

**Aus dem Institut für Tierpathologie des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin**

und

**aus der V. Medizinischen Klinik (Nephrologie/Endokrinologie/Rheumatologie) der
Medizinischen Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg**

**Experimentelle Untersuchungen des nephroprotektiven Potenzials
von N – Oktanoyl – Dopamin in vivo bei akutem ischämischen
Nierenversagen und nach Nierentransplantation**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Sarah Klotz

Tierärztin aus Potsdam

Berlin 2013
Journal-Nr.: 3695

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: PD Dr. Jakob Walter
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Benito Yard
Dritter Gutachter: Prof. Dr. Salah Amasheh

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

dopamine, kidneys, renal failure, transplantation, inflammation, magnet
resonance imaging

Tag der Promotion: 03.04.2014

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

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

ISBN: 978-3-86387-469-8

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2013

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2014

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Meinem Mann
Meiner Familie

In stiller Erinnerung an meinen Opa

*(*1934 - 2006)*

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	i-iii
Abbildungsverzeichnis.....	iv-v
Tabellenverzeichnis.....	vi
1. Einleitung.....	1-18
1.1 Nierentransplantation – ein Überblick.....	1-15
1.1.1. Allgemeines.....	1-2
1.1.2. Aktuelle Problematiken.....	3
1.1.2.1. Abstoßungsreaktionen.....	3-7
1.1.2.1.1. Hyperakute Abstoßungsreaktion.....	4
1.1.2.1.2. Akute Abstoßungsreaktion.....	4-6
1.1.2.1.2.1. Akute interstitielle Abstoßung.....	5
1.1.2.1.2.2. Akute vaskuläre Abstoßung.....	5-6
1.1.2.1.3. Chronische Abstoßungsreaktion.....	6-7
1.1.2.2. Ischämie - Reperfusionsschäden.....	7-9
1.1.2.3. Immunsuppression und Nephrotoxizität.....	10-11
1.1.3. Nierentransplantation und Katecholamine.....	12-15
1.1.3.1. Allgemeines.....	12
1.1.3.2. Dopamin.....	12-14
1.1.3.3. N – Oktanoyl – Dopamin.....	14-15
1.2 Magnetresonanztomographie und Niere.....	16-18
1.2.1. Das Prinzip der Magnetresonanztomographie.....	16-17
1.2.2. Perfusionsmessung im MRT.....	17-18
2. Fragestellung.....	19-20

3.	Material und Methoden.....	21-47
3.1	Allgemeines.....	21
3.2	Versuchstiere und ihre Haltung.....	21
3.3	Operationsmethoden.....	22-33
	3.3.1. Allgemeines.....	22
	3.3.2. Warmischämiemodell.....	22-24
	3.3.3. Nierentransplantation.....	25-32
	3.3.3.1. Explantation der Spenderniere.....	25-28
	3.3.3.2. Implantation der Spenderniere.....	28-32
	3.3.4. Einbau der osmotischen Minipumpe.....	32-33
3.4	Versuchsdesign.....	34
3.5.	Gruppenaufbau.....	35-36
	3.5.1. Warmischämiemodell.....	35
	3.5.2. Akutes Nierentransplantationsmodell.....	35-36
	3.5.3. Chronisches Nierentransplantationsmodell.....	36
3.6.	Arterial Spin Labeling.....	37-39
	3.6.1. Das Prinzip der ASL – Technik.....	37-38
	3.6.2. Die Auswertung der ASL – Messung.....	38-39
	3.6.3. Vorversuch im MRT zur Etablierung des ASL nach akutem Nierenversagen.....	39
3.7.	Histologische Untersuchungen.....	40-46
	3.7.1. Anfertigung eines Paraffinschnittes.....	40
	3.7.2. Lichtmikroskopische Untersuchung.....	41
	3.7.2.1. Hämatoxylin – Eosin – Färbung.....	41
	3.7.3. Immunhistochemie.....	42-45
	3.7.3.1. ED1.....	44
	3.7.3.2. MHC II.....	44-45

3.7.4. Banff - Klassifikation.....	45-46
3.8. Ausschlusskriterien.....	47
3.9. Statistische Auswertungen.....	47
4. Ergebnisse.....	48-84
4.1. Organfunktion und renale Inflammation nach Empfängerbehandlung im Warmischämiemodell.....	48-54
4.1.1. Körpergewicht.....	48
4.1.2. Nierenfunktion.....	49
4.1.2.1. Kreatinin.....	49-51
4.1.2.2. Harnstoff.....	51-53
4.1.3. Renale Inflammation.....	54
4.1.3.1. ED1 - Färbung.....	54
4.2. Organfunktion und renale Inflammation nach Empfängerbehandlung im akuten Transplantationsmodell.....	55-59
4.2.1. Körpergewicht.....	55
4.2.2. Nierenfunktion.....	55
4.2.2.1. Kreatinin.....	55-56
4.2.2.2. Harnstoff.....	56-57
4.2.3. Renale Inflammation.....	57-59
4.2.3.1. ED1 - Färbung.....	57-58
4.2.3.2. MHC II - Färbung.....	58-59
4.3. Empfängerbehandlung und akute Abstoßungsreaktion.....	60-61
4.3.1. Banff - Klassifikation.....	60-61

4.4. Organfunktion und renale Inflammation nach Empfängerbehandlung im chronischen Transplantationsmodell.....	62-72
4.4.1. Nierenfunktion.....	62
4.4.1.1. Kreatinin.....	62-63
4.4.1.2. Harnstoff.....	64-65
4.4.1.3. Nierenclearance.....	65-66
4.4.2. Renale Inflammation.....	66-71
4.4.2.1. ED1 - Färbung.....	66-70
4.4.2.2. MHC II - Färbung.....	71
4.4.3. Langzeitüberleben des Empfängers.....	72
4.5. Empfängerbehandlung und chronische Abstoßungsreaktion.....	73-81
4.5.1. Banff - Klassifikation.....	73-81
4.6. Nierenperfusionsmessungen im Magnetresonanztomographen.....	82-84
4.6.1. Etablierung des ASL im MRT im akuten Nierenversagen.....	82
4.6.2. Nierenperfusionsmessungen nach Induktion des akuten Nierenversagens.....	82
4.6.3. Nierenperfusionsmessungen nach akutem Transplantationsmodell.....	82-83
4.6.4. Nierenperfusionsmessungen nach chronischem Transplantationsmodell.....	84
4.6.5. Korrelation der renalen Perfusion mit weiteren Parametern.....	84
5. Diskussion.....	85-97
5.1. Zusammenfassung der wichtigsten Aspekte dieser Arbeit.....	85
5.2. Einfluss von NOD bei akutem Nierenversagen und Nierentransplantation.....	86-91

5.3. Einfluss von NOD auf die renale Perfusion gemessen mit Arterial Spin Labeling.....	92-96
5.4. Ausblick.....	97
6. Zusammenfassung.....	98-99
7. Summary.....	100-101
8. Literaturverzeichnis.....	102-112
9. Im Rahmen der Dissertation veröffentlichte Arbeiten.....	113-114
9.1. Kongressabstracts.....	113
9.2. Kongressvorträge.....	114
9.3. Publikationen.....	114
10. Danksagung.....	115-116
11. Selbständigkeitserklärung.....	117

Abkürzungsverzeichnis

A.	<i>lat.</i> Arteria, Arterie
Abb.	Abbildung
APC	antigen-presenting cell
ASL	Arterial Spin Labeling
ATP	Adenosine Triphosphate
BSA	bovine serum albumin
BMG	Bundesministerium für Gesundheit
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cASL	continuous ASL
CD	Cluster of Differentiation
CGRP	Calcitonin Gene - Related Peptide
cm	Zentimeter
CNI	Calcineurininhibitor
CsA	Cyclosporin A
DA	Dopamin
DCE-MRT	dynamisches kontrastmittelunterstütztes MRT/ dynamic contrast-enhanced MRT
DGF	delayed graft function
d.h.	das heißt
dl	Deziliter
DSO	Deutsche Stiftung Organtransplantation
FAIR	flow-sensitive alternating inversion recovery
g	Gramm
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
h	Stunde(n)
H&E	Hämatoxylin-Eosin
HF-Puls	Hochfrequenz-Puls
HLA	Human Leukocyte Antigen
HO-1	Hämoxygenase 1
HTK	Histidin-Tryptophan-Ketoglutarate

HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
I-CAM	Intercellular Adhesion Molecule
I.E.	internationale Einheit
IgG	Immunglobulin G
in vitro	<i>lat.</i> im Glas
in vivo	<i>lat.</i> im Lebendigem
I/R-Schäden	Ischämie-Reperfusionsschäden
i.v.	<i>lat.</i> intravenös, in die Vene
kg	Kilogramm
kgKG	Kilogramm Körpergewicht
KM	Kontrastmittel
MHC	Major Histocompatibility Complex
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mm	Millimeter
µm	Mikrometer
µm ²	Quadratmikrometer
MRT	Magnetresonanztomograph
ms	Millisekunde
N.	<i>lat.</i> Nervus, Nerv
NaCl	Natriumchlorid
NFκB	nuclear factor - κB
NOD	N – Oktanoyl – Dopamin
NSF	nephrogene systemische Fibrose
PAMP	Pathogen-associated Molecular Patterns
pASL	pulsed ASL
ROS	reactive oxygen species
s.c.	<i>lat.</i> subcutan, unter die Haut
SD	Standard Deviation, Standardabweichung
sec.	Sekunde

SNR	Signal - zu - Rausch - Verhältnis
T	Tesla
Tab.	Tabelle
TBS	TRIS - buffered Saline
TLR	Toll - like - Rezeptor
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TRPV-1	Transient Receptor Potential Vanilloid 1
u. a.	unter anderem
UW-Lösung	University of Wisconsin-Lösung
V./Vv.	<i>lat.</i> Vena/Venae, Vene/Venen
V-CAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

<i>Abb. 1</i>	Strukturformel von Dopamin.....	13
<i>Abb. 2</i>	Strukturformel von N – Oktanoyl – Dopamin.....	15
<i>Abb. 3</i>	Übersicht Abdomen der Ratte nach Laparotomie.....	23
<i>Abb. 4</i>	Übersicht des Operationsfeldes während Ischämie.....	24
<i>Abb. 5</i>	Übersicht des Operationsfeldes nach Laparotomie.....	25
<i>Abb. 6</i>	Ansicht nach Präparation der großen Bauchgefäße.....	26
<i>Abb. 7</i>	Ansicht des Operationsfeldes vor Entnahme der Niere.....	27
<i>Abb. 8</i>	Übersicht des Operationsfeldes nach Laparotomie.....	28
<i>Abb. 9</i>	Übersicht des Operationsfeldes nach Nephrektomie.....	29
<i>Abb. 10</i>	Übersicht des Operationsfeldes nach Setzen der Gefäßklemmen.....	30
<i>Abb. 11</i>	Übersicht des Operationsfeldes nach Adaption der Nierengefäße des Transplantates.....	31
<i>Abb. 12</i>	Exemplarische Darstellung einer ASL - Perfusionskarte.....	39
<i>Abb. 13</i>	Vergleich Körpergewicht an Tag 0 präoperativ und Tag 5 nach Induktion des akuten Nierenversagens.....	48
<i>Abb. 14</i>	Verlauf des Kreatininwertes im Gruppenvergleich bis 5 Tage postoperativ.....	50
<i>Abb. 15</i>	Verlauf des Harnstoffwertes im Gruppenvergleich bis 5 Tage postoperativ.....	52
<i>Abb. 16</i>	Durchschnittliche ED1 - Positivität je Gesichtsfeld im Gruppenvergleich nach akutem Nierenversagen.....	54
<i>Abb. 17</i>	Durchschnittliche ED1 - Positivität/ μm^2 im Gruppenvergleich nach akuter Transplantation.....	58
<i>Abb. 18</i>	Durchschnittliche Expression von MHC II - Positivität/ μm^2 im Gruppenvergleich nach akuter Transplantation	59
<i>Abb. 19</i>	Verlauf des Kreatininwertes im Gruppenvergleich bis 14 Wochen postoperativ.....	63
<i>Abb. 20</i>	Verlauf des Harnstoffwertes im Gruppenvergleich bis 14 Wochen postoperativ.....	64
<i>Abb. 21</i>	Durchschnittliche ED1 - Positivität/ μm^2 im Gruppenvergleich.....	67
<i>Abb. 22a</i>	Niere, Ratte Nr. 6 aus Dopamin - Behandlungsgruppe, männlich, exemplarische Darstellung der ED1 - Färbung.....	67
<i>Abb. 22b</i>	Niere, Ratte Nr. 8 aus NOD - Behandlungsgruppe, männlich, exemplarische Darstellung der ED1 - Färbung.....	68
<i>Abb. 22c</i>	Niere, Ratte Nr. 3 aus Kontrollgruppe, männlich, exemplarische Darstellung der ED1 - Färbung.....	69

