

3. Material und Methode

3.1 Patienten

3.1.1 Patientenkollektiv

Alle zwischen April 2003 und November 2004 am Campus Charité Mitte nierentransplantierten Patienten wurden in die vorliegende Studie eingeschlossen, sofern die Einschlusskriterien erfüllt waren und keine Kontraindikationen vorlagen (siehe Tabelle 4).

Einschlusskriterien	Kontraindikationen/Ausschlusskriterien
Volljähriger Patient, kooperativ und bei klarem Bewusstsein	Medizinisch instabiler Patient, Patient auf Intensivstation
Vorliegende umfassende Aufklärungs- und Einverständniserklärung	Überempfindlichkeit gegen Schwefelhexafluorid oder einem anderen Bestandteil von SonoVue™
Verdacht auf Rejektion oder postoperative Komplikation, bzw. die regelhafte Perfusion des Transplantats soll evaluiert werden.	Rechts-Links-Shunt, schwere pulmonale Hypertonie, Herzinsuffizienz NYHA IV, schwere KHK, schwere Arrhythmie
	ARDS, COPD
	Schwangerschaft, stillende Mütter
	relevanter Perfusionsausfall im Power-Doppler
	Strafgefangene

Tab. 4: Einschluss- und Ausschlusskriterien für die Teilnahme an der vorliegenden Studie

Vor Beginn der Untersuchungen wurde ein standardisiertes Studienprotokoll zur Verwendung des USKM und zur konventionellen Sonographie erstellt. Ein positives Votum der zuständigen Ethikkommission lag vor.

Einige wichtige demographische, prä- und perioperative Daten der Patienten wurden registriert. Dabei handelt es sich um Spender- und Empfängeralter, die Art der Organspende (lebend oder postmortal), die Anzahl der HLA-Mismatches, das eventuelle Vorhandensein präformierter Panel-reaktiver Antikörper sowie die Kaltischämiezeit während der Operation.

Klinische und laborchemische Daten wurden über mindestens 14 Tage postoperativ erhoben; in diesem Zeitraum fanden auch nahezu täglich konventionelle

Ultraschalluntersuchungen statt. Die kontrastmittelgestützte Sonographie wurde zwischen dem 4. und 10. postoperativen Tag oder bei Verdacht auf Rejektion unmittelbar vor der Transplantatbiopsie durchgeführt.

3.1.2 Biopsie und Einteilung in Patientengruppen

Bei klinischem Verdacht auf akute Rejektion des Transplantats wurde zur weiteren Diagnostik eine Transplantatnierenbiopsie durchgeführt. Die Indikation zur Biopsie bestand bei fehlendem oder zu geringem postoperativem Kreatininabfall, sowie bei einer fortschreitenden Verschlechterung der Nierenfunktion. Sekundäre Gründe für einen ausbleibenden oder inadäquaten Kreatininabfall wurden soweit möglich klinisch und sonographisch ausgeschlossen. Die gewonnenen Gewebeproben wurden von in der Rejektionsdiagnostik erfahrenen Pathologen untersucht und entsprechend der Banff 97-Klassifikation beurteilt.

Die Patienten wurden anhand ihres klinischen Verlaufs, ihrer chirurgischen Komplikationen und, im Falle einer durchgeführten Nierenbiopsie, nach ihrem histologischen Befund in Gruppen eingeteilt.

Patienten ohne Zeichen einer akuten Rejektion und mit guter Transplantatfunktion wurden dem Normalkollektiv (N) zugeteilt. Bei einigen dieser Patienten lag postoperativ ein großes (>1/3 des Nierenvolumens) perirenales Hämatom vor; solche Patienten wurden der Gruppe (H) zugeordnet. Gab es bei guter Funktion kein signifikantes Hämatom, kamen die Patienten in die Kontrollgruppe (N1).

Patienten, die während der ersten postoperativen Woche Hämodialyse brauchten und bei denen eine Rejektion klinisch oder histologisch ausgeschlossen war, wurden der Gruppe Akute Tubulusnekrose (ATN) zugeordnet. In diese Gruppe kamen auch Studienteilnehmer, die keinen ausreichenden Kreatininabfall (> 3 mg/dl am 7. postoperativen Tag) verzeichneten und in der Biopsie die histologische Diagnose "ATN ohne Anhalt für eine Rejektion" gestellt bekamen.

