschule Hannover. Medizinische Hochschule Hannover.

29. He, L., Peng, K., Liu, Y., Xiong, J.,Zhu, F. F. (2013). Low expression of mixed lineage kinase domain-like protein is associated with poor prognosis in ovarian cancer patients. Onco Targets Ther 6, 1539-1543.

30. Hosgood, S. A., Nicholson, H. F.,Nicholson, M. L. (2012). Oxygenated kidney preservation techniques. Transplantation 93, 455-459.

31. Hosgood, S. A.,Nicholson, M. L. (2010). The role of perfluorocarbon in organ preservation. Transplantation 89, 1169-1175.

32. Hosgood, S. A.,Nicholson, M. L. (2011a). First in man renal transplantation after ex vivo normothermic perfusion. Transplantation 92, 735-738.

33. Hosgood, S. A.,Nicholson, M. L. (2011b). Normothermic kidney preservation. Curr Opin Organ Transplant 16, 169-173.

34. Hosgood, S. A.,Nicholson, M. L. (2014a). Ex vivo normothermic perfusion of declined human kidneys after inadequate in situ perfusion. Am J Transplant 14, 490-491.

35. Hosgood, S. A.,Nicholson, M. L. (2014b). The first clinical case of intermediate ex vivo normothermic perfusion in renal transplantation. Am J Transplant 14, 1690-1692.

36. Hosgood, S. A., Patel, M.,Nicholson, M. L. (2013). The conditioning effect of ex vivo normothermic perfusion in an experimental kidney model. J Surg Res 182, 153-160.

37. Hossmann, K. A. (2006). Pathophysiology and therapy of experimental stroke. Cell Mol Neurobiol 26, 1057-1083.

38. Jägers, J. (2017). *Zur Erforschung der Auswirkungen eines Blutersatzstoffes im Modell der isoliert perfundierten Niere*.

39. Jia, L., Li, X., Shao, C., Wei, L., Li, M., Guo, Z., Liu, Z.,Gao, Y. (2013). Using an isolated rat kidney model to identify kidney origin proteins in urine. PLoS One 8, e66911.

40. Jochmans, I., O'Callaghan, J. M., Pirenne, J.,Ploeg, R. J. (2015). Hypothermic machine perfusion of kidneys retrieved from standard and high-risk donors. Transpl Int 28, 665-676.

41. Kaiser, G. M., Radunz, S., Becker, S., Thavarajah, S., Paul, A.,Heuer, M. (2014). Organ Donation: New Hope Through the Expected Amendment in Germany? Transplant Proc 46, 2040-2042.

42. Kaminski, J., Delpech, P. O., Kaaki-Hosni, S., Promeyrat, X., Hauet, T.,Hannaert, P. (2019). Oxygen Consumption by Warm Ischemia-Injured Porcine Kidneys in Hypothermic Static and Machine Preservation. J Surg Res 242, 78-86.

43. Kaths, J. M., Cen, J. Y., Chun, Y. M., Echeverri, J., Linares, I., Ganesh, S., Yip, P., John, R., Bagli, D., Mucsi, I., Ghanekar, A., Grant, D., Robinson, L. A.,Selzner, M. (2016). Continuous Normothermic Ex Vivo Kidney Perfusion is Superior to Brief Normothermic Perfusion Following Static Cold Storage in Donation After Circulatory Death Pig Kidney Transplantation. Am J Transplant

44. Kaths, J. M., Echeverri, J., Chun, Y. M., Cen, J. Y., Goldaracena, N., Linares, I., Dingwell, L. S., Yip, P., John, R., Bagli, D., Mucsi, I., Ghanekar, A., Grant, D., Robinson, L.,Selzner, M. (2016). Continuous Normothermic Ex Vivo Kidney Perfusion Improves Graft Function in Donation after Circulatory Death Pig Kidney Transplantation. Transplantation

45. Kaths, J. M., Echeverri, J., Goldaracena, N., Louis, K. S., Chun, Y. M., Linares, I., Wiebe, A., Foltys, D. B., Yip, P. M., John, R., Mucsi, I., Ghanekar, A., Bagli, D. J., Grant, D. R., Robinson, L. A.,Selzner, M. (2016). Eight-Hour Continuous Normothermic Ex Vivo Kidney Perfusion Is a Safe Preservation Technique for Kidney Transplantation: A New Opportunity for the Storage, Assessment, and Repair of Kidney Grafts. Transplantation 100, 1862-1870.

46. Kaths, J. M., Paul, A., Robinson, L. A.,Selzner, M. (2018). Ex vivo machine perfusion for renal graft preservation. Transplant Rev (Orlando) 32, 1-9.