<i>Abb. 23</i>	Durchschnittliche Expression von MHC II - Positivität/ μm^2 im Gruppenvergleich nach chronischer Transplantation.....	71
<i>Abb. 24</i>	Überlebensgrafik nach Kaplan - Meier als Übersicht im Gruppenvergleich.....	72
<i>Abb. 25a</i>	Niere, Ratte Nr. 4 aus Dopamin - Behandlungsgruppe, männlich, exemplarische Darstellung einer interstitiellen Fibrose Grad 2, H&E.....	75
<i>Abb. 25b</i>	Niere, Ratte Nr. 13 aus Kontrollgruppe, männlich, exemplarische Darstellung einer interstitiellen Fibrose Grad 3; H&E.....	76
<i>Abb. 26a</i>	Niere, Ratte Nr. 20 Dopamin - Behandlungsgruppe, männlich, exemplarische Darstellung einer Tubulusatrophie Grad 1; H&E.....	77
<i>Abb. 26b</i>	Niere, Ratte Nr. 10 Kontrollgruppe, männlich, exemplarische Darstellung einer Tubulusatrophie Grad 2; H&E.....	78
<i>Abb. 26c</i>	Niere, Ratte Nr. 8 Kontrollgruppe, männlich, exemplarische Darstellung einer Tubulusatrophie Grad 3; H&E.....	79
<i>Abb. 27a</i>	Niere, Ratte Nr. 8 aus NOD - Behandlungsgruppe, männlich, exemplarische Darstellung einer chronischen Vaskulitis mit Lumeneinengung Grad 1, H&E.....	80
<i>Abb. 27b</i>	Niere, Ratte Nr. 14 aus Kontrollgruppe, männlich, exemplarische Darstellung einer chronischen Vaskulitis mit Lumeneinengung Grad 2, H&E.....	81
<i>Abb. 28</i>	Exemplarische Darstellung von renaler Perfusion nach ASL - Messung im akuten Transplantationsmodell – vergleichende Darstellung zweier Organempfänger.....	83

Tabellenverzeichnis

<i>Tab. 1</i>	Kategorien der Banff - Klassifikation mit Schweregrade nach Sis et al. 2010.....	46
<i>Tab. 2</i>	Übersicht der mittleren Kreatininwerte in mg/dl an Tag 0 präoperativ bis 5 Tage nach akutem Nierenversagen.....	50
<i>Tab. 3</i>	Statistische Signifikanzen der Kreatininwerte im Gruppenvergleich über 5 Tage mittels Kruskal – Wallis – Test.....	51
<i>Tab. 4</i>	Statistische Signifikanzen der Kreatininwerte im direkten gruppenweisen Vergleich über 5 Tage mittels Kruskal – Wallis – Test.....	51
<i>Tab. 5</i>	Übersicht der mittleren Harnstoffwerte in mg/dl an Tag 0 präoperativ bis 5 Tage nach akutem Nierenversagen.....	52
<i>Tab. 6</i>	Statistische Signifikanzen der Harnstoffwerte im Gruppenvergleich über 5 Tage mittels Kruskal – Wallis – Test.....	53
<i>Tab. 7</i>	Statistische Signifikanzen der Harnstoffwerte im direkten gruppenweisen Vergleich über 5 Tage mittels Kruskal – Wallis – Test.....	53
<i>Tab. 8</i>	Übersicht der Kreatininwerte nach Nierentransplantation bis 7 Tage postoperativ.....	56
<i>Tab. 9</i>	Statistische Signifikanzen der Kreatininwerte im Gruppenvergleich bis 7 Tage nach Nierentransplantation.....	56
<i>Tab. 10</i>	Übersicht der Harnstoffwerte nach Nierentransplantation bis 7 Tage postoperativ.....	56
<i>Tab. 11</i>	Statistische Signifikanzen der Harnstoffwerte im Gruppenvergleich bis 7 Tage nach Nierentransplantation.....	57
<i>Tab. 12</i>	Banff - Klassifikation zur Beurteilung der akuten Abstoßung nach Nierentransplantation.....	60
<i>Tab. 13</i>	Übersicht der Kreatininwerte in mg/dl über 14 Wochen nach Nierentransplantation.....	63
<i>Tab. 14</i>	Übersicht der Harnstoffwerte in mg/dl über 14 Wochen nach Nierentransplantation.....	65
<i>Tab. 15</i>	Übersicht über die durchschnittliche Nierenclearance der Behandlungsgruppen.....	66
<i>Tab. 16</i>	Banff - Klassifikation zur Beurteilung der chronischen Abstoßung nach Nierentransplantation.....	74

1. Einleitung

1.1. Nierentransplantation – ein Überblick

1.1.1. Allgemeines

Durch das Gelingen der ersten Nierentransplantation zwischen eineiigen Zwillingen im Jahre 1954 gilt der Ende des Jahres 2012 verstorbene Chirurg und Nobelpreisträger Joseph Edward Murray (1919 – 2012) als Pionier der Nierentransplantation (Barry and Murray 2006). Nach jenem Meilenstein in der Transplantationsgeschichte ist jedoch heute die Diskrepanz zwischen der Bereitschaft zur Organspende und der immer weiter steigenden Anzahl der Patienten auf den Wartelisten deutlich spürbar. So umfasst laut Eurotransplantation International Foundation die Warteliste für eine Niere in Deutschland zum gegenwärtigem Zeitpunkt etwa 7600 Patienten ((Eurotransplant 2013) letzter Stand: 31.12.2012), während laut der Deutschen Stiftung Organtransplantation (DSO) im Jahr 2012 nur etwa 1800 Nierentransplantationen in Deutschland durchgeführt wurden. Dies macht deutlich, dass nach wie vor der Bedarf an Spenderorganen wesentlich höher ist als die Zahl der potenziellen Organspender (DSO 2013). Dadurch gewinnt die Lebendspende als Alternative zur Organspende nach Eintritt des Hirntodes immer mehr an Bedeutung, um diese Diskrepanz auszugleichen (Cacho, Pique et al. 2005; Tyden 2007).

Im Gegensatz zu Ländern in denen die Organspende durch die „Widerspruchsregelung“ definiert ist, wie in Spanien, die mit dieser Regelung die höchsten Transplantationszahlen in Europa vorweisen können (ONT 2013), galt in Deutschland bis Ende des Jahres 2012 die „erweiterte Zustimmungsregelung“. Diese besagt, dass eine Zustimmung zur Organspende zu Lebzeiten oder von den direkten Angehörigen nach Einsetzen des Hirntodes getätigt werden kann. Ab dem 01. November 2012 wurde diese Regelung in Deutschland nun durch die „Entscheidungslösung“ ersetzt. Jeder Bundesbürger wird nun seither über seine Bereitschaft einer Organspende befragt, um dem gegenwärtigen Mangel an Organspendern entgegenzuwirken (BMG 2012). Besonders kritisch ist zusätzlich der Rückgang der Bereitschaft zur Organspende nach den jüngsten Skandalen in der Transplantationsmedizin in Regensburg, Göttingen, München und Leipzig. So konnte die DSO für das erste Halbjahr des Jahres 2013 feststellen, dass im Vergleich zum Vorjahr ca. 18 % weniger Organspender (Angabe ohne Lebendspende) zur Verfügung standen (DSO 2013) und die aktuelle Diskrepanz weiter verstärkt und ein Handeln notwendig macht. Denn für einen Patienten mit

chronischem Nierenversagen stellt das Vorhandensein eines geeigneten Spenders für eine Nierentransplantation die einzige längerfristige und für ihn lebensrettende Maßnahme dar. Die Nieren übernehmen im Körper lebenswichtige Funktionen wie die Filtration und Ausscheidung von Schadstoffen über den Harn, die Regulierung des Flüssigkeits- und Elektrolythaushaltes, die Regulierung des Blutdruckes sowie die Produktion von Hormonen wie Erythropoetin. Durch zahlreiche Erkrankungen kann die Funktion der Nieren massiv beeinträchtigt werden. Die DSO macht in ihrem Jahresbericht für das Jahr 2012 deutlich, dass in Deutschland die Hauptursachen für ein Nierenversagen, die damit eine Indikation für eine Nierentransplantation darstellen, ein chronisches nephritisches Syndrom (ca. 21,9 %) und eine zystische Nierenerkrankung (20 %) sind. Auch ein Diabetes mellitus Typ 1 (13,8 %) und eine hypertensive Nierenerkrankung (11,0 %) spielen eine wesentliche Rolle (DSO 2013). Die fortschreitende Schädigung der Niere und die damit verbundene eingeschränkte Funktion münden schließlich im chronischen Nierenversagen, sodass eine Nierenersatztherapie notwendig und sogar lebensrettend wird. Zu den Nierenersatztherapien gehören die Dialyseverfahren und die Nierentransplantation. Da eine Dialyse die vollständige Nierenfunktion nicht dauerhaft und nur zu einem geringen Anteil (7 %) ersetzen kann (Felten, Kuhlmann et al. 1999), ist auf lange Sicht bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz eine Nierentransplantation Mittel der Wahl (Wolfe, Ashby et al. 1999; Haller 2007). Der Vergleich der Lebenserwartung von transplantierten Patienten und Patienten mit Dialysebehandlungen zeigt unmissverständlich, dass Patienten nach einer Nierentransplantation eine wesentlich höhere mittlere Lebenserwartung haben als Patienten, die dialysiert werden (Kunzendorf, Renders et al. 2007). Weiterhin ist die Lebensqualität des Patienten nach einer Nierentransplantation im Vergleich deutlich erhöht (Overbeck, Bartels et al. 2005).