Wurde histologisch eine akute Rejektion nachgewiesen, wurde der entsprechende Patient der Gruppe Rejektion (R) zugeordnet. Diese Gruppe wurde anhand der Banff-Klassifikation in zwei Untergruppen geteilt. In die Gruppe Banff 1 (B1) kamen diejenigen

Patienten, die eine Rejektion ohne Beteiligung der Gefäße erlitten hatten (Banff IA, IB); Patienten mit einer Rejektion mit Gefäßbeteiligung (Banff IIA, IIB, III) wurden der Gruppe Banff 2 (B2) zugeteilt.

Tabelle 5 fasst die einzelnen Gruppen und ihre Zuordnungskriterien zusammen.

Gruppen		Zuordnungskriterien
Normal (N)	Kontrollgruppe (N1)	- gute Transplantatfunktion - klinisch keine Anzeichen einer Rejektion
	Hämatom (H)	- klinisch keine Anzeichen einer Rejektion - postoperatives Hämatom (> 1/3 des Transplantatvolumens)
akute Tubulusnekrose (ATN)		- Rejektion klinisch oder histologisch ausgeschlossen - in der ersten Woche postoperativ Hämodialyse notwendig oder kein Kreatininabfall auf < 3 mg/dl)
Rejektion (R)	Banff 1 (B1)	- histologisch gesicherte Rejektion ohne Gefäßbeteiligung (Banff IA, IB)
	Banff 2 (B2)	- histologisch gesicherte Rejektion mit Gefäßbeteiligung (Banff IIA, IIB, III)

Tab. 5: Patientengruppen

3.2 Klinische Parameter

Bei allen teilnehmenden Patienten wurden im Rahmen der klinischen Routine postoperativ die tägliche Diuresemenge gemessen und zunächst auch tägliche Kreatinin-Kontrollen durchgeführt. Aufgrund der Diuresemessung konnte eine Aussage darüber gemacht werden, ob die Transplantatniere eine Primärfunktion aufwies. Eventuell postoperativ notwendige Hämodialyse wurde ebenso erfasst.

Alle Patienten erhielten nach Transplantation eine immunsuppressive Therapie. Diese war auf die Bedürfnisse des einzelnen Patienten zugeschnitten und demzufolge recht uneinheitlich. Insoweit Tacrolimus oder Cyclosporin A an der jeweiligen Immunsuppression beteiligt war, wurden die Plasmaspiegel dieser Medikamente postoperativ beinahe täglich kontrolliert und dokumentiert. Auch die Gabe von Interleukin 2-Antikörpern wurde verzeichnet.

3.3 Konventionelle Sonographie

3.3.1 Untersuchungsbedingungen

Sämtliche Patienten wurden in Rückenlage mit ausgestreckten Beinen untersucht. Die nahezu tägliche Untersuchung des Transplantats in den ersten 14 Tagen postoperativ mittels B-Bild, farbkodierter Doppler-Sonographie und Power-Doppler fand im Rahmen der klinischen Routine statt und wurde von insgesamt drei unterschiedlichen Untersuchern durchgeführt. Alle drei sind Fachärzte mit langjähriger Erfahrung in der Nierentransplantat-Diagnostik.

3.3.2 Ultraschall-System

Sämtliche Untersuchungen wurden an einem High-End-Ultraschall-System durchgeführt. Bei den konventionellen Sonographien kamen das "Aplio 80™" (Toshiba, Japan) und das High-End-Gerät "Sonoline Elegra™" (Siemens, Deutschland) zum Einsatz. Zuvor war in einem Vorversuch evaluiert worden, dass zwischen beiden Geräten in Bezug auf RI-Messung und Nierenvolumenbestimmung keine signifikanten Unterschiede bestehen.

Die Untersuchungen wurden mit einem Abdomen-Schallkopf mit einer Frequenz von 3,5 MHz durchgeführt; bei der FKDS wurde eine Pulsrepetitionsfrequenz (PRF) von 800 bis 2000 Hz eingestellt.

3.3.3 Parameter

3.3.3.1 Resistance-Index

Der Resistance-Index (RI) der Transplantatniere errechnet sich als Mittelwert von RI-Messungen an drei verschiedenen Aa. interlobares (oberes, mittleres und unteres Nierendrittel), jeweils am Übergang zwischen zentralem Echokomplex und Nierenkortex. Bei allen Patienten wurde der RI bis 14 Tage nach Transplantation im Rahmen der klinischen Routine nahezu täglich gemessen.

