



Das Modell der isolierten perfundierten Schweineniere zur Erforschung chirurgischer Therapieverfahren

Kristina Peters¹, Maurice Stephan Michel¹, Ulrike Matis² und Axel Häcker¹

¹Urologische Klinik, Universitätsklinikum Mannheim, Fakultät für klinische Medizin Mannheim der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, Deutschland

²Chirurgische Tierklinik, Veterinärmedizinische Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität München, Deutschland

Zusammenfassung

Bei der Entwicklung innovativer chirurgischer Therapieverfahren werden die Untersuchungen klassischerweise im Tierversuch durchgeführt, weil entscheidende Eigenschaften wie Gewebeabtrag und Blutungsneigung nicht an Zellkulturen o.ä. untersucht werden können. Extrakorporale Organmodelle hingegen haben dieses Potenzial und könnten Tierversuche zukünftig entscheidend reduzieren. Ziel dieser Arbeit war es daher, das Modell der isolierten perfundierten Schweineniere bezüglich seiner Einsetzbarkeit für chirurgische Fragestellungen anhand histologischer und radiologischer Untersuchungen zu überprüfen. Die Ergebnisse zeigen, dass weder durch Lagerung, noch durch künstliche Perfusion strukturelle oder funktionelle Schäden auftraten, die die Qualität des Organs beeinträchtigen würden. Das Nierenmodell ist sehr gut geeignet, die Nierenphysiologie in weiten Bereichen nachzubilden und ermöglicht eine konstante Einstellung von Perfusionsdruck und Gewebetemperatur. Daher stellt das Nierenmodell, mit moderatem Arbeitsaufwand, eine kostengünstige und stets verfügbare Alternative zum konventionellen Tierversuch dar, die standardisierbare Versuchsbedingungen und valide Ergebnisse gewährleistet.

Summary: The isolated perfused porcine kidney model for investigations concerning surgical therapy procedures

Experiments to develop innovative surgical therapy procedures are conventionally conducted on animals, as crucial aspects like tissue removal and bleeding disposition cannot be investigated in vitro. Extracorporeal organ models however reflect these aspects and could thus reduce the use of animals for this purpose fundamentally in the future. The aim of this work was to validate the isolated perfused porcine kidney model with regard to its use for surgical purposes on the basis of histological and radiological procedures. The results show that neither storage nor artificial perfusion led to any structural or functional damage which would affect the quality of the organ. The kidney model is highly suitable for simulating the main aspects of renal physiology and allows a constant calibration of perfusion pressure and tissue temperature. Thus, with only a moderate amount of work involved, the kidney model provides a cheap and readily available alternative to conventional animal experiments; it allows standardised experimental settings and provides valid results.

Keywords: 3R, organmodel, surgical innovations, kidney

1 Einleitung und Fragestellung

Zahlreiche Faktoren sprechen für die Verwendung von Organmodellen anstelle von Tierversuchen bei grundlegenden Untersuchungen innovativer Therapieformen in der Medizin. Insbesondere die Vermeidung von Tierversuchen aus ethischer, aber auch aus finanzieller Sicht ist hierbei zu nennen. Das Modell der isolierten perfundierten Schweineniere wur-

de an der Urologischen Klinik des Universitätsklinikums Mannheim bereits 1994 für Versuche zur Extrakorporalen Stoßwellentherapie eingeführt (Köhrmann et al., 1994). Ziel der vorliegenden Arbeit war es, histologisch und mittels radiologischer Bildgebung zu überprüfen, ob das Nierenmodell den hohen Anforderungen an ein Organmodell gerecht wird und eine Standardisierbarkeit der Versuche gewährleistet werden kann, um

zukünftig zunehmend Untersuchungen bezüglich innovativer Verfahren der Chirurgie an Versuchstieren ersetzen zu können.