Seit der Verwendung von Immunsuppressiva, der Auswahl des geeigneten Spenders mittels HLA - Antigenen sowie der Möglichkeit der Konservierung der Spenderorgane hat sich das Überleben von Spenderorganen spürbar erhöht (Schnuelle, Lorenz et al. 1998). Dennoch gibt es zahlreiche Faktoren, die das langfristige Überleben des Spenderorganes gefährden und zu einem Verlust des Transplantates führen können. Besonders die immunologischen Reaktionen wie die akute oder die chronische Transplantatabstoßung und die nichtimmunologischen Faktoren wie Gewebeschädigungen nach Ischämie – Reperfusion – Mechanismen, Nephrotoxizität nach Einsatz von Calcineurininhibitoren, eine rezidivierende glomeruläre Erkrankung sowie virale Infektionen spielen eine entscheidende Rolle (Vathsala 2005; Nankivell and Kuypers 2011).

1.1.2. Aktuelle Problematiken

Die Auswahl eines geeigneten Organempfängers für vorhandene Spenderorgane erfolgt nach genau festgelegten Akzeptanzkriterien, die in Richtlinien von der Bundesärztekammer festgelegt sind. Dazu gehören die Blutgruppenkompatibilität, die Übereinstimmung der HLA - Antigene, die Wartezeit des Empfängers, die potenzielle Ischämiezeit sowie die Dringlichkeit, mit der ein Empfänger ein Spenderorgan benötigt (Bundesärztekammer) (letzter Stand: 05.03.2012). Für die Organfunktion nach der Transplantation spielen unter anderem die Übereinstimmung der Blutgruppenkompatibilität und der HLA - Antigene sowie die Dauer der Ischämiezeit eine wesentliche Rolle. Auch durch eine Verbesserung der Immunsuppressiva in den letzten Jahrzehnten und deren Anwendung nach der Transplantation hat sich das Transplantatüberleben deutlich verbessert (Haller, Richter et al. 2009). Dennoch gibt es nach wie vor bestehende aktuelle Probleme, die das Langzeitüberleben von Spenderorganen beeinflussen und eine erneute Dialyse trotz erfolgter Transplantation notwendig machen können.

1.1.2.1. Abstoßungsreaktionen

Die Immunreaktionen des Empfängers nach einer Transplantation stellen einen vorherrschenden Faktor für den erfolgreichen Ausgang einer Transplantation dar. Eine Abstoßung erfolgt als Reaktion auf Alloantigene im Transplantat (Nankivell and Alexander 2010). Diese Reaktion ist stets gekennzeichnet mit dem Vorhandensein einer Entzündungsreaktion und einer Verschlechterung der Transplantatfunktion. Neben den nichtimmunologischen Faktoren können die immunologischen Reaktionen einer Abstoßungsreaktion zum vollständigen Verlust eines Transplantates führen (Nankivell and Kuypers 2011). Man unterscheidet vier verschiedene Arten von Abstoßungsreaktionen, die sich zum einen in ihrem zeitlichen Auftreten nach der Transplantation sowie von ihrem Erscheinungsbild unterscheiden.

1. Einleitung

1.1.2.1.1. Hyperakute Abstoßungsreaktion:

Diese Art der Abstoßung erfolgt wenige Minuten bis Stunden nach der Operation und ist gekennzeichnet durch die Reaktion von Antikörpern gegen vorhandene Blutgruppenantigene und MHC - Moleküle, die auf den Endothelzellen des Transplantates exprimiert werden (Arakelov and Lakkis 2000; Nankivell and Alexander 2010). Dem voraus ist eine Sensibilisierung des Empfängers durch Spenderantigene gegangen, wodurch es zu Schädigungen des Endothels und der Gefäßwände aufgrund der Aktivierung des Komplement- und Gerinnungssystems kommt - gefolgt von einer Vasokonstriktion und Entstehung von Ödemen und Thromben. Die Folgen sind schließlich arterielle Läsionen sowie Organschäden durch Ischämie.

Die Sensibilisierung des Empfängers kann durch eine Schwangerschaft, eine Bluttransfusion oder eine vorhergehende Organtransplantation erfolgt sein. Eine Therapie dieser Abstoßungsreaktion ist nicht möglich (Arakelov and Lakkis 2000), sodass das Transplantat entfernt werden muss (Nankivell and Alexander 2010). Diese Form der Abstoßung tritt heutzutage allerdings durch routinemäßige Untersuchungen der Blutgruppenantigene („Cross - Match“) nur noch selten auf (Regele 2008).

Durch den immer noch vorhandenen Mangel an geeigneten Spenderorganen gibt es mittlerweile in der Nierentransplantation Lebendspenden, die auch mit einer Blutgruppeninkompatibilität durchgeführt werden können. Zusätzlich zur üblichen Empfängernachbehandlung mit Calcineurininhibitor, Antimetaboliten und Steroiden wird in diesem Fall einmalig Rituximab – ein Anti - CD20 - Antikörper – gegeben. Dadurch wird die weitere Produktion von Antikörpern durch die B-Lymphozyten verhindert. Weiterhin erfolgt präoperativ eine Desensibilisierung in Form einer Immunadsorptionstherapie, was eine hyperakute Abstoßungsreaktion verhindern kann (Hugo, Schott et al. 2008). Diese Protokoll konnte erstmalig von Tydén et al. etabliert werden (Tyden, Kumlien et al. 2003).

1.1.2.1.2 Akute Abstoßungsreaktion:

Eine akute Abstoßung erfolgt wenige Tage bis Wochen nach der Transplantation. Grundsätzlich kann diese jedoch zu jeder Zeit nach Transplantation auftreten (Colvin and Smith 2005). Besonders nach nicht optimaler Immunsuppression und bei ungenügender Compliance kann es auch nach Jahren zu einer akuten Abstoßungsreaktion kommen

(Kunzendorf, Renders et al. 2007). Das typische klinische Bild einer akuten Abstoßungsreaktion ist die Verschlechterung der Transplantatfunktion mit einem plötzlichen Anstieg des Serumkreatinins ($> 20\%$ des Ausgangswertes), ein Blutdruckanstieg sowie eine reduzierte Diurese (Cornell, Smith et al. 2008; Amann, Buttner et al. 2011). Die akute Abstoßung kann weiterhin unterschieden werden in die akute interstitielle und die akute vaskuläre Abstoßungsreaktion.

1.1.2.1.2.1. Akute interstitielle Abstoßung

Entscheidend für diese Form der Abstoßung ist die Akkumulation von mononukleären Zellen im Interstitium (Cornell, Smith et al. 2008). Es kommt zur Aktivierung der T-Lymphozyten des Empfängers - im Speziellen der zytotoxischen CD4⁺ - und CD8⁺ - T-Lymphozyten - durch antigenpräsentierende Zellen (APCs), die körperfremde MHC-Moleküle des Spenders erkennen (Arakelov and Lakkis 2000). Dadurch wird im Empfänger eine Immunantwort in Form einer Produktion von Zytokinen und Rekrutierung weiterer Immunzellen wie Makrophagen und neutrophilen Granulozyten induziert, die schließlich beginnen, die körperfremden Zellen zu eliminieren. Aus histologischer Sicht stellt weiterhin eine Tubulitis durch Infiltration der Tubulusepithelzellen mit T-Lymphozyten und Makrophagen das charakteristische Merkmal für eine akute zelluläre Abstoßungsreaktion dar (Cornell, Smith et al. 2008).

1.1.2.1.2.2. Akute vaskuläre Abstoßung

Die akute vaskuläre Abstoßungsreaktion ist pathohistologisch charakterisiert durch eine intimale und transmurale Arteriitis mit Infiltration der Gefäße mit mononukleären Zellen (Terasaki and Cai 2005; Nankivell and Alexander 2010; Shimizu, Tanabe et al. 2012). Mit Hilfe von ICAM-1 oder VCAM auf aktivierten Endothelzellen können CD4⁺ - und CD8⁺ - T-Zellen in die subendotheliale Schicht und in die Intima von Arterien eindringen (Nankivell and Alexander 2010). Cornell, Smith et al. machen zusätzlich deutlich, dass die akuten Abstoßungsreaktionen zu 25 % vollständig oder wenigstens teilweise auf antikörpervermittelten Reaktionen beruhen (Cornell, Smith et al. 2008). Die Bindung von

Antikörpern an das Endothelium kann zur Aktivierung des Komplementsystems führen und unterstützt eine Makrophagen - initiierte Zytotoxizität, was zur Apoptose der Endothelzellen, zum Verlust der Gefäßintegrität und zur Entstehung von Thromben führt. Ischämie und Transplantatverlust können die Folge sein (Valujskikh and Heeger 2003).

Grundsätzlich sind die pathologischen Veränderungen bei einer akuten Abstoßung, wie eine Invasion der kapillären Gefäße mit neutrophilen Granulozyten und Makrophagen (Tubulitis) sowie eine Thrombenbildung durch Thrombozyten und Fibrin, denen bei der hyperakuten Abstoßungsreaktion auftretenden Veränderungen sehr ähnlich und spielen eine wesentliche Rolle für das Transplantatüberleben. Unterschieden werden können die akute und hyperakute Abstoßung letztlich durch das Vorhandensein der Komplementspaltkomponente 4 (C4d), welche erstmals von Feucht et al. beschrieben wurde (Feucht, Felber et al. 1991). Beim Vorliegen einer akuten antikörpervermittelten Abstoßungsreaktion lässt sich C4d nachweisen (Colvin 2007) und stellt seit 2003 eine bedeutende Ergänzung zur Banff - Klassifikation in der Abstoßungsdiagnostik dar (Amann, Buttner et al. 2011).

Das Risiko einer akuten Abstoßungsreaktion im ersten Jahr nach Transplantation liegt bei entsprechender Therapie bei weniger als 15 % (Nankivell and Alexander 2010).

1.1.2.1.3. Chronische Abstoßungsreaktion:

Die Entstehung einer chronischen Abstoßungsreaktion erfolgt über Monate und Jahre und ist für das Langzeitüberleben von Transplantaten das größte Hindernis (Waaga, Gasser et al. 2000). Der Prozess, der mit einer fortschreitenden Verschlechterung der Nierentransplantatfunktion einhergeht, kann unterschieden werden in interstitieller und antikörpervermittelter Abstoßung (Nankivell and Alexander 2010). Während der chronischen interstitiellen Abstoßung kommt es zur Ansammlung von T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und Makrophagen im Interstitium und im Bereich der Tubuli. Im Gegensatz dazu entsteht eine chronische antikörpervermittelte Abstoßungsreaktion, wenn sich bereits vorhandene und neu nach der Transplantation entstandene Antikörper auf der Oberfläche von kapillären Endothelien anlagern und dadurch das Komplement- und Gerinnungssystem aktivieren (Nankivell and Kuypers 2011). Pascual et al. machen darüber hinaus deutlich, dass das Auftreten von akuten rezidivierenden Abstoßungsreaktionen auch ein wesentlicher Faktor für das Entstehen einer chronischen Abstoßungsreaktion darstellt (Pascual, Theruvath et al. 2002).

Pathohistologisch ist dieser progressive Verlauf gekennzeichnet durch eine chronische interstitielle Fibrose, Tubulusatrophien, die Verdopplung der glomerulären Basalmembran, die Proliferation der arteriellen Intima mit Infiltration von mononukleären Zellen sowie durch Glomeruloskerosen (Nankivell and Alexander 2010; Nankivell and Kuypers 2011). Auch nichtimmunologische Faktoren sind von wesentlicher Bedeutung für die Entstehung einer chronischen Abstoßungsreaktion (Waaga, Gasser et al. 2000; Amann, Buttner et al. 2011). So beeinflusst eine Organspende von einem hirntoten Spender sowohl das Kurz- als auch das Langzeitüberleben des Transplantates. Weitere nichtimmunologische Faktoren sind die Ischämie - Reperfusionsschädigungen infolge Kaltischämie (Waaga, Gasser et al. 2000; Haller, Richter et al. 2009), eine Calcineurintoxizität (Renders and Kunzendorf 2007), das Alter des Spenders (Pascual, Theruvath et al. 2002) sowie Erkrankungen, die mit dem Spender oder dem Empfänger assoziiert sind (Pratschke, Weiss et al. 2008).