Zur Berechnung des RI galt folgende Formel:

$$RI = (V_{\max} - V_{\min}) / V_{\max}$$

V_{\max} und V_{\min} sind dabei die maximale bzw. die minimale Flussgeschwindigkeit am Messort. Der RI hat definitionsgemäß einen Wert zwischen null und eins.

3.3.3.2 Transplantatvolumen

Das Volumen der Transplantatniere wurde postoperativ ebenso routinemäßig täglich bestimmt und im Verlauf beurteilt. Dabei wird die Transplantatniere im B-Bild in definierten Schnittebenen dargestellt und vermessen (siehe Abb. 10).

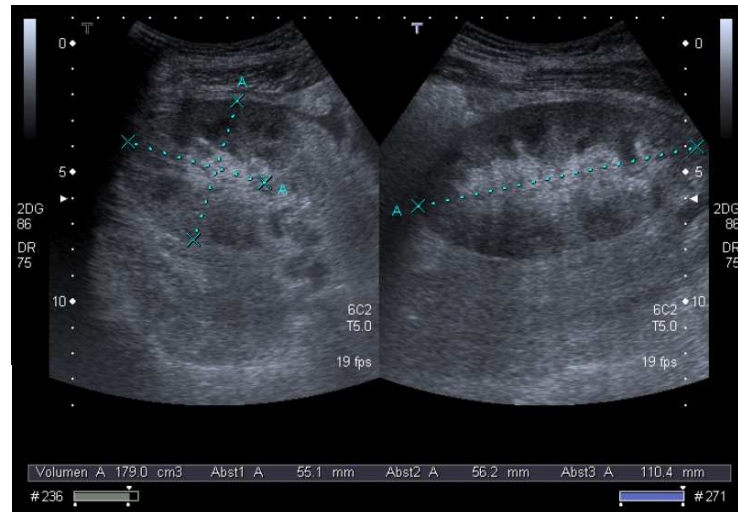


Abb. 10: Vermessung der Transplantatniere zur Volumenbestimmung, Quelle: Institut für Radiologie, Charite

Im Längsschnitt wird die maximale Länge der Niere bestimmt; Breite und Tiefe des Organs werden im Querschnitt in Hilushöhe gemessen. Das Organvolumen errechnet sich dann anhand folgender Formel:

$$\text{Volumen} = \text{Länge} \times \text{Breite} \times \text{Tiefe} \times 0,6$$

In die verwendeten Ultraschall-Systeme ist eine Software integriert, mit deren Hilfe die Messung der Organausdehnung standardisiert möglich ist und die Berechnung automatisiert wird. Das Volumen der Transplantatniere ist individuell sehr unterschiedlich. Entscheidend sind daher nicht die absolut gemessenen Werte, sondern eine eventuelle Zunahme des Organvolumens im Verlauf.

3.3.3.3 Power-Doppler

Eine Untersuchung mittels Power-Doppler-Sonographie zum Ausschluss eines Perfusionsdefektes der Transplantatniere wurde vor jeder Kontrastmittel-Untersuchung durchgeführt. Durch die dreidimensionale Darstellung im 3D-Power-Doppler konnten die Perfusionsverhältnisse der Niere erfasst und größere Perfusionsdefekte ausgeschlossen werden.

3.4 Kontrastmittelgestützte Sonographie

3.4.1 Untersuchungsablauf und Gerätetechnik

Die Kontrastmittel-Sonographie der Transplantatniere wurde ausschließlich am "Aplio 80™" (Toshiba, Japan) mittels Contrast Harmonic Imaging (CHI) mit einem Mechanischen Index (MI) von weniger als 0,1 durchgeführt (siehe auch Tab. 6).

Technik	Parameter
High-End-Ultraschall-System	Aplio 80™, Toshiba
Schallkopf	3,5 MHz-Breitbandschallkopf
technische Einstellungen	Contrast Harmonic Imaging (CHI), Low-MI-Pulsinversionstechnik
Mechanischer Index (MI)	< 0,1
USKM	SonoVue™, Bracco Altana
Dosierung	1,6 ml i.v. + 5 ml NaCl 0,9% im Bolus