47. Kay, M. D., Hosgood, S. A., Harper, S. J., Bagul, A., Waller, H. L.,Nicholson, M. L. (2011). Normothermic versus hypothermic ex vivo flush using a novel phosphate-free preservation solution (AQIX) in porcine kidneys. J Surg Res 171, 275-282.

48. Kohan, D. E., Rossi, N. F., Inscho, E. W.,Pollock, D. M. (2011). Regulation of blood pressure and salt homeostasis by endothelin. Physiol Rev 91, 1-77.

49. Kosieradzki, M.,Rowinski, W. (2008). Ischemia/reperfusion injury in kidney transplantation: mechanisms and prevention. Transplant Proc 40, 3279-3288.

50. Koul, V., Kaur, A.,Singh, A. P. (2015). Investigation of the role of nitric oxide/soluble guanylyl cyclase pathway in ascorbic acid-mediated protection against acute kidney injury in rats. Mol Cell Biochem 406, 1-7.

51. Krafft, M. P. (2001). Fluorocarbons and fluorinated amphiphiles in drug delivery and biomedical research. Adv Drug Deliv Rev 47, 209-228.

52. Lagadic-Gossmann, D., Huc, L.,Lecureur, V. (2004). Alterations of intracellular pH homeostasis in apoptosis: origins and roles. Cell Death Differ 11, 953-961.

53. Lam, V. W., Laurence, J. M., Richardson, A. J., Pleass, H. C.,Allen, R. D. (2013). Hypothermic machine perfusion in deceased donor kidney transplantation: a systematic review. J Surg Res 180, 176-182.

54. Leland, C. C. J.,Gollan, F. (1966). Survival of Mammals Breathing Organic Liquids Equilibrated with Oxygen at Atmospheric Pressure. Science 152, 1755-1756.

55. Lieberthal, W., Stephens, G. W., Wolf, E. F., Rennke, H. G., Vasilevsky, M. L., Valeri, C. R.,Levinsky, N. G. (1987). Effect of erythrocytes on the function and morphology of the isolated perfused rat kidney. Ren Physiol 10, 14-24.

56. Lyon, H. C. d. (2015). Pulsatile Perfusion Perservation in kidney Transplantation From Expanded Criteria Donors (IMPULSION) (Clinical Trial). (NCT01170910). Retrieved 10.03.2015, from U.S. National Institute of Health http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01170910

57. Maack, T. (1980). Physiological evaluation of the isolated perfused rat kidney. Am J Physiol 238, F71-78

58. Mann, C. D., Metcalfe, M. S.,Nicholson, M. L. (2009). Normothermic perfusion of ischaemic porcine kidneys: an evaluation of ex vivo function and endothelin receptor antagonism. J Nephrol 22, 144-151.

59. Morrissey, P. E.,Monaco, A. P. (2014). Donation after circulatory death: current practices, ongoing challenges, and potential improvements. Transplantation 97, 258-264.

60. Neuberger T., B. S., H. Hofmann, M. Hofmann, B. von Rechenberg. (2005). Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: Possibilities and limitations of a new drug delivery system. J. Magn. Magn. Mater. 293, 483–496.

61. Oh, D. J., Dursun, B., He, Z., Lu, L., Hoke, T. S., Ljubanovic, D., Faubel, S.,Edelstein, C. L. (2008). Fractalkine receptor (CX3CR1) inhibition is protective against ischemic acute renal failure in mice. Am J Physiol Renal Physiol 294, F264-271.

62. Jahresbericht Organspende und Transplantation in Deutschland, Deutsche Stiftung Organtransplantation (2019). Jahresbericht Organspende und Transplantation in Deutschland.

63. Poola, N. R., Bhuiyan, D., Ortiz, S., Savant, I. A., Sidhom, M., Taft, D. R., Kirschenbaum, H.,Kalis, M. (2002). A novel HPLC assay for pentamidine: comparative effects of creatinine and inulin on GFR estimation and pentamidine renal excretion in the isolated perfused rat kidney. J Pharm Pharm Sci 5, 135-145.

64. Radermacher, J., Klanke, B., Kastner, S., Haake, G., Schurek, H. J., Stolte, H. F.,Frolich, J. C. (1991). Effect of arginine depletion on glomerular and tubular kidney function: studies in isolated perfused rat kidneys. Am J Physiol 261, F779-786.

65. Rafikova, O., Sokolova, E., Rafikov, R.,Nudler, E. (2004). Control of plasma nitric oxide bioactivity by perfluorocarbons: Physiological mechanisms and clinical implications. Circulation 110, 3573-3580.