1.1.2.2. Ischämie - Reperfusionsschäden

Eine wesentliche Ursache für ein vermindertes Langzeitüberleben des Transplantates und für eine verzögerte Funktionstätigkeit eines Spenderorganes nach Transplantation stellen die Schädigungen dar, die nach erfolgter Ischämie während der Transplantation und nach Reperfusion im Transplantat entstehen können (de Groot and Rauen 2007). Auch bei der Entstehung eines akuten Nierenversagens (ANV) werden die Ischämie - Reperfusionsschäden (I/R - Schäden) als Hauptursache gesehen (Kinsey, Li et al. 2008; Eltzschig and Eckle 2011). Pathophysiologisch wird dieser Mechanismus als ein Zusammenspiel von intrazellulären Schädigungen durch Sauerstoffmangel und vorhandenen inflammatorischen Geschehnissen dargestellt. Die intrazelluläre Schädigung spiegelt sich in der ischämischen Phase dabei im Besonderen bei den Zellen wieder, die streng auf Sauerstoff angewiesen sind und ihren Metabolismus durch anaerobe Glykolyse nicht aufrechterhalten können. In den Nieren sind dies die Tubuluszellen (de Groot and Rauen 2007).

Die endgültigen pathophysiologischen Mechanismen eines I/R - Schadens sind aufgrund ihrer Komplexität durch das Zusammenwirken des angeborenen und erworbenen Immunsystems noch nicht vollständig verstanden. Sie lassen sich jedoch in Auswirkungen auf vaskulärer und tubulärer Ebene einteilen, obwohl die zeitlichen Abläufe nicht getrennt voneinander zu betrachten sind. Die wesentlichen tubulären Effekte lassen sich zusammenfassen mit einer

Tubulusepithelschädigung durch verminderten Sauerstoff- und ATP-Gehalt bis zum Zelluntergang durch Nekrosen und Apoptosen (Salahudeen, Joshi et al. 2001; Bonventre and Weinberg 2003; Salahudeen 2004). Durch Desquamation von nekrotischen und noch vitalen Tubulusepithelzellen besteht die Gefahr einer Tubulusobstruktion (Bonventre and Weinberg 2003). Auch in Bezug auf die inflammatorischen Geschehnisse nach Ischämie - Reperfusion spielen die tubulären Epithelzellen eine wichtige Rolle. Arslan et al. machen deutlich, dass Toll - like - Rezeptoren (TLR) – im Speziellen TLR2 und TLR4 – maßgebend auf proximalen und distalen Tubuli, auf dem dünnen Ast der Henle-Schleife und im Sammelrohr exprimiert werden. TLRs sind eine Gruppe von transmembranständigen Rezeptoren, die zur Erkennung von PAMPs (pathogen associated molecular patterns) - spezielle Strukturen, die auf Krankheitserregern vorkommen - dienen, und damit eine wichtige Bedeutung bei der angeborenen Immunität spielen (Arslan, Keogh et al. 2010). Die Aktivierung des TLRs ist assoziiert mit der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen. Diese Signalproteine fördern daraufhin die weitere Aktivierung und Rekrutierung von Immunzellen und damit eine Verstärkung der Inflammation (Wu, Chen et al. 2007).

Auch auf vaskulärer Ebene sind die Schädigungen nach Ischämie - Reperfusion für die weitere Nierenfunktion von großer Bedeutung. Durch die mangelnde Sauerstoffzufuhr bei Ischämie kommt es zu Endothelschädigungen sowie zu Endothelschwellungen, die mit einer Erhöhung der Gefäßpermeabilität verbunden sind (Gueler, Gwinner et al. 2004). Durch eine erhöhte Expression von Adhäsionsmolekülen, wie ICAM-1, auf den Endothelien wird die Interaktion zwischen Endothel und Leukozyten verstärkt. Diese Interaktion und die Aktivierung des Gerinnungssystems begünstigen schließlich eine Obstruktion kleiner Gefäße in den Nieren. Durch die Schädigungen der Endothelzellen und eine erhöhte Exposition von vasoaktiven Stoffen wie Endothelin-1 und Thromboxan A2 kommt es zu einer vermehrten Vasokonstriktion. Unterstützend wirkt dabei zusätzlich eine verminderte Vasodilatation als Antwort auf eine geringere Produktion von vasodilatativen Substanzen wie Bradykinin oder Stickstoffmonoxid (Bonventre and Weinberg 2003; Bonventre and Yang 2011).

Die inflammatorische Antwort manifestiert sich im Stadium der Reperfusion. Nach der ersten unspezifischen angeborenen Immunantwort durch Immunzellen wie neutrophile Granulozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen folgt eine spezifische Antwort des erworbenen Immunsystems, die insbesondere von den T-Lymphozyten realisiert wird. Dieser Mechanismus ist im Detail noch nicht vollständig verstanden (Eltzschig and Eckle 2011). Zusätzlich wird das Vorhandensein von reaktiven Sauerstoffverbindungen (reactive oxygen

species, ROS) als additiver Faktor für die Entstehung eines I/R - Schadens angeführt (Kim, Jung et al. 2010). Zu der Gruppe der ROS gehören die freien Sauerstoffradikale ($O_2\bullet^-$), Hydrogenperoxide wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Hydroxyradikale ($\bullet OH$). Während der Ischämie wird ATP zu Hypoxanthine abgebaut. Nach Reperfusion und damit bei erneuerte Sauerstoffzufuhr wird Hypoxanthine durch die Xanthinoxidase zu Xanthine und dann weiter zu Harnsäure abgebaut. Bei dieser Reaktion entstehen die freien Sauerstoffradikale ($O_2\bullet^-$), die sehr instabil sind und über eine hohe Reaktivität verfügen (Paller, Hoidal et al. 1984; Paller 1992). Die freien Radikale können in Lipiden von Zellmembranen eine Peroxidation initiieren. Diese Peroxidation stört die Fluidität und die Permeabilität der Membranen sowie den Transport von Ionen und gelöster Substanzen (Salahudeen 1999; Zweier and Talukder 2006). Unter physiologischen Bedingungen wirken natürlich vorkommende antioxidative Enzyme – wie die Superoxiddismutase und die Glutathionperoxidase – den zellulären Effekten der Metaboliten entgegen (Perico, Cattaneo et al. 2004; Araujo and Welch 2006).

Die I/R - Schädigungen sind in der Transplantationsmedizin von großer Bedeutung. Die ischämischen Mechanismen lassen sich unterteilen in Warm- und Kaltischämie, wobei die erläuterte Pathophysiologie bei beiden vergleichbar ist. Die Schädigungen durch Kaltschämie sind darüber hinaus noch mit einer erhöhten Immunogenität des Transplantates verbunden, die akute und chronische Abstoßungsreaktionen zur Folge haben kann. Auch der Prozess der Hypothermie und der Wiedererwärmung während der Transplantation haben Einfluss auf die Schädigungen nach Kaltischämie. Eine Separation zwischen I/R - Schädigungen und Schädigungen nach Hypothermie und Wiedererwärmung ist allerdings schwer und bisher nur wenig untersucht (Salahudeen 2004). Die Kaltischämie wird in der Transplantationsmedizin durch die Kaltpräservierung der Spenderorgane nach Entnahme realisiert. Das Spülen der Spenderniere mit Präservationslösung und eine Kühlung bei 4 °C sind das Mittel der Wahl, um ischämische Schädigungen im Transplantat zu minimieren und die Lebensfähigkeit des Organes zu erhöhen. Verlängerte Kaltischämiezeiten nach einer postmortalen Spende werden dennoch stets mit einer verzögerten Transplantatfunktion und mit höherer Mortalität des Empfängers in Verbindung gebracht (Salahudeen 2004). Eine wirksame Möglichkeit, um verlängerte Zeiten der Kaltischämie zu vermeiden, ist die Lebendspende. Während einer Nierenlebendspende ist die Ischämiezeit durch die räumliche Nähe von Spender und Empfänger stark verkürzt, wodurch mögliche Schädigungen im Spenderorgan im Vergleich zu Spenderorganen einer postmortalen Spende deutlich minimiert sind (Salahudeen 2004; Nankivell and Kuypers 2011).

1.1.2.3. Immunsuppression und Nephrotoxizität

Seit der Entwicklung von Immunsuppressiva in den letzten 50 Jahren hat sich der Erfolg einer Transplantation mit einem deutlich längeren Transplantatüberleben unverkennbar verbessert. Der wesentliche Fortschritt einer Erhöhung des allgemeinen Transplantatüberlebens von 40 % auf 80 % im ersten Jahr nach Transplantation und einer Verringerung der frühen akuten Abstoßungsreaktion konnte aber erst mit der Entwicklung der Calcineurininhibitoren (CNI) Cyclosporin A (CsA) in den späten 1970er Jahren und Tacrolimus im Jahre 1984 realisiert werden, was einen bedeutsamen Umbruch in der Transplantationsmedizin bedeutete (Schnuelle, Lorenz et al. 1998; Renders and Kunzendorf 2007; Naesens, Kuypers et al. 2009; Nankivell and Kuypers 2011). Die immunsuppressiven Wirkungen der CNIs resultieren aus der Hemmung von Calcineurin - eine calciumabhängige, zytoplasmatische Phosphatase, die die Transkription von Interleukin-Genen aktivieren kann. Durch die Hemmung dieses Enzymes erfolgt die Hemmung der Interleukin 2 – Synthese, welches zur Aktivierung von T-Zellen und zur Proliferation bereits aktivierter T-Zellen zuständig ist. Durch Blockade dieses Mechanismus wird in den T-Zellen schließlich die Apoptose ausgelöst (Renders and Kunzendorf 2007; Naesens, Kuypers et al. 2009).