Tab. 6: Übersicht über die verwendeten Materialien und Einstellungen

Die Untersuchungen liefen nach einem standardisierten Protokoll ab und fanden 4 bis 10 Tage nach Transplantation oder bei Verdacht auf akute Rejektion oder verzögerte Transplantatfunktion statt. Im Falle einer Nierenbiopsie wurde unmittelbar vorher mit USKM untersucht. Alle kontrastmittelgestützten Untersuchungen wurden vom selben Untersucher durchgeführt. Vor KM-Gabe wurde die Niere im B-Bild aufgesucht und im Längsschnitt eingestellt. Es wurde darauf geachtet, dass die großen Nierengefäße am Hilus, einige Aa. interlobares sowie das subkapsuläre Nierenparenchym gut abgrenzbar waren und durch einen hohen Zoomfaktor ausreichend groß dargestellt wurden. Daraufhin wurde das Ultraschallsystem auf CHI umgestellt und die digitale Bildspeichersoftware des Geräts vorbereitet. Die Applikation des USKM erfolgte dann über einen Zeitraum von 4 bis 5 Sekunden von stets derselben Person. Simultan mit der bolusförmigen KM-Gabe wurde die Bildspeicherung mit einer Rate von 10 Bildern pro Sekunde eingesetzt. An- und Abfluten des Kontrastmittels wurde am Monitor verfolgt und über insgesamt eine Minute digital aufgezeichnet. Der Schallkopf wurde während der Aufzeichnung in einer möglichst stabilen, gleich bleibenden Lage gehalten.

3.4.2 Ultraschall-Kontrastmittel

Das Ultraschall-Kontrastmittel SonoVue™ der Firma Bracco Altana Pharma GmbH (Konstanz, Deutschland) wurde bei sämtlichen Kontrastmittel-Untersuchungen angewendet. Immer wurden 1,6 ml des Kontrastmittels zusammen mit 5 ml isotoner

Kochsalzlösung innerhalb von 4 bis 5 Sekunden über einen peripheren oder zentralvenösen Zugang appliziert.

3.4.3 Definition von "Regions of Interest"

Nach Aufzeichnung der KM-Sonographie konnten so genannte "Regions of Interest" (ROI) in den gespeicherten Bildern definiert werden, innerhalb derer die Kontrastmitteldynamik evaluiert werden sollte. (siehe Abb. 11).

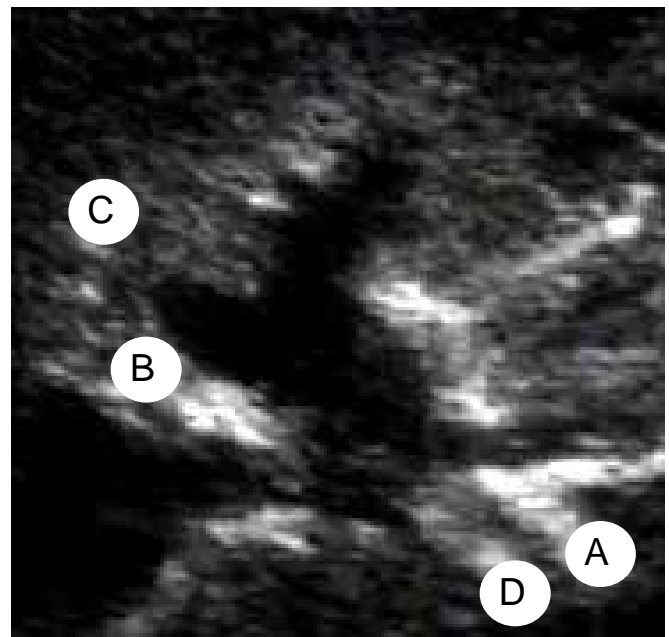


Abb. 11: Regions of Interest an der Transplantatnieren: A = Nierenarterie, B = A. interlobaris, C = Nierenkortex, D = Nierenvene, Quelle: Institut für Radiologie, Charite

Bei den ROI handelt es sich um kreisförmige Bildausschnitte, die je nach individueller Nierenanatomie in das Bild eingefügt wurden. Innerhalb dieser Bildausschnitte konnte dann An- und Abfluten des USKM quantitativ bestimmt werden. Insgesamt wurden vier ROI definiert: die Haupt-Nierenarterie, eine A. interlobaris, das subkapsuläre Nierenparenchym (Nierenkortex) und die Nierenvene. Um möglichst fehlerfreie Ergebnisse zu bekommen, wurde die ROI je nach individuellen Gefäßdurchmessern bemessen. Dabei wurde darauf geachtet, dass der Durchmesser der ROI geringer als der jeweilige Gefäßdurchmesser war, um eventuelle Bewegungsartefakte zu minimieren.