2 Organgewinnung, Material und Methoden

Organgewinnung und -aufbereitung: Die Nieren wurden während des Schlachtbetriebs des Fleischversorgungszentrums Mannheim GmbH gewonnen. Maximal

Das Manuskript wurde am 18. August 2006 eingereicht; am 7. September 2006 wurde die revidierte Fassung zum Druck angenommen



10-15 Minuten nach Tötung der Schweine konnte mit der Aufbereitung der Nieren begonnen werden. Nach der Präparation von Nierenarterie, Nierenvene und Ureter wurden die Nieren per Hand mit physiologischer Kochsalzlösung perfundiert, bis die Spülflüssigkeit klar aus der Vene hervortrat (ca. 500 ml). Direkt im Anschluss wurden die Nieren in 4°C kalter physiologischer Kochsalzlösung bis zum Versuchsbeginn gelagert. Das Vorgehen entsprach in etwa der Vorgehensweise bei der Organkonservierung humaner Transplantatnieren. Um möglichst physiologische Verhältnisse zu schaffen, wurden die Nieren während der Versuche in 37°C warmer physiologischer Kochsalzlösung gelagert. Die Perfusion mit physiologischer Kochsalzlösung bzw. gerinnungsgehemmtem, verdünntem Schweineblut (je nach Fragestellung) wurde über einen Perfusor und einen Windkessel zum Ausgleich der sinusförmigen Druckschwankungen umgesetzt. Die Perfusionsrate betrug 100 ± 10 ml/min und der Perfusionsdruck 100-120 cm Wassersäule (Abb. 1).

Histologie: Zur Überprüfung der mikrostrukturellen Unversehrtheit und der Lebensfähigkeit der Nierenzellen wurden histologische Präparate angefertigt. Zum Einsatz kamen die HE (Hämatoxylin-Eosin) und die NADH (Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid) Färbung.

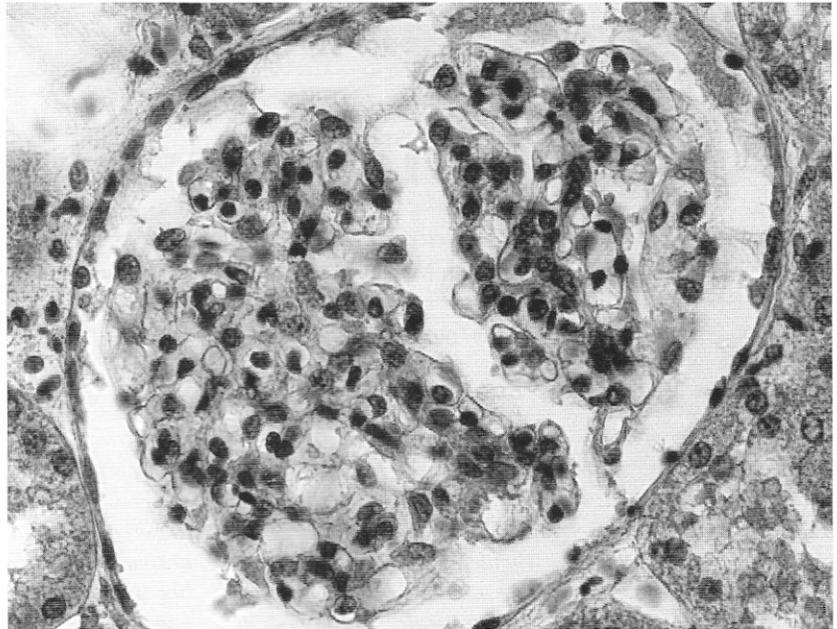


Abb. 2: Histologische Aufnahme; Nierenkörperchen 40-fache Vergrößerung

Mikroangiographie: Zur Überprüfung der Unversehrtheit des Blutgefäßsystems wurden mikroangiographische Aufnahmen angefertigt. Hierzu wurden Nieren mit Röntgenkontrastmittel (25%ige Bariumsulfatlösung) angereichert, in 5 mm starke, planparallele Longitudinalscheiben geschnitten und mit einer Einstellung von 24 kV und 80 mAs mit einem Mammographiegerät aufgenommen.

Doppler Ultraschall: Zur Überprüfung der Regelmäßigkeit der Perfusion des Nierengewebes und der großen Nierengefäße wurden Doppler Ultraschall Untersuchungen mit einem 7,5 MHz Schallkopf durchgeführt.

Magnetresonanztomographie (MRT): Zur Überprüfung eines möglichen morphologischen Schadens durch Lagerung und/oder Perfusion wurden T1- und T2-gewichtete MRT Aufnahmen akquiriert, sowie Kontrastmittel gestützte Perfusionsmessungen durchgeführt. Zur Anwendung kamen Körper- und Rücken-spulen für den Signalempfang in einem 1,5 Tesla MR Tomographen.