Ein einheitlicher Standard bezüglich der immunsuppressiven Therapie nach Transplantation besteht derzeit nicht. Die Immunsuppression in der Frühphase erfolgt in der Regel auf der Basis eines Calcineurininhibitors (Cyclosporin A oder Tacrolimus), eines DNA-Synthesehemmer (Mycophenolatmofetil) und Steroiden (Renders and Kunzendorf 2007). Die Therapie wird patientenbezogen variiert, um Nebenwirkungen wie Tumorinduktion und Infektionsneigung weitestgehend zu reduzieren. Auch auf nichtimmunologische Nebenwirkungen wie Hyperlipidämie, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus und Nephrotoxizität wird gezielt Augenmerk gelegt (Budde, Giessing et al. 2006). Besonders werden die CNIs bei einer hohen Dosierung stets mit einer erhöhten Nephrotoxizität in Verbindung gebracht. Aber auch bei einer Serumkonzentration in therapeutischen Dosen kann eine solche Nephrotoxizität bereits auftreten (Liptak and Ivanyi 2006). Eine Reduzierung oder gar ein Verzicht von CNI stehen darum im Fokus der Aufmerksamkeit und Diskussion (Jacquet, Francois et al. 2008). Betrachtet man den CsA - Metabolismus, wird deutlich, dass CsA über die Leber metabolisiert wird. Rezzani et al. machen deutlich, dass dieses mögliche Zusammenspiel zwischen CsA und anderen Substanzen, die in der Leber metabolisiert werden, den CsA - Metabolismus beeinflussen könnte. Diese Interaktion könne so das Risiko einer verminderten Immunsuppression, einer erhöhten Immunsuppression mit

Infektionsneigung sowie einer Nephro-, Hepato- und Kardiotoxizität steigern. Die Toxizität beruht auf der Bildung von ROS und einer vermehrten Lipidperoxidation (Rezzani 2006). Bezüglich der Nephrotoxizität wird dabei unterschieden zwischen einer akuten und einer chronischen Toxizität. Die akute Nephrotoxizität tritt in Form einer akuten Nierenfunktionsverschlechterung nach Gabe von hohen Dosen auf und ist nach Absetzen der Medikation meist reversibel. Es kommt dabei zu einer von CNI-verursachten Vasokonstriktion der afferenten und efferenten glomerulären Arteriolen durch einen Anstieg vasokonstriktorischer Substanzen wie Endothelin und Thromboxane. Dies hat ein Absinken der glomerulären Filtrationsrate zur Folge. Nach einer Biopsie sind histologisch Schwellungen und Vakuolisierungen der Endothelzellen sowie Apoptosen und Nekrosen sichtbar (akute Arteriolopathie). Weiterhin kann im Biopstat eine thrombotische Mikroangiopathie diagnostiziert werden, die durch vorhandene Thromben im Lumen der Arteriolen und glomerulären Kapillaren charakterisiert sind. Auf tubulärer Ebene sind die histologischen Veränderungen bei einer akuten CNI - Nephrotoxizität verbunden mit dem Vorhandensein von isometrischen Vakuolisierungen im Tubulusepithel und im tubulären Zytoplasma (toxische Tubulopathie), wobei die Entstehungsmechanismus derzeit noch nicht bekannt sind (Liptak and Ivanyi 2006; Renders and Kunzendorf 2007; Naesens, Kuypers et al. 2009).

Die chronische CNI - Nephrotoxizität tritt meist mehrere Monate nach Transplantation auf. Ab einer Therapiedauer von 6 - 12 Monaten wird die Entstehung der CNI - Nephrotoxizität angenommen (de Mattos, Olyaei et al. 2000), wobei die Entwicklung der Nephrotoxizität sowohl abhängig von der Dosis als auch von der Gesamtbehandlungsdauer der CNI ist. Das Auftreten einer hyalinen Arteriolopathie wird dabei als charakteristischer Marker angesehen. Betroffen sind dabei die afferenten Arteriolen. Die Veränderungen sind beschrieben als perlenschnurartige hyaline Ablagerungen als Ersatz für nekrotische Zellen der glatten Muskulatur. Diese Veränderungen werden als irreversibel angesehen. Weiterhin charakteristisch für eine chronische CNI - Nephrotoxizität sind eine interstitielle Fibrose mit einer typischen Streifung, Tubulusatrophien sowie eine Glomerulosklerose (Liptak and Ivanyi 2006; Naesens, Kuypers et al. 2009). Ein Ziel dieser Studie ist es u.a. zu untersuchen, ob nach der Gabe eines modifizierten Dopamins – N – Oktanoyl – Dopamin (NOD) – auf eine Immunsuppression mit CsA durch mögliche protektive Eigenschaften von NOD verzichtet werden könnte.

1.1.3. Nierentransplantation und Katecholamine

1.1.3.1. Allgemeines

Nach wie vor stellt eine Organspende von einem hirntoten Spender bei der Nierentransplantation den Hauptanteil der zur Verfügung stehenden Spenderorgane dar, obwohl die Niere zu den Organen gehört, bei denen eine Lebendspende erfolgen kann. Der Hirntod des Spenders spielt jedoch eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von frühen Transplantatschädigungen. Der Hirntod ist assoziiert mit hämodynamischer Instabilität, Hypotension, Hypothermie, Koagulopathie und Elektrolytverschiebungen (Hoeger, Gottmann et al. 2007), was eine verzögerte Transplantatfunktion nach Transplantation zur Folge haben und letztlich zu einer größeren Inzidenz einer späteren chronischen Dysfunktion führen kann (Schnuelle, Gottmann et al. 2009). In Hinblick auf die vorhandene hohe Diskrepanz zwischen potenziellen Spendern und Patienten, die auf den Wartelisten stehen, ist es darum von großer Bedeutung, die zur Verfügung stehenden Spenderorgane optimal zu schützen. Ein Ansatz dafür ist die Spendervorbehandlung mit Katecholaminen. Perioperative Organschädigungen sollen durch die Induktion zytoprotektiver Mechanismen oder durch Modulation der Immunogenität des Transplantates reduziert werden.

1.1.3.2. Dopamin

Dopamin (DA) ist ein endogenes Katecholamin und wichtiger Neurotransmitter (Abb. 1). Pharmakologisch gehört es zu den Sympathomimetika und entsteht im Rahmen der Synthese von Adrenalin. Es werden 5 spezifische Dopamin - Rezeptoren (D1 bis D5) beschrieben. In den Nieren spielen besonders die Rezeptoren D1 und D2 eine Rolle. Ebenso wie diese Rezeptoren stimuliert Dopamin dosisabhängig α - und β -adrenerge Rezeptoren. Eine niedrige Dosierung von Dopamin (1 - 2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) führt durch Stimulation dopaminerger Rezeptoren zu einer Vasodilatation der renalen und mesenterialen Gefäße. Bei einer mittleren Dosierung (2 - 10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) werden zusätzlich β -adrenerge Rezeptoren erregt, was eine positiv inotrope und chronotrope Wirkung am Herzen hat. Die hohe Dosierung von Dopamin ($> 10 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) führt schließlich durch Stimulierung von α -adrenergen Rezeptoren zu einer peripheren Vasokonstriktion (Holmes 2005; Mutschler, Geisslinger et al. 2013). Die Anwendung von Dopamin beruht zum einen auf die positiv inotropen Eigenschaften des Stoffes. Durch die Zunahme des Herzzeitvolumens kommt es zu einer Steigerung der

Nierendurchblutung. Zum anderen folgt auf die Stimulation von Dopaminrezeptoren – insbesondere durch den Rezeptor D1 vermittelt (Pierce, Morris et al. 2002) - in den Nieren eine Vasodilatation, welche ebenso die Nierendurchblutung positiv beeinflusst (Kindgen-Milles and Tarnow 1997; Burton and Tomson 1999). Ursprünglich wurde Dopamin in der Klinik jedoch zur Erhöhung oder Stabilisierung des mittleren arteriellen Druckes und des kardialen Outputs durch Erhöhung des Herzschlagvolumen und der Herzfrequenz verwendet (Dellinger, Carlet et al. 2004; Hollenberg, Ahrens et al. 2004). Der Einsatz von Dopamin ist jedoch durch das Auftreten von starken kardialen Nebeneffekten wie Tachykardie und Arrhythmien limitiert (De Backer, Biston et al. 2010; Vasu, Cavallazzi et al. 2012).

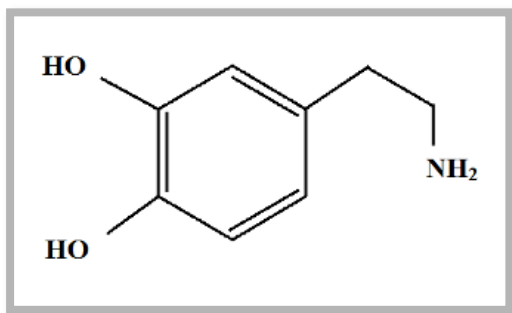


Abb. 1: Strukturformel von Dopamin

Der Einsatz von Dopamin als Spendervorbehandlung wird nach wie vor in der Literatur kontrovers diskutiert. Kadieva et al. (1993) machen deutlich, dass die Behandlung mit Dopamin zu keinem Unterschied in der Transplantatfunktion führte (Kadieva, Friedman et al. 1993; Marik 2002). Negative Effekte von Dopamin in hohen Dosen ($> 10 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) als Spenderbehandlung bei Transplantationen wurden ebenfalls beschrieben (Pienaar, Schwartz et al. 1990; Marshall, Ahsan et al. 1996). Im klaren Gegensatz dazu konnten Schnuelle et al. in verschiedenen retrospektiven klinischen Studien zeigen, dass die Behandlung des Spenders mit Dopamin die Wahrscheinlichkeit einer akuten Abstoßungsreaktion signifikant reduziert, die initiale Funktion des Transplantates verbessert und sich so deutlich positiv auf das Langzeitüberleben des Transplantates auswirkt (Schnuelle, Lorenz et al. 1999; Schnuelle, Berger et al. 2001; Schnuelle, Yard et al. 2004). Auch in einer prospektiven, klinischen Studie konnten Schnuelle et al. die positiven Wirkungen von Dopamin hervorheben. So wurde gezeigt, dass der Einsatz von Dopamin bei hirntoten Organspendern die Inzidenz für eine Dialyse nach Nierentransplantation reduziert (Schnuelle, Gottmann et al. 2009).

Unterstützend dazu konnte *in vivo* deutlich gemacht werden, dass Dopamin auch bei verlängerten Kaltpräservationszeiten das Kurz – und Langzeitüberleben des Transplantates positiv beeinflussen kann und es nach Ischämie-Reperfusion zu einer verminderten Schädigung in den Nieren kommt. Dopamin reduziert hierbei die Infiltration des Transplantates mit Inflammationszellen (Gottmann, Notheisen et al. 2005; Gottmann, Brinkkoetter et al. 2006; Liu, Hoeger et al. 2007; Hoeger, Reisenbuechler et al. 2008). Hoeger et al. konnten darüber hinaus in einem Hirntodmodell deutlich machen, dass die Spendervorbehandlung mit Dopamin bei den Organempfänger eine signifikant bessere Nierenfunktion zur Folge hat, da Tubulitiden und die interstitielle Inflammation laut der Banff - Klassifikation reduziert waren (Hoeger, Reisenbuechler et al. 2008).

In verschiedenen *in vitro* Versuchen wurde zeitgleich der mögliche Wirkmechanismus für den positiven Einfluss von Dopamin auf das Nierentransplantat erforscht. Dabei zeigte sich, dass die mit Dopamin behandelten HUVECs (human umbilical vein endothelial cells) geschützt waren vor Schädigungen, wie Verlust des Zytoskeletts und Zellschrumpfungen, die bei Kältepräservierung entstehen (Yard, Beck et al. 2004). Weiterhin konnte demonstriert werden, dass Dopamin zum einen die Hochregulierung von Hämoxxygenase-1 (HO-1) anregen (Berger, Hunger et al. 2000) und zum anderen die Produktion von Chemokinen in Endothel- und proximalen Tubulusepithelzellen modulieren kann (Kapper, Beck et al. 2002). Die Anregung der HO-1 führt dabei indirekt zu einem antioxidativen Schutz.