3.4.4 Zeit-Intensitäts-Kurven

Die KM-Intensität innerhalb der ROI wurde anhand der gemittelten Graustufenwerte vom Ultraschallsystem automatisiert berechnet und als Zeit-Intensitäts-Kurve (time-intensity-curve, TIC, siehe Abb. 12) dargestellt.

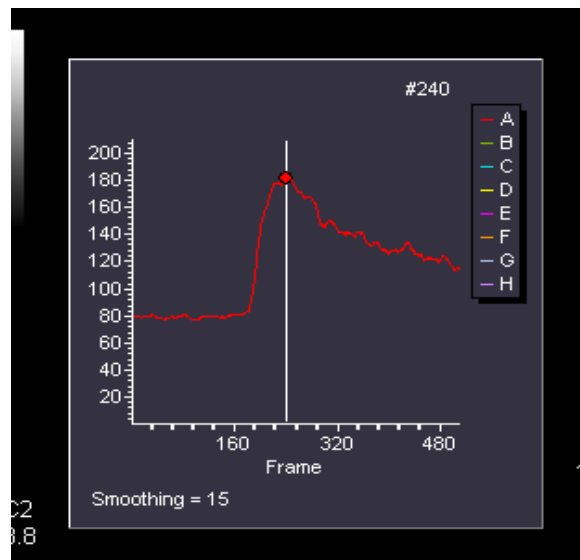


Abb. 12: Vom "Aplio 80" erstellte TIC an einer A. Interlobaris, Quelle: Institut für Radiologie, Charite

Das bedeutet, dass die KM-Intensität auf der Ordinate im Verlauf der Zeit, bzw. der gespeicherten Bilder (auf der Abszisse), aufgetragen wird. So ergibt sich eine Kurve, die die Boluskinetik des Kontrastmittels im jeweiligen Nierenabschnitt charakterisiert. Diese Kurve kann in eine Anflutungs-, eine Plateau- und eine Abflutungsphase unterteilt werden. In das System integriert ist außerdem eine Software, die die Vermessung und Auswertung der TIC für jede einzelne ROI sehr einfach möglich macht.

3.4.5 Parameter und Berechnungsgrundlagen

Anhand der TICs konnten verschiedene leicht zu bestimmende Parameter für diese Studie definiert werden, die die Boluskinetik in der Transplantatniere beschreiben. Dazu wurden auf der TIC zunächst zwei Punkte festgelegt, nämlich der erste deutliche Anstieg der KM-Intensität (I_{baseline} zum Zeitpunkt t_{baseline}) und der Punkt der maximalen KM-Intensität (I_{peak} zum Zeitpunkt t_{peak}). Aus diesen beiden Zeitpunkten errechnet sich dann der dritte Punkt auf der Kurve, der den Abstrom des USKM beschreibt. So wurde t_{decrease} als $t_{\text{peak}} + (t_{\text{peak}} - t_{\text{baseline}})$ mit der dazugehörigen KM-Intensität I_{decrease} definiert (siehe auch Abb. 13).