3 Ergebnisse

Grundsätzliches: Die Funktion der Nieren bezüglich der Produktion von Pseudourin war erhalten, auf eine Quantifizierung wurde verzichtet. Eine Nutzung war für ca. 6 Stunden nach der Gewinnung möglich. Erst nach Ablauf dieser Zeit traten Unregelmäßigkeiten im Perfusionsbild auf.

Histologie: In den HE-Präparaten war die mikrostrukturelle Morphologie unverändert (Abb. 2). Es fanden sich keine Hinweise auf mechanische Schädigungen und nur sehr geringfügige Hinweise

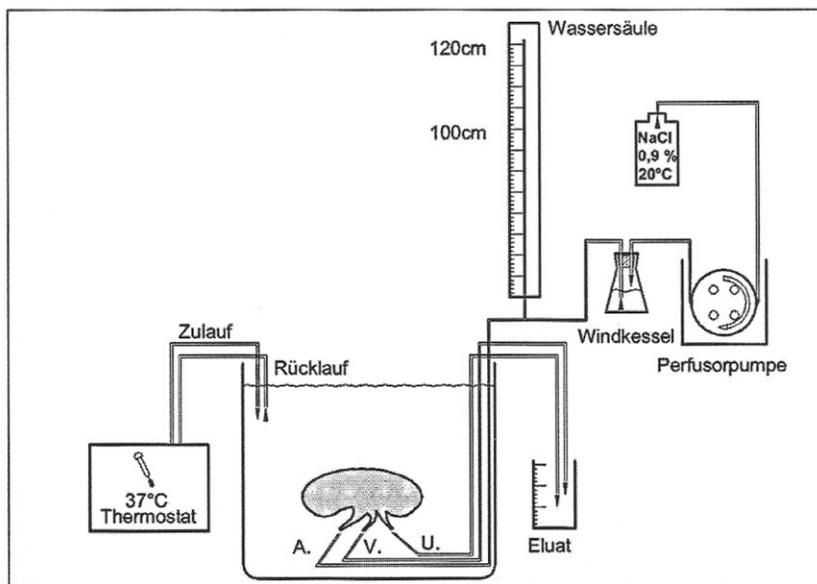


Abb. 1: Schematische Darstellung des Modells der isolierten, perfundierten Schweineniere; A. = Nierenarterie, V. = Nierenvene, U. = Harnleiter

auf Schäden durch Sauerstoffmangel. In den NADH-Präparaten konnte stets eine deutliche Enzymaktivität nachgewiesen werden. Es fanden sich keine Hinweise auf hypoxische oder mechanische Schädigungen.

Mikroangiographie: Das Gefäßsystem war intakt und eine vollständige Darstellung von Nierenarterie und Nierenvene sowie des Gefäßbaumes möglich. Die Verteilung des Kontrastmittels erfolgte gleichmäßig über das Nierengewebe (Abb. 3).

Doppler Ultraschall: In der Regel war die Perfusion im gesamten Nierenparenchym gleichmäßig verteilt und deutlich darstellbar. In einem Fall wurden geringfügige Unregelmäßigkeiten gefunden. Die Blutgefäße und die Strömungsbewegungen des Perfusats waren deutlich erkennbar. Es waren keine morphologischen Veränderungen erfassbar.

Magnetresonanztomographie (MRT): Analog zu den Ergebnissen der Ultra-

schalluntersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass das Nierengewebe keinen Schaden genommen hatte und die Perfusion regelmäßig verteilt war (Abb. 4).

4 Diskussion

Trotz großer Fortschritte in Früherkennung und Behandlung liegt die Zahl von Patienten, die an Krebs neu erkrankt sind, allein in Deutschland jährlich bei über 400.000 Menschen (GEKID, 2006). Daraus ergibt sich die Notwendigkeit der Weiterentwicklung und Verfeinerung bestehender Therapieformen sowie der Aufnahme innovativer chirurgischer Verfahren in die Onkologie. Bis dato werden diese in der Regel im Tierversuch getestet (Wohlgemuth et al., 2001; Edd et al., 2006; Haghghi et al., 2006; Yu et al., 2006). Für die Erforschung neuer chirurgischer Verfahren können Simulationen