1.1.3.3. N – Oktanoyl – Dopamin

Da die Anwendung von Dopamin durch die hämodynamischen Nebeneffekte limitiert ist, wurde N – Oktanoyl – Dopamin (NOD) – ein modifiziertes Dopamin – von unserer Abteilung entwickelt. Hierfür wurde eine stark lipophile Oktanoyl - Kette in N - Position an Dopamin angefügt, wodurch es zu einer erhöhten Lipophilie des Stoffes kommt (Abb. 2). Die dadurch erzielte höhere Membrangängigkeit trägt dazu bei, dass NOD *in vitro* eine 40 - fach effektivere protektive Wirksamkeit als Dopamin aufweist (Losel, Schnetzke et al. 2010). Dies konnte auch in einem Vorbehandlungsmodell an Ischämie - Reperfusionsschäden gezeigt werden (Tsagogiorgas, Wedel et al. 2012). Durch die zusätzliche Oktanoyl - Kette zeigt NOD *in vivo* im Hirntodmodell weiterhin nur geringe dopaminerge und adrenerge Rezeptorstimulation, wodurch hämodynamische Nebeneffekte in klinischen Dosen nicht auftreten. Auch konnte festgestellt werden, dass die Expression von proinflammatorischen

Adhäsionsmolekülen wie I-CAM und V-CAM nach einer Spenderbehandlung mit NOD deutlich reduziert war gegenüber einer unbehandelten Kontrollgruppe.

Tsagogiorgas et al. konnten zusätzlich zeigen, dass NOD dosisabhängig – im Gegensatz zu Dopamin – *in vitro* als Transient Receptor Potential Vanilloid Typ 1 (TRPV1)-Agonist wirksam ist (Tsagogiorgas, Wedel et al. 2012). TRPV1 ist ein membranständiger Nozizeptor auf sensorischen Neuronen, Endothelzellen und vaskulären glatten Muskelzellen sowie im Nierenbecken und in den Tubuli (Feng, Lee et al. 2008; Ueda, Tsuji et al. 2008; Ueda, Tsuji et al. 2009). Bereits in Versuchen am Herzen konnte die Protektivität von TRPV1 - Agonisten nach Ischämie - Reperfusionsschäden gezeigt werden (Zhong and Wang 2008), was schließlich auch für andere Organe *in vivo* bestätigt werden konnte (Ueda, Tsuji et al. 2008; Wang, Ji et al. 2012). Die Aktivierung von TRPV1 wird mit der Freisetzung von calcitonin gene - related peptide (CGRP) und Substanz P, beides starke Vasodilatoren, und damit potentiell protektiv bei Ischämie - Reperfusionsschädigung – in Verbindung gebracht (Zhong and Wang 2008). Neuesten Erkenntnissen zufolge ist NOD zusätzlich in der Lage die Thrombozytenfunktion signifikant zu hemmen (Ait-Hsiko, Kraaij et al. 2013).

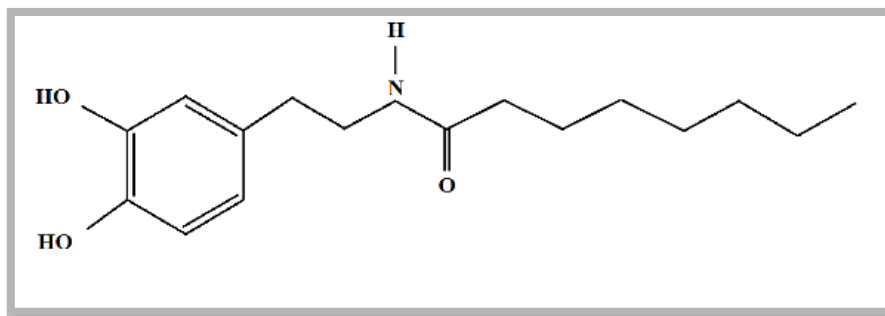


Abb. 2: Strukturformel von N – Oktanoyl – Dopamin

1.2. Magnetresonanztomographie und Niere

1.2.1. Das Prinzip der Magnetresonanztomographie

Die Magnetresonanztomographie gehört neben den auf Röntgenstrahlung und Ultraschall basierenden Methoden zu den wichtigsten diagnostischen Verfahren in der Radiologie. Die MRT - Messung basiert auf dem Kernspin (Abraham 1961) – dem Eigendrehimpuls – von Protonen (H^+) und der damit verbundenen Entstehung eines magnetischen Dipols, der physikalisch über das magnetische Moment beschrieben wird. Die Protonen sind einfach positiv geladen und im menschlichen und tierischen Organismus mit sehr großer Häufigkeit hauptsächlich in Wassermolekülen vorhanden, sodass sie im MRT eine wichtige Rolle spielen.

Der Magnetresonanztomograph (MRT) erzeugt primär ein räumlich und zeitlich statisches Magnetfeld, dessen magnetischer Fluss in der Einheit Tesla angegeben wird. Ein Tesla entspricht der ca. 30.000 - fachen Flussdichte des Magnetfeldes der Erde. Die Aufgabe des starken Magnetfeldes des Magnetresonanztomographen besteht darin, mit dem magnetischen Moment der Wasserstoffatome zu interagieren und die Orientierung der Magnetisierung parallel zum statischen Magnetfeld des Tomographen auszurichten (Längs- bzw. Longitudinalmagnetisierung). Die Bewegung, die die Summe aller Spins in einem starken Magnetfeld ausführt, kann als Präzessionsbewegung beschrieben werden. Sie wird durch eine charakteristische Frequenz, der Larmor-Frequenz, beschrieben, welche proportional zur Größe des statischen Magnetfeldes ist.

Im Gleichgewicht zeigt die Magnetisierung eines in den Tomographen gebrachten Objektes parallel zum Magnetfeld, da dies energetisch günstig ist. Jedoch kann in diesem magnetischen Zustand noch kein MR - Signal generiert werden. Ziel ist es darum, die Spins so zu beeinflussen, dass deren magnetische Momente anders ausgerichtet werden (Quer- bzw. Transversalmagnetisierung). Um diese Störung zu verursachen, wird ein elektromagnetischer Hochfrequenz-Puls (HF-Puls) verwendet, der bei Ganzkörpertomographen üblicherweise eine Dauer zwischen 0,5 ms – 5 ms hat und senkrecht zum statischen Magnetfeld auf die Spins einwirkt. So ist ein Kippen der Magnetisierung um z.B. 90° möglich (90° - Puls) (Levitt 2008). Die dann vorhandene Quermagnetisierung induziert nun durch ihre Präzession in der Empfängerspule eine Spannung, das MR - Signal. Nach der Anregung der Spins durch den HF-Puls setzt die Relaxation ein, da die Spins bestrebt sind, wieder in ihren ursprünglichen stabilen Ausgangszustand überzugehen. Man unterscheidet dabei die T1 (longitudinale) - und

die T2 (transversale) – Relaxation. T1 steht dabei für die Zeitkonstante, die angibt, wie schnell sich der Ausgangszustand der Längsmagnetisierung wieder einstellt. T2 bezieht sich auf die transversale Relaxation und gibt als Zeitkonstante an, wie schnell der Quermagnetisierung abnimmt. T1 - und T2 - Zeiten sowie die Protonendichte sind charakteristische Merkmale für ein Gewebe. Somit lassen sich bei einer MRT-Messung die verschiedenen Gewebe aufgrund unterschiedlicher Relaxationszeiten bzw. Protonendichten differenzieren (Schick 2007; Stöcker and Shah 2007; Kircher, Gauggel et al. 2008; Weishaupt, Köchli et al. 2009).

1.2.2. Perfusionsmessung im MRT

Da es immer noch eines der Hauptziele in der Transplantationsmedizin ist, das Kurz- und Langzeitüberleben von Transplantaten zu verbessern, ist die Entwicklung von sensitiven Methoden zur Erfassung der Organfunktion mit der Option einer optimalen Intervention ein Hauptaugenmerk. Die Bestimmung des renalen Blutflusses kann eine nützliche Methode sein, um frühzeitig eine renale Schädigung, z.B. nach erfolgter Transplantation oder im Rahmen eines akuten Nierenversagens, zu detektieren (Wang, Hendrich et al. 1998).

Die Blutzirkulation ist das wichtigste Transportsystem des Organismus. Zur Beschreibung der Nährstoffzufuhr über das arterielle Blut in das terminale Gefäßbett im Gewebe wird der Terminus *Perfusion* verwendet. Da die Blutzufuhr von der Größe des jeweiligen Organes abhängig ist, wird der Blutfluss als *spezifische Perfuionsrate* mit Bezug auf das Organgewichts angeben (in ml/100 g/min). Besonders die Nieren weisen bezüglich ihrer Blutzufuhr keine Uniformität in den verschiedenen Zonen auf. In der Nierenrinde ist die Perfusion am höchsten und nimmt 93 % der Gesamtblutzufuhr ein, welche durch die Nieren fließt. Die äußere Medulla ist dagegen sehr viel weniger gut durchblutet (6 % der Gesamtblutzufuhr). Für die innere Zone der Medulla schließlich steht nur 1 % der gesamten Blutzufuhr der Nieren zur Verfügung.

Zur Bestimmung der Nierenperfusion im MRT stehen zwei Techniken zur Verfügung, die sich in ihrer Invasivität unterscheiden. Als invasive Messtechnik gilt die Anwendung des kontrastmittelgestützten Verfahrens, dem dynamischen kontrastmittelunterstützten MRT (DCE-MRT), bei dem exogenes Kontrastmittel – meist auf der Basis von Gadolinium – während der Messung intravenös verabreicht wird (Martirosian, Boss et al. 2010; Notohamiprodjo, Reiser et al. 2010).

Die Gabe von Kontrastmittel bei Vorliegen einer Nierenschädigung wird aber nach wie vor kontrovers diskutiert, da dies mit der Entstehung einer nephrogenic systemic fibrosis (NSF) bei Patienten mit renaler Insuffizienz in Verbindung gebracht wird (Broome 2008; Sieber, Pietsch et al. 2008; Perazella 2009; Artz, Sadowski et al. 2011). Im Gegensatz dazu kann das arterial spin labeling (ASL) als nichtinvasive Messmethode angewendet werden, bei der die Protonen im Blut als endogenes Kontrastmittel fungieren, sodass kein exogenes Kontrastmittel mehr benötigt wird (Detre, Leigh et al. 1992). Das Prinzip der ASL - Messung beruht auf der magnetischen Markierung bzw. der Inversion der Magnetisierung des Blutes mit anschließender, aber zeitlich verzögerter Messung der markierten Spins, die dann in das betreffende Organ eingeflossen sind (Michaely, Schoenberg et al. 2006; Martirosian, Boss et al. 2010; Notohamiprodjo, Reiser et al. 2010). Bisher ist die ASL - Messung im Besonderen nur für das Gehirn etabliert, obwohl es auch hier nicht als alleinige Diagnostikmethode verwendet wird. Die Erkenntnisse der ASL - Messung in den Nieren beruhen dagegen bisher noch weitestgehend auf experimentellen Studien, sodass auch die durchgeführten Messungen in der hier vorliegenden Studie ein Schritt zur vollständigen Etablierung der Messmethode in der klinischen Diagnostik darstellt.