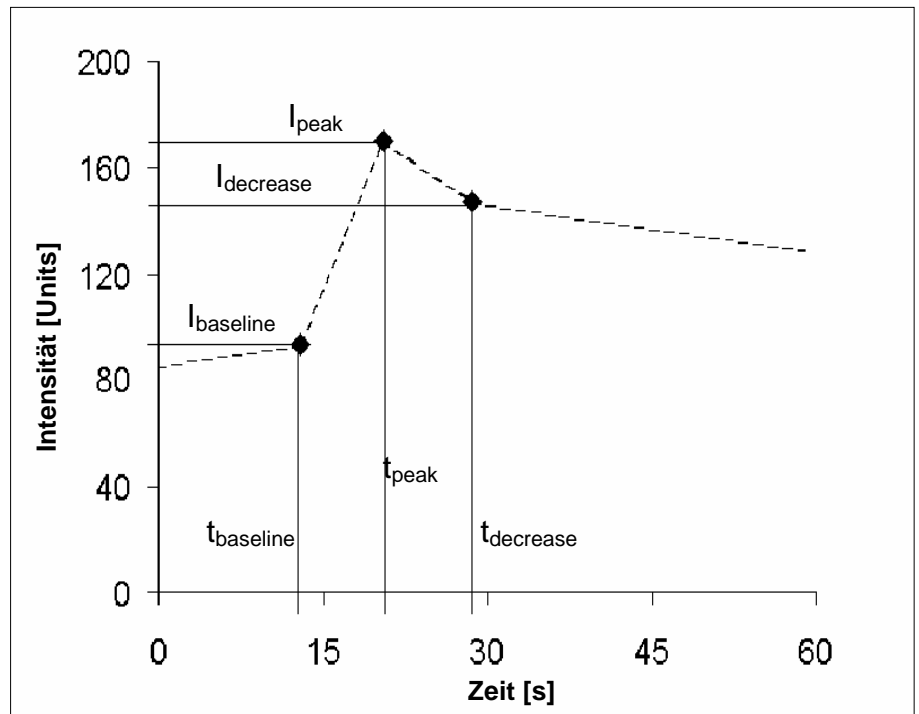


Abb. 13: Definition von Vermessungspunkten der TIC

Anhand dieser Vermessungspunkte lassen sich die TIC weiter charakterisieren. Es wurden folgende Parameter definiert, die die Steilheit der jeweiligen Kurvenabschnitte beschreiben:

$$\text{Anstieg} = (I_{\text{peak}} - I_{\text{baseline}}) / (t_{\text{peak}} - t_{\text{baseline}})$$

$$\text{Abstieg} = (I_{\text{decrease}} - I_{\text{peak}}) / (t_{\text{decrease}} - t_{\text{peak}})$$

Diese Größen wurden für die ROI in der Nierenarterie, in der A. interlobaris und im subkapsulären Nierenparenchym bestimmt. Um die Perfusionsverhältnisse des gesamten Organs besser zu beschreiben wurden weitere Parameter definiert, die die verschiedenen Gefäßterritorien der Transplantatniere miteinander vergleichen:

$$\text{AV-Zeit} = t_{\text{baseline}} (\text{Nierenvene}) - t_{\text{baseline}} (\text{Nierenarterie})$$

$$\Delta t_{\text{peak}} = t_{\text{peak}} (\text{Nierenkortex}) - t_{\text{peak}} (\text{A. interlobaris})$$

$$\text{PQ} = \text{Anstieg (A. interlobaris)} / \text{Anstieg (Nierenkortex)}$$

AV-Zeit steht für „arteriovenöse Zeitdifferenz“ und beschreibt die Verzögerung, die das USKM beim Durchfluten des Gefäßsystems der Niere erfährt. Δt_{peak} soll die zeitliche Differenz der maximalen Kontrastmittelkonzentration am Nierenkortex und einer A. interlobaris charakterisieren. Der Unterschied in der Steilheit der Anflutungskurve zwischen Nierenkortex und A. interlobaris wird mit dem Perfusionsquotienten (PQ) beschrieben.

3.5 Reproduzierbarkeit

Um die Messergebnisse auf ihre Reproduzierbarkeit zu untersuchen, wurden sechs weitere Transplantatempfänger mit unauffälligem klinischen Verlauf zusätzlich zur üblichen Routine zweimal konventionell und kontrastmittelgestützt sonographiert. Die Untersuchungen fanden zwischen dem 5. und 7. postoperativen Tag im Abstand von ca. 30 Minuten statt. Sie beinhalteten eine Bestimmung des Transplantatvolumens sowie eine Messung von RI und PQ und wurden von zwei unterschiedlichen, in konventionellem und kontrastmittelgestütztem Ultraschall erfahrenen Ärzten durchgeführt.

3.6 Statistik und Auswertung

Bevor mit der statistischen Analyse begonnen wurde, wurden die Daten mittels des Kolmogorov-Smirnov-Z-Tests auf Normalverteilung überprüft.

Für Vergleiche zwischen verschiedenen Patientengruppen wurde der Mann-Whitney-U-Test für unpaarige Stichproben benutzt. Wurden Daten innerhalb einer Gruppe verglichen (z.B. im zeitlichen Verlauf), kam der Wilcoxon-Test für paarige Stichproben zum Einsatz. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt.

Für die Berechnung der Spezifität und Sensitivität des Perfusionsquotienten (PQ) bezogen auf die Voraussage einer Rejektion mit Beteiligung der Gefäße im Vergleich zur Kontrollgruppe wurde eine ROC-Kurve (receiver operating characteristics) erstellt. Dasselbe Verfahren wurde angewandt, um auch die RI-Messung als Test zur Erfassung einer schweren Rejektion zu evaluieren.

Für die Analyse der Reproduzierbarkeit wurde der Spearman-Korrelationskoeffizient (ρ) angewandt.