66. Riess, J. G. (2005). Understanding the fundamentals of perfluorocarbons and perfluorocarbon emulsions relevant to in vivo oxygen delivery. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol 33, 47-63.

67. Russell, W. M. S.,Burch, R. L. (1959). The principles of humane experimental technique.

68. Schafer, A. I. (1997). Vascular endothelium: in defense of blood fluidity. J Clin Invest 99, 1143-1144.

69. Scholer, M., Frietsch, T., Jambor, C.,Knels, R. (2010). [Artificial blood - coming soon or never reaching clinical maturity?]. Dtsch Med Wochenschr 135, 575-581.

70. Schurek, H. J. (2016): Laborhandbuch Nierenperfusion: Universitätsverl. Ilmenau.

71. Schurek, H. J.,Alt, J. M. (1981). Effect of albumin on the function of perfused rat kidney. Am J Physiol 240, F569-576.

72. Schurek, H. J., Aulbert, E.,Ebel, H. (1976). 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.

73. Schurek, H. J., Brecht, J. P., Lohfert, H.,Hierholzer, K. (1975). The basic requirements for the function of the isolated cell free perfused rat kidney. Pflugers Arch 354, 349-365.

74. Schurek, H. J.,Kriz, W. (1985). Morphologic and functional evidence for oxygen deficiency in the isolated perfused rat kidney. Lab Invest 53, 145-155.

75. Sharif, A.,Borrows, R. (2013). Delayed Graft Function After Kidney Transplantation: The Clinical Perspective. American Journal of Kidney Diseases 62, 150-158.

76. Silbernagel, S., Klinke, R.,Pape, H. C. (2005): Physiologie (5. Auflage). Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.

77. Singh, R. P., Farney, A. C., Rogers, J., Zuckerman, J., Reeves-Daniel, A., Hartmann, E., Iskandar, S., Adams, P.,Stratta, R. J. (2011). Kidney transplantation from donation after cardiac death donors: lack of impact of delayed graft function on post-transplant outcomes. Clin Transplant 25, 255-264.

78. Sloviter, H. A.,Kamimoto, T. (1967). Erythrocyte Substitute for Perfusion of Brain. Nature 216, 458-460.

79. Taft, D. R. (2004). The isolated perfused rat kidney model: a useful tool for drug discovery and development. Curr Drug Discov Technol 1, 97-111.

80. Thuillier, R., Delpy, E., Matillon, X., Kaminski, J., Kasil, A., Soussi, D., Danion, J., Sauvageon, Y., Rod, X., Donatini, G., Barrou, B., Badet, L., Zal, F.,Hauet, T. (2019). Preventing acute kidney injury during transplantation: the application of novel oxygen carriers. Expert Opin Investig Drugs 28, 643-657.

81. Tomita, Y., Tojimbara, T., Iwadoh, K., Nakajima, I.,Fuchinoue, S. (2017). Long-Term Outcomes in Kidney Transplantation From Expanded-Criteria Donors After Circulatory Death. Transplant Proc 49, 45-48.

82. Wang, Z., Yang, Y., Xiang, X., Zhu, Y., Men, J.,He, M. (2010). [Estimation of the normal range of blood glucose in rats]. Wei Sheng Yan Jiu 39, 133-137, 142.

83. Watson, C. J.,Dark, J. H. (2012). Organ transplantation: historical perspective and current practice. Br J Anaesth 108 Suppl 1, i29-42.

84. Weinberg, J. M. (1991). The cell biology of ischemic renal injury. Kidney Int 39, 476-500.

85. Weiss, C., Passow, H.,Rothstein, A. (1959). Autoregulation of flow in isolated rat kidney in the absence of red cells. Am J Physiol 196, 1115-1118.

86. Wrobeln, A. (2013). *Synthese und Charakterisierung von Perfluordecalin gefüllten Albuminkapseln als Sauerstoffträger*. Masterarbeit Universitätsklinkum Essen.

87. Wrobeln, A., Laudien, J., Gross-Heitfeld, C., Linders, J., C., M., Wilde, B., Knoll, T., Naglav, D., Kirsch, M.,Ferenz, K. B. (2017). Albumin-derived perfluorocarbon-based artificial oxygen carriers: A physico-chemical characterization and first in vivo evaluation of biocompatibility. Eur J Pharm Biopharm

88. Wrobeln, A., Schlueter, K.-D., Linders, J., Zaehres, M., Mayer, C., Kirsch, M.,K.B., F. (2017). Functionality of albumin-derived perfluorocarbon-based artificial oxygen carriers. Artif Cells Nanomed Biotechnol 45, 723-730.