2. Fragestellung

Das chronische Organversagen – initiiert durch Ischämie - Reperfusionsschädigung und akuten Abstoßungsperioden – gehört zu den Faktoren, die sich negativ auf das Kurz- und Langzeitüberleben eines Transplantates auswirken können und die große Notwendigkeit demonstriert, das Transplantatüberleben frühzeitig positiv zu beeinflussen. Die protektive Wirkung von Dopamin in diesem Zusammenhang konnte in zahlreichen Studien im klinischen (Schnuelle, Lorenz et al. 1999; Schnuelle, Berger et al. 2001; Schnuelle, Yard et al. 2004; Schnuelle, Gottmann et al. 2009), tierexperimentellen Bereich (Gottmann, Notheisen et al. 2005; Gottmann, Brinkkoetter et al. 2006) sowie *in vitro* (Yard, Beck et al. 2004; Brinkkoetter, Beck et al. 2006; Brinkkoetter, Song et al. 2008) nachgewiesen werden. Da der Einsatz von Dopamin durch hämodynamische Nebeneffekte limitiert ist, wurde N – Oktanoyl – Dopamin (NOD) entwickelt. In ersten Untersuchungen konnte bereits festgestellt werden, dass NOD eine deutlich potentere Wirkung hat als Dopamin ohne dabei hämodynamische Effekte zu zeigen (Losel, Schnetzke et al. 2010). Auch in ersten *in vivo* Versuchen stellte sich NOD als wesentlich protektiver nach Ischämie - Reperfusionsschäden heraus als Dopamin. Auch konnte eine antiinflammatorische Wirkung nachgewiesen werden (Tsagogiorgas, Wedel et al. 2012).

Das Ziel der Studie bestand darin, zu untersuchen, ob der Einsatz von NOD als Therapeutikum nach Nierentransplantation sowie nach direktem Ischämie - Reperfusionsschaden das Kurz- sowie Langzeitüberleben des Transplantates im direkten Vergleich zum Dopamin positiv beeinflussen kann. Zusätzlich soll mittels ASL im MRT die renale Perfusion nach Einsatz von NOD untersucht werden. Es ergeben sich in diesem Zusammenhang folgende Fragestellungen:

- (1) Hat die Anwendung von NOD beim Organempfänger im allogenen Transplantationsmodell bzw. bei akutem Nierenversagen einen protektiven Effekt auf das Organ und ist dieser Effekt signifikant besser zum Effekt bei Einsatz von Dopamin?
- (2) Führt der Einsatz von NOD zu einem verbesserten Langzeitüberleben des Organempfängers?

2. Fragestellung

- (3) Beeinflusst der Einsatz von NOD durch beschriebene protektive und antiinflammatorische Eigenschaften die renale Perfusion positiv und kann man mittels ASL - Nierenperfusionsmessungen ähnlich gute Aussagen treffen wie mit den herkömmlichen Kontrastmitteluntersuchungen?

3. Material und Methoden

3.1. Allgemeines

Der Versuch wurde gemäß den Richtlinien des Tierschutzgesetzes unter Aufsicht des Tierschutzbeauftragten der Fakultät durchgeführt. Die Genehmigung des Regierungspräsidiums Karlsruhe wurde am 19.03.2012 unter dem Aktenzeichen AZ 35 - 9185.81/G - 19/12 erteilt.

3.2. Versuchstiere und ihre Haltung

Im Versuch dienten im Transplantationsmodell männliche Ratten vom Stamm Fisher (F344/DuCrI) als Organspender. Männliche Ratten vom Stamm Lewis (LEW/CrI) wurden sowohl als Organempfänger sowie im gut standardisierten Warmischämiemodell verwendet. Bezogen wurden die Tiere ausschließlich von der Firma Charles River (Sulzfeld, Deutschland). Bei dem durchgeführten Transplantationsmodell handelte es sich um ein gängiges Modell, das anfänglich von White et al im Jahre 1969 beschrieben wurde (White, Hildemann et al. 1969). Die beiden Ratten-Stämme unterscheiden sich nur im Minor-Histokompatibilitätskomplex, während die MHC Klasse I - und II - Kompatibilität identisch sind. Im allogenen Transplantationsmodell kommt es so nur zu einer milden Abstoßung und Transplantat – Dysfunktion (Bedi, Riella et al. 2010).

Entsprechend ihres Sozialverhaltens erfolgte die Haltung der Tiere bis zum Versuchsbeginn in Gruppen zu je 5 Tieren. Das Gewicht der Tiere bei Versuchsbeginn lag zwischen 250 g und 300 g. Zur Vermeidung von Wundheilungsstörungen wurden die Versuchstiere postoperativ einzeln gehalten. Die Umweltbedingungen wurden bei einer Temperatur von 21 °C, einer Luftfeuchtigkeit von 60 % und einem Tag – Nacht – Zyklus im Wechsel von je zwölf Stunden (08⁰⁰/ 20⁰⁰) konstant gehalten. Trinkwasser sowie Futtermittel erhielten die Tiere ad libitum. Das Futtermittel bestand aus einer Standard - Diät der Firma Sniff (Soest, Deutschland) mit 19 % Protein- und 0,25 % Kochsalzgehalt.

Vor Versuchsbeginn wurden die Versuchstiere unter den beschriebenen Bedingungen mindestens eine Woche gehalten, um eine Gewöhnungszeit zu garantieren.

3.3. Operationsmethoden

3.3.1. Allgemeines

Die Durchführung der Operationen erfolgte unter Anwendung von mikrochirurgischen Techniken. Zur Verfügung standen hierfür ein binokuläres Kaltlichtmikroskop (Leica MZ 6) mit 6 - bis 40 - fachen Objektiven, mikrochirurgisches Operationsbesteck (FST, Heidelberg, Deutschland), ein Narkose - Inhalationsgerät (multi-station lab animal anesthesia machine, SurgiVet, Smiths Medical PM, Inc., Norwell, MA 02061 USA), Wärmeplatten und ein Elektrokauter zur Verfügung. Zusätzlich kamen osmotische Minipumpen (osmotic pump Model 2ML1, alzet, DURECT Corporation, Cuperino, California, USA) zum Einsatz. Während der gesamten Operationszeit wurden die Tiere auf einer Wärmeplatte bei 38 °C gelagert. Die Zufuhr von Narkosemittel zur Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte mittels Inhalation nach Bedarf zwischen 2 – 3 %. Während der Operation wurde das Operationsfeld kontinuierlich befeuchtet.

Die mikrochirurgische Operationstechnik der Transplantationsmodelle ist eine Modifikation der Nierentransplantation, die erstmals von Lee (Lee 1967) bei der Ratte beschrieben wurde.

3.3.2. Warmischämiemodell

Beim Warmischämiemodell handelte es sich um ein gut standardisiertes Rattenmodell, das zur Induktion des akuten Nierenversagens herangezogen wurde. Im Warmischämiemodell wurden männliche Lewis-Ratte (LEW/Crl) mit einem Gewicht von 250 g – 300 g mit einer Mischung (1 ml/kg Körpergewicht) aus Ketamin (100 mg/ml; Ketamin ®, Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) und Xylazin (6 mg/ml; Rompun ®, Bayer Health Care, Leverkusen, Deutschland) durch intraperitoneale Gabe narkotisiert. Zur Narkoseaufrechterhaltung wurde eine Inhalationsnarkose (Isofluran, Forene ®, Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland) verwendet. Nach Einsetzen der Narkose – bestimmbar durch Verlust des Umdrehreflexes, des Lidreflexes sowie fehlende Schmerzreaktion nach Manipulation im Zwischenzehenbereich – erfolgte die Rasur des Abdomens von der Symphyse bis zum caudalen Rand des Sternums. Anschließend wurde Heparin (100 I.E./Tier; Heparin-Natrium-25000-ratiopharm ®, ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland) als Bolus in die V. coccygeus injiziert. Nach Desinfektion (Softasept ®, B. Braun Melsungen AG,

Melsungen) wurde das Abdomen mittels medianer Laparotomie eröffnet. Nach dem Durchtrennen der äußeren Haut erfolgte ein Schnitt oberhalb der Symphyse durch die Bauchdecke. Entlang der Linea alba wurde der Schnitt schließlich bis zum caudalen Rand des Sternums verlängert. Um eine gute Sicht auf die linke Niere zu erhalten, wurde das Darmkonvolut mit Hilfe von Wundhaken in Richtung der rechten Bauchwand aus dem Operationsfeld zurückgehalten (Abb. 3).

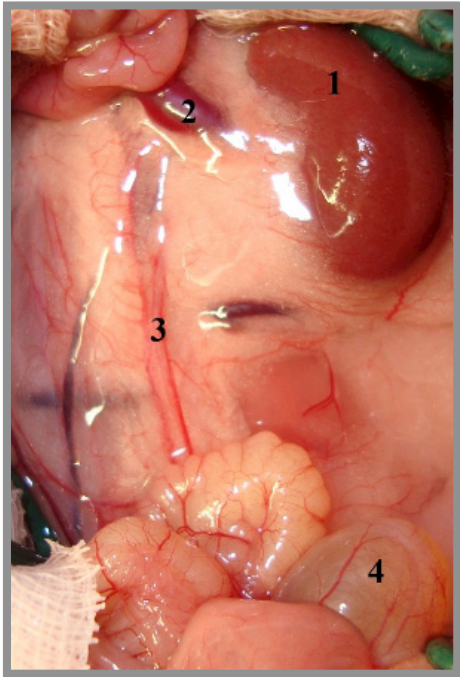


Abb. 3: Übersicht Abdomen der Ratte nach Laparotomie

- 1 linke Niere
- 2 V. renalis
- 3 Ureter
- 4 Harnblase

Unter Anwendung von zwei Wattestäbchen verschaffte man sich nun einen Überblick über den Verlauf der A. und V. renalis. In Nähe der Arterie wurde im angrenzenden Binde- und Fettgewebe mit der gebogenen Pinzette ein kleines Loch eröffnet, durch das die Gefäßklemmen direkt an die Gefäße gesetzt werden konnten. Mit einer arteriellen Klemme wurde die Nierenarterie abgeklemmt, sodass sich die Niere schnell entfärbte und blass wurde, da die Blutzufuhr unterbrochen wurde. Waren mehrere Nierenarterien vorhanden, wurden diese ebenso wie beschrieben abgeklemmt. Die venöse Klemme wurde anschließend über die Nierenvene geklemmt. Die Niere verfärbte sich durch den gestörten venösen Abfluss dunkelrot bis blau (Abb. 4).

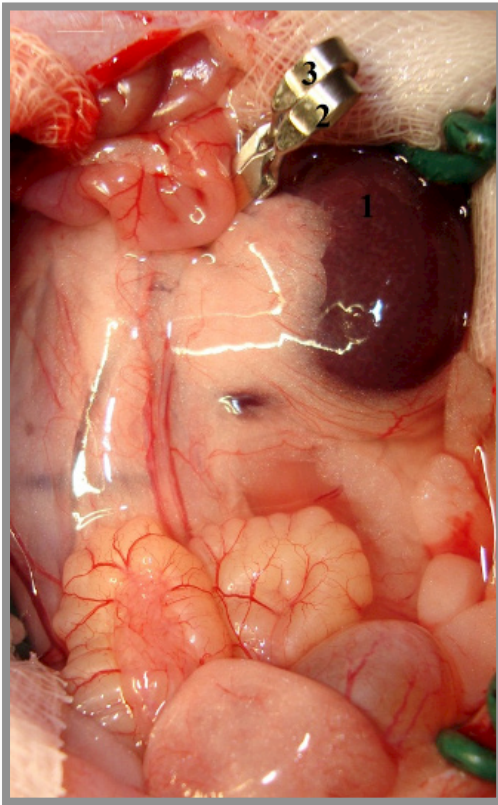


Abb. 4: Übersicht des Operationsfeldes während Ischämie

- 1** ischämische linke Niere
- 2** venöse Gefäßklemme
- 3** arterielle Gefäßklemme

Der Vorgang des Abklemmens und damit der Ischämie wurde über eine Dauer von 45 min aufrechterhalten. Über den eröffneten Bauchraum wurde innerhalb dieses Zeitraumes eine in physiologische Kochsalzlösung getränkte Kompresse gelegt und das Tier weiterhin auf einer Wärmeplatte platziert. Während der Ischämiezeit erfolgte eine intensive Narkoseüberwachung. Nach Ablauf der Ischämiezeit wurden die venöse und die arterielle Klemme von den jeweiligen Gefäßen gelöst. Die Niere nahm daraufhin wieder langsam ihre physiologisch rote Färbung an. Im Anschluss wurde dem Tier ca. 2 ml physiologische Kochsalzlösung (NaCl 0,9 %; B. Braun Melsungen AG, Melsungen) in den Bauchraum gegeben, um Flüssigkeitsverluste hinreichend auszugleichen. Der Darm wurde wieder in seine natürliche Lage gebracht. Die Bauchdecke und die Haut wurden mit einer fortlaufenden Naht (3/0, Polyester, Medipoint, Hamburg, Deutschland) verschlossen und das Tier während der Aufwachphase unter einer Rotlichtlampe positioniert, um die Thermoregulation zu unterstützen. Die analgetische Behandlung erfolgte mittels Buprenorphinhydrochlorid (0,05 mg/kgKG s.c.; Temgesic ®, Reckitt Benckiser Healthcare Ltd., Berkshire, United Kingdom).