und theoretische Modelle erste Anhaltspunkte bieten (Chauhan, 2001; Curiel et al., 2004; Dong et al., 2004), doch müssen gerade die Eigenschaften bezüglich Gewebeabtrag und Blutungsneigung experimentell erfasst werden. Dies ist an Zellkulturen nicht möglich, doch besitzen Untersuchungen an extrakorporalen Organmodellen große Aussagekraft, und Tierversuche können entscheidend vermindert und im Idealfall sogar vollständig vermieden werden (Michel et al., 1996; Arefiev et al., 1998; Knoll et al., 2002; Dittrich et al., 2004; Wendt-Nordahl et al., 2004; Strohmaier and Giese, 2005). Ziel dieser Arbeit war es daher, zu evaluieren, ob das Modell der isolierten perfundierten Schweineniere die hohen Anforderungen an ein solches Organmodell erfüllt. Die Nieren stellen ein Nebenprodukt der Schlachtung dar und stehen jederzeit in nahezu unbegrenzter Stückzahl kostengünstig zur Verfügung. Daher sind breit angelegte Studien mög-

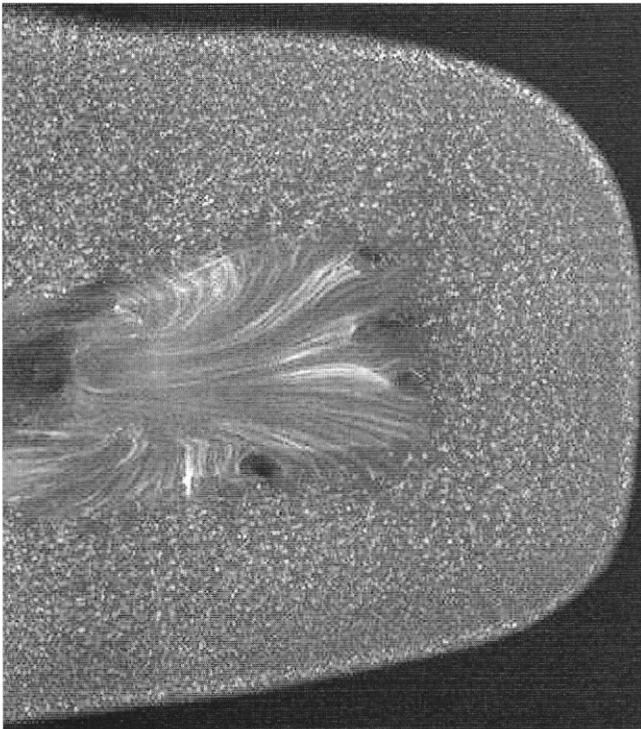


Abb. 3: Mikroangiographische Aufnahme der Nierenrinde

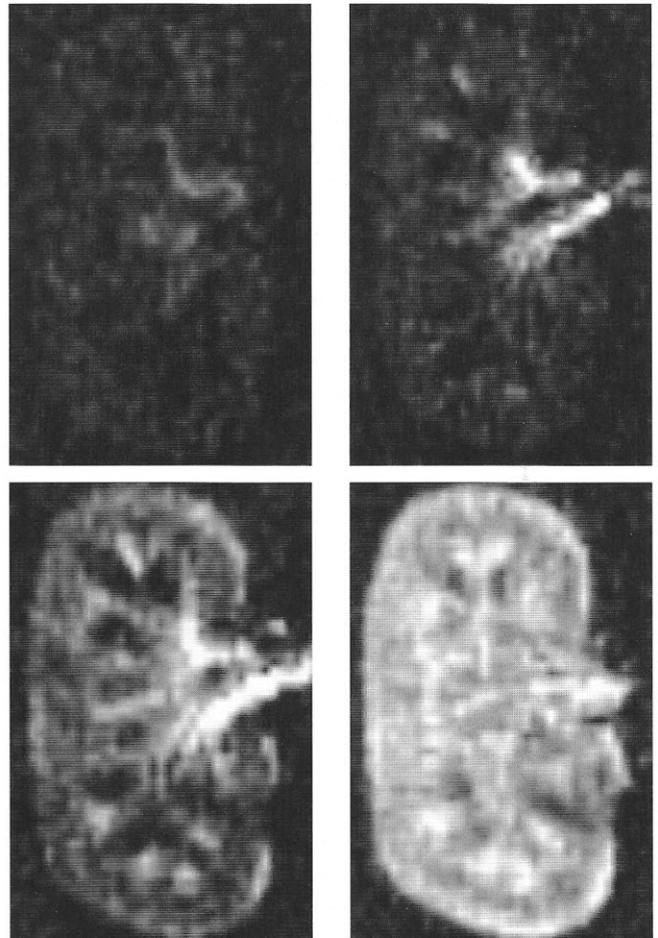


Abb. 4: MRT Kontrastmittel-Aufnahmen der Nierenperfusion

lich, deren Aussagekraft höher ist als die konventioneller Tierversuchstudien, die aus Kostengründen meist in weit kleinerem Rahmen durchgeführt werden. Durch die Technisierung von Zucht-, Mast- und Haltungsbedingungen stellen die Schlachtschweine zudem eine quasi standardisierte Grundgesamtheit dar und gewährleisten die Vergleichbarkeit der gewonnenen Ergebnisse. Es zeigte sich darüber hinaus, dass die Aufbereitung der Nieren sowie der Versuchsaufbau mit überschaubarem Arbeits- und Zeitaufwand zu realisieren waren. Ein weiterer entscheidender Vorteil ist die Standardisierbarkeit der Versuchsbedingungen durch die Isolierung des Organs. So können durch Eliminierung von Unsicherheitsfaktoren wie zum Beispiel der Atembewegung ausschließlich die Einflüsse streng definierter Versuchsparameter untersucht werden.