89. Wu, H., Ma, J., Wang, P., Corpuz, T. M., Panchapakesan, U., Wyburn, K. R.,Chadban, S. J. (2010). HMGB1 contributes to kidney ischemia reperfusion injury. J Am Soc Nephrol 21, 1878-1890.

90. Yamada, K., Miwa, T., Liu, J., Nangaku, M.,Song, W. C. (2004). Critical protection from renal ischemia reperfusion injury by CD55 and CD59. J Immunol 172, 3869-3875.

91. Zweier, J. L.,Talukder, M. A. (2006). The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. Cardiovasc Res 70, 181-190.

8 Abbildungsverzeichnis

Ligaturen....27
Arterienkatheter....27
Venenkatheter....27
Ureterkatheter....27
Entnommene Niere mit Arterien-, Venen- und Ureterkatheter ....
und aufliegender O2C-Sonde im Organbad....28
Arbeitsplatz....29
Versuchsaufbau....31
Versuchsablauf....35
TCA-Fällung....39
Perfusionsdruck....43
Perfusionsflussrate....44
Druck-Fluss-Quotient....45
pH Perfusat....46
pH Perfusat aus BGA....47
Urinflussrate....48
Zeitabhängiger Verlauf Cytochrom C 49
Zeitabhängiger Verlauf Cytochrom B 50
Osmolarität Perfusat....51
Sauerstoffkonzentration Perfusat – 0 min....53
Sauerstoffverbrauch....54
Sauerstoffverbrauch modifiziert....55
GFR....56
Inulinkonzentration Perfusat....57
Natriumkonzentration....59
Kaliumkonzentration....60
Glukosekonzentration....62
Epitheliale Nekrosen....64
Interstitielle Ödeme....65
Verlust des Bürstensaums....66
Dilatation der Tubuli....67

TNFα-AK Färbung....69
TNFα-Rezeptor-AK Färbung....71
TUNEL-Färbung....73

9 Tabellenverzeichnis

Geräte....18
Verbrauchsmaterialien....20
Puffer und Lösungen....22
Aminosäure-Gemisch....22
Chemikalien....23
Computerprogramme....24
BSA-Puffer....32
Baseline Perfusionspuffer....32
Zusammensetzung Perfusionsmedien....33
Exemplarische Berechnung der Fraktionellen Exkretion von Natrium....58
Äußeres Nierenmark in der PAS-Färbung....68
TNFα-AK-Färbung (Beispiele)....70
TNFα-Rezeptor-AK-Färbung (Beispiele)....72
TUNEL-Färbung (Beispiele)....74

10 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APOC	Albumin-derived, perfluorodecalin-based artificial oxygen carrier
ATP	Adensintriphosphat
AK	Antikörper
BGA	Blutgas-Analyse
BSA	Bovines Serumalbumin
DAPI	4′,6-Diamidin-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonucleinacid
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
HD	hoher Druck
KH	Krebs-Henseleit
ND	niedriger Druck
O2C	Oxygen to see
PAS	periodic acid-Schiff
PBS	Phosphate buffered saline
PBST	Phosphate buffered saline with Tween
PFC	Perfluorcarbon
PFD	Perfluordecalin
rpm	rounds per minute
TNFα	Tumor necrosis factor α
TNFαR1	Tumor necrosis factor α receptor 1
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling

11 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Menschen, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben, danken.

Besonders danken möchte ich meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Ferenz für die herausragende Betreuung während der Anfertigung meiner Dissertation. Ob durch aufmunternde Worte in schwierigen Phasen oder Rat und Tat in zahlreichen Situationen stand mir Frau Prof. Dr. Ferenz immer zur Seite.

Außerdem danken möchte ich Johannes Jägers, der mich mit großer Geduld in die Operationstechniken und Versuchsdurchführungen eingearbeitet hat und mich mit seiner Begeisterung für die Thematik mitgerissen hat.

Ich danke Herrn Prof. Kirsch für seine Unterstützung während der Erarbeitung meiner Dissertation. Bei einigen biochemischen Problemen, die sich im Verlauf auftaten, nahm Herr Prof. Kirsch sich jedes mal die Zeit, um sich damit auseinander zu setzen.

Ein besonderer Dank gilt außerdem meinen Eltern Iris und Thomas Küpers, die mich auf meinem Weg durch das Studium begleitet und mich in allen Belangen immer unterstützt haben.

Des Weiteren möchte ich meinem ehemaligen Doktorvater Herrn Prof. de Groot für die Ideengebung zu dieser Arbeit danken und ihm gedenken.

Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen ist der Lebenslauf in der Online-Version nicht enthalten