Eine gleichmäßige Durchblutung der Niere ist Grundvoraussetzung für die Funktionen der Ausscheidung und Regulation des Wasser- und Elektrolythaushaltes. Daher lag bei den Untersuchungen dieser Arbeit besonderes Augenmerk auf der strukturellen und funktionellen Unversehrtheit des Nierengewebes und speziell der Blutgefäße sowie der Beurteilung der Perfusion. Mittels Mikroangiographie, Doppler Ultraschall und Magnetresonanztomographie konnte eine regelmäßige Verteilung des Perfusats im gesamten Nierengewebe nachgewiesen werden. Darüber hinaus fanden sich keine Anhaltspunkte auf Gewebeschäden durch Lagerung oder künstliche Perfusion. Dies wurde auf mikroskopischer Ebene durch histologische Untersuchungen bestätigt und zudem eine rege Enzymaktivität der Nierenzellen gezeigt. Dennoch dürfen gewisse Einschränkungen nicht unerwähnt bleiben. Eine Beurteilung der Reaktion des Gesamtorganismus auf die untersuchte Therapieform sowie der Langzeiteffekte am behandelten Organ ist bei einem isolierten Organmodell nicht möglich. Auch bestehen trotz aller anatomischer und funktioneller Ähnlichkeit der Nieren Speziesunterschiede zwischen Mensch und Schwein. Daher lassen sich die Ergebnisse nicht mit völliger Sicherheit direkt und ohne entsprechende Anpassungen auf den Menschen übertragen. Nichts desto trotz

ist die Niere des Schweins bis heute das beste Modell für urologische Fragestellungen und Therapien am Menschen (Pereira-Sampaio et al., 2004). Auf eine Bestimmung funktioneller Parameter, wie die Kreatinin-clearance, GFR und die quantitative Bestimmung des Pseudourins wurde in den vorliegenden Untersuchungen verzichtet. Diese Parameter müssten selbstverständlich erhoben werden, wenn das Modell für pharmakologische oder physiologische Fragestellungen dienen soll. Sowohl die Perfusionsbilder, also auch die Produktion von Pseudourin und vor allem auch die Er-

gebnisse der NADH Färbung zeigen, dass die Nieren funktionell und strukturell weitgehend unversehrt und vital waren. Daher zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit sowie die Untersuchungen von Florian bezüglich funktioneller Aspekte des Nierenmodells (Florian, 1996), dass es sich sehr gut dazu eignet, die Physiologie der intakten Schweineniere in weiten Bereichen nachzubilden. Es ermöglicht weiterhin eine konstante Einstellung von Perfusionsdruck und Gewebetemperatur und damit eine Simulation der physiologischen Nierendurchblutung, ohne das Nierengewebe strukturell

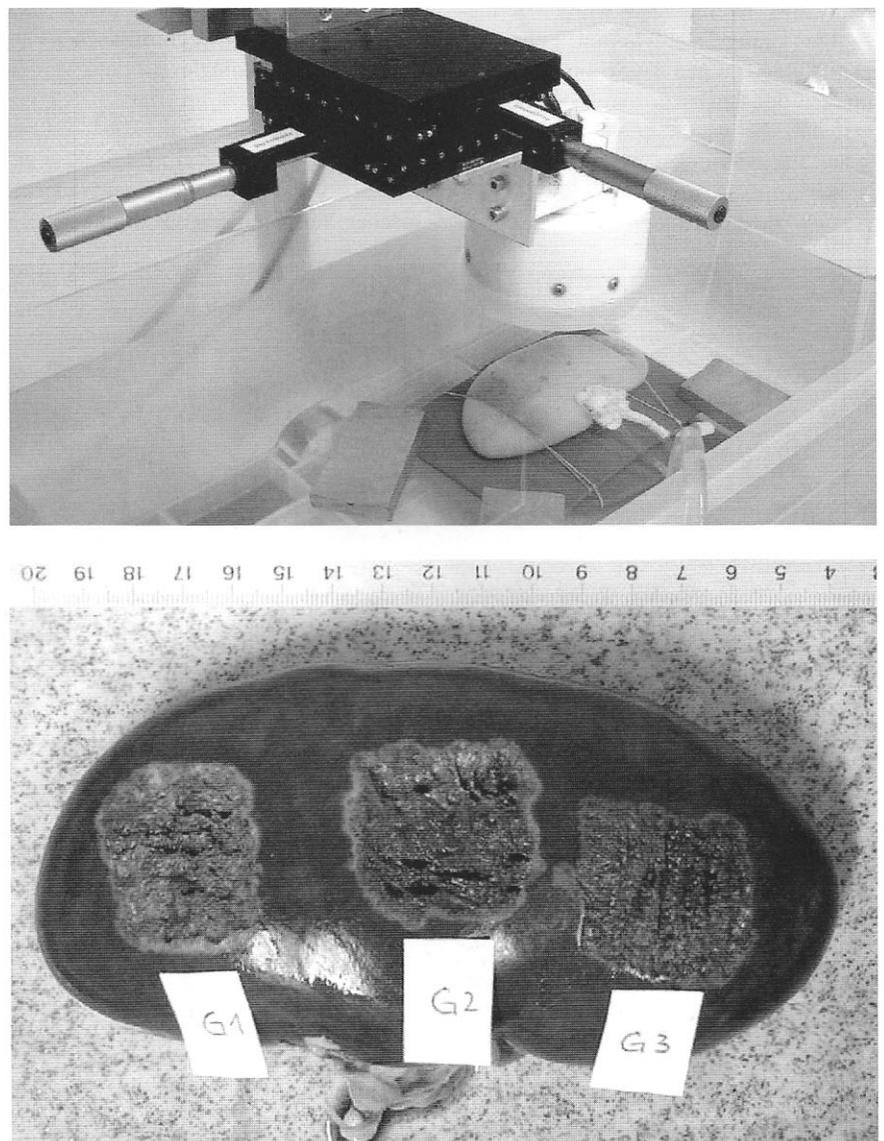


Abb. 5: Einsatz des Nierenmodells zur Untersuchung von gewebeablativen Eigenschaften des Fokussierten Ultraschalls (oben) und des Green Light Lasers (unten)

und funktionell zu schädigen. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde das Nierenmodell am Universitätsklinikum Mannheim inzwischen erfolgreich für die Untersuchung von Radiofrequenzablation, Laser induzierte Thermotherapie, Kryoablation und Fokussierte Ultraschallchirurgie, als minimal invasive Verfahren zur Tumortherapie (Häcker et al., 2005 u. 2006) und als Übungsmodell für laparoskopische Operationstechniken eingesetzt (s. Abb. 5).

Literaturverzeichnis

- Arefiev, A., Prat, F., Chapelon, J. Y. et al. (1998). Ultrasound-induced tissue ablation: studies on isolated, perfused porcine liver. *Ultrasound Med. Biol.* 24, 1033-1043.
- Chauhan, S. (2001). *Field modelling for Multiple Focused Ultrasound Transducers*. In 8th IEEE International Conference on Mechatronics and Machine Vision in Practise, Hong Kong.
- Curjel, L., Chavrier, F., Gignoux, B. et al. (2004). Experimental evaluation of lesion prediction modelling in the presence of cavitation bubbles: intended for high-intensity focused ultrasound prostate treatment. *Med. Biol. Eng. Comput.* 42, 44-54.
- Dittrich, S., Groneberg, D.A., von Loeper, J. et al. (2004). Influence of cold storage on renal ischemia reperfusion injury after non-heart-beating donor explantation. *Nephron Exp. Nephrol.* 96, 97-102.
- Dong, M., Wan, B. K., Zhang, L. X. and Yong, H. (2004). Theoretical modeling study of the necrotic field during high-intensity focused ultrasound surgery. *Med. Sci. Monit.* 10, 19-23.
- Edd, J. F., Horowitz, L., Davalos, R. V. et al. (2006). In vivo results of a new focal tissue ablation technique: irreversible electroporation. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 53, 1409-1415.
- Florian, J. (1996). *Funktionelle und morphologische Läsionen durch Stoßwellenapplikation am ex-vivo Modell der isolierten, perfundierten Schweineniere*. In Urologische Klinik der Fakultät für Klinische Medizin Mannheim, pp. 94. Mannheim: Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
- GEKID. (2006). *Krebs in Deutschland; Häufigkeiten und Trends*. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. in Zusammenarbeit mit dem Robert Koch Institut, Saarbrücken.
- Häcker, A., Chauhan, S., Peters, K. et al. (2005). Multiple high-intensity focused ultrasound probes for kidney-tissue ablation. *J. Endourol.* 19 (8), 1036-1040.
- Häcker, A., Risse, F., Peters, K. et al. (2006) Magnetic resonance imaging for assessment of radiofrequency lesions in kidney tissue immediately after ablation: an experimental study. *J. Endourol.* 20 (5), 312-317.
- Haghighi, K. S., Steinke, K., Hazratwala, K., et al. (2006). Controlled study of Inline radiofrequency coagulation-assisted partial nephrectomy in sheep. *J. Surg. Res.* 133, 215-218.
- Knoll, T., Michel, M. S., Cueva-Martinez, A. et al. (2002). Evaluation of superficial papillary ablation by endoscopic lasers in an ex vivo kidney model. *J. Endourol.* 16 (3), 195-200.
- Köhrmann, K. U., Back, W., Bensemman, J. et al. (1994). The isolated perfused kidney of the pig: new model to evaluate shock wave-induced lesions. *J. Endourol.* 8, 105-110.
- Michel, M. S., Köhrmann, K. U., Weber, A. et al. (1996). Rotoresect: new technique for resection of the prostate: experimental phase. *J. Endourol.* 10 (5), 473-478.
- Pereira-Sampaio, M. A., Favorito, L. A. and Sampaio, F. J. B. (2004). Pig kidney: Anatomical relationships between the intrarenal arteries and the kidney collecting system. Applied study for urological research and surgical training. *J. Urology* 172 (5,1), 2077-2081.
- Strohmaier, W. L. and Giese, A. (2005). Ex vivo training model for percutaneous renal surgery. *Urol. Res.* 33, 191-193.
- Wendt-Nordahl, G., Häcker, A., Reich, O. et al. (2004). The Vista system: a new bipolar resection device for endourological procedures: comparison with conventional resectoscope. *Eur. Urol.* 46 (5), 586-590.
- Wohlgemuth, W. A., Wamser, G., Reiss, T. et al. (2001). In vivo laser-induced interstitial thermotherapy of pig liver with a temperature-controlled diode laser and MRI correlation. *Lasers Surg. Med.* 29, 374-378.
- Yu, T., Fan, X., Xiong, S. et al. (2006). Microbubbles assists goat liver ablation by high intensity focused ultrasound. *Eur. Radiol.* 16 (7), 1557-1563.

Danksagung

Die Autoren danken der Stiftung Fonds für versuchstierfreie Forschung (FFVFF, Zürich) für ihre Unterstützung.

Korrespondenzadresse

TÄ Kristina Peters
Ludwig-Heck-Str. 1
86609 Donauwörth
Deutschland
E-Mail: tina_peters@web.de