3.3.3. Nierentransplantation

3.3.3.1. Explantation der Spenderniere

Bei der Nierenexplantation wurden männliche Fisher - Ratten verwendet (F344/DuCrI) und mit Thiobutabarbital sodium (Körpermasse in g/1000 + 10 % ml; Inactin®, SIGMA-Aldrich Co., Steinheim, Deutschland) durch intraperitonealer Gabe in Narkose gelegt. Zur analgetischen Versorgung wurde Buprenorphinhydrochlorid (0,05 mg/kgKG s.c.; Temgesic ®; Reckitt Benckiser Healthcare Ltd., Berkshire, United Kingdom) subcutan in den Nacken injiziert. Die Vorbereitung des Operationsfeldes sowie Desinfektion erfolgte wie beim Warmischämiemodell (unter Punkt 3.3.2) beschrieben.

Nach der Laparotomie wurde das Darmkonvolut mit Hilfe von Wattestäbchen vorsichtig mobilisiert und nach Einhüllen in eine feuchte Kompresse auf dem äußeren Thorax abgelegt. Anschließend erfolgte die Mobilisierung des noch im Körper verbliebenen Darmabschnittes (Colon descendens). Nach Verlagerung des Abschnittes auf die rechte Körperseite des Tieres wurde das Colon descendens mit Hilfe von Wundhaken an der rechten Bauchwand leicht fixiert. Auf der linken oberen Körperseite erfolgte die Fixierung – unter Schutz mit Hilfe einer Kompresse – ebenfalls mit einem Wundhaken. Mit der linken unteren Körperseite wurde auf die gleiche Weise verfahren. Das Operationsfeld war nun optimal einsehbar (Abb. 5).

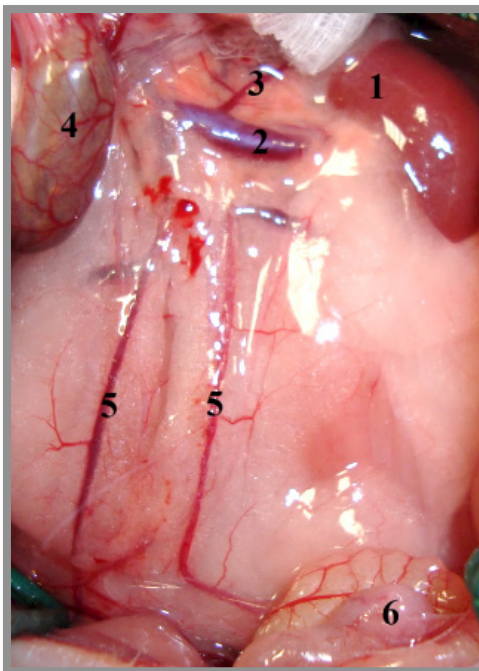


Abb. 5: Übersicht des Operationsfeldes nach Laparotomie

- | | |
|---|------------------|
| 1 | linke Niere |
| 2 | V. renalis |
| 3 | V. suprarenalis |
| 4 | Colon descendens |
| 5 | Vv. testiculares |
| 6 | Harnblase |

3. Material und Methoden

Anschließend wurden die oberflächlichen Gefäße (Vv. testiculares) sowie die linke V. suprarenalis mit einem Elektrokauter ligiert. Mit Hilfe eines Wattestäbchens – zum Schutz der Niere – wurde die Verbindung aus Fettgewebe zwischen linker Nebenniere und linker Niere mit dem Elektrokauter getrennt. Im Zuge der weiteren Präparation erfolgte die Freilegung der großen Bauchgefäße (V. cava caudalis, Aorta) mit zwei Wattestäbchen, sodass diese vollständig vom Fett- und Bindegewebe befreit waren. Der Ureter wurde mit dem umliegenden Fettgewebe vorsichtig zur linken Bauchwand geschoben (Abb. 6).

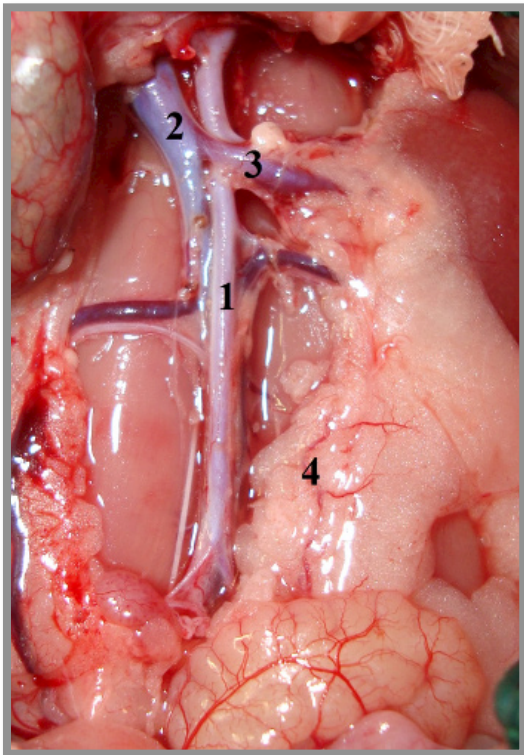


Abb. 6: Ansicht nach Präparation der großen Bauchgefäße

- 1 Aorta
- 2 V. cava caudalis
- 3 V. renalis
- 4 Ureter im umliegenden Fettgewebe

Besonderes Augenmerk wurde auf das sorgfältige Säubern der Abzweigung der V. renalis gelegt, da diese im späteren Verlauf der Nierenimplantation den venösen Patch darstellt. Während der Präparation wurden die Aorta und die V. cava caudalis vollständig voneinander getrennt und alle von der Aorta abzweigenden kleinen Gefäße mittels Elektrokauter vorsichtig ligiert. Im Weiteren wurde die Niere mit zwei Wattestäbchen vom angrenzenden Fettgewebe mobilisiert. Der Ureter wurde mit dem umliegenden Fettgewebe so weit in Blasennähe wie möglich mit einer Schere durchtrennt. Die Aorta und die V. cava wurden jeweils im

Folgenden 2 cm unterhalb der V. renalis mit einem Faden ligiert. Die sich anschließende Organentnahme wurde in drei Schritten realisiert, die zusammen nicht mehr als 30 Sekunden dauern sollten, da ansonsten die Gefahr der Thrombenbildung in den Kapillaren in der Niere besteht. Im ersten Schritt erfolgte das Abklemmen der Aorta mit einer arteriellen Klemme 1 cm oberhalb der V. renalis. Die Blutzufuhr in der Niere wurde somit gestoppt (Abb. 7).

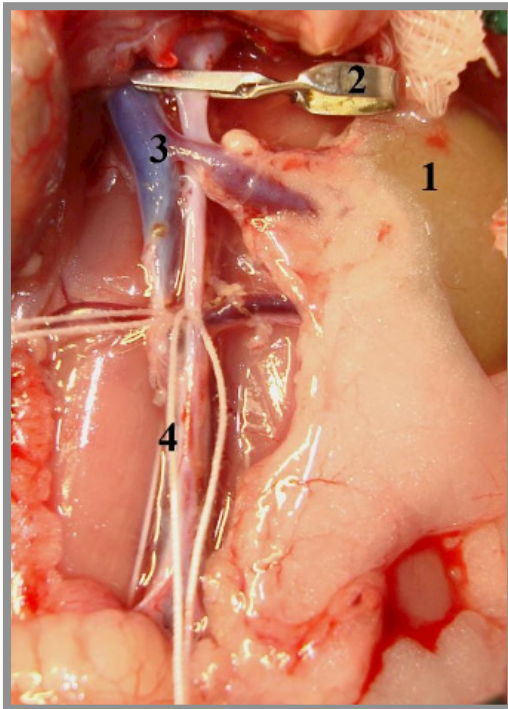


Abb. 7: Ansicht des Operationsfeldes vor Entnahme der Niere

- 1 nichtperfundierte linke Niere
- 2 arterielle Gefäßklemme
- 3 Schnittbereich für venösen Patch
- 4 Haltefaden für arterielle Punktion

Unter Verwendung eines Glasspatels wurde anschließend die V. renalis leicht zur linken Bauchwand gezogen. Mit einer Schere erfolgte dann die Durchtrennung der V. renalis unter Formen eines Trichters. Danach wurde die Aorta cranial der gesetzten Ligatur unterhalb der V. renalis punktiert und die Niere mit 1 ml gekühlter UW - Lösung (University of Wisconsin-Lösung; ViaSpan ®, Bristol-Myers Squibb GmbH & Co. KG, München, Deutschland) retrograd perfundiert. Durch die nun zunehmende Blutleere entfärbte sich die Niere vollständig. Anschließend wurde die Aorta caudal der arteriellen Klemmen sowie caudal der Ligatur durchtrennt. Die linke Niere konnte nun entnommen werden. Zum Zwecke der Kaltpräservierung über 20 Stunden bei 4 °C erfolgte die Lagerung der Niere nun in UW - Lösung. Die rechte Niere wurde im Anschluss nephrektomiert. Hierbei erfolgten die

Freipräparation der Niere aus dem umliegenden Fettgewebe sowie die Entfernung der Nierenkapsel. Mit Hilfe eines Fadens wurde eine Massenligatur um die Nierengefäße und den Ureter durchgeführt. Im Folgenden konnte dann mittels einer Schere die Nephrektomie der rechten Niere in Hilusnähe vorgenommen werden. Die Operationszeit betrug ca. 20 min.

3.3.3.2. Implantation der Spenderniere

Als Empfängertiere wurden männliche Lewis – Ratten (LEW/Crl) verwendet, die mit einer Mischung (1 ml/kg Körpergewicht) aus Ketamin (100 mg/ml; Ketamin ®, Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) und Xylazin (6 mg/ml; Rompun ®, Bayer Health Care, Leverkusen, Deutschland) durch intraperitoneale Gabe narkotisiert wurden. Zur Aufrechterhaltung der Narkose wurde im Anschluss eine Inhalationsnarkose verwendet (Isofluran, Forene ®, Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland). Vorbereitung des Spendertieres und Laparotomie erfolgten wie beim Warmischämiemodell (unter Punkt 3.3.2) beschrieben (Abb. 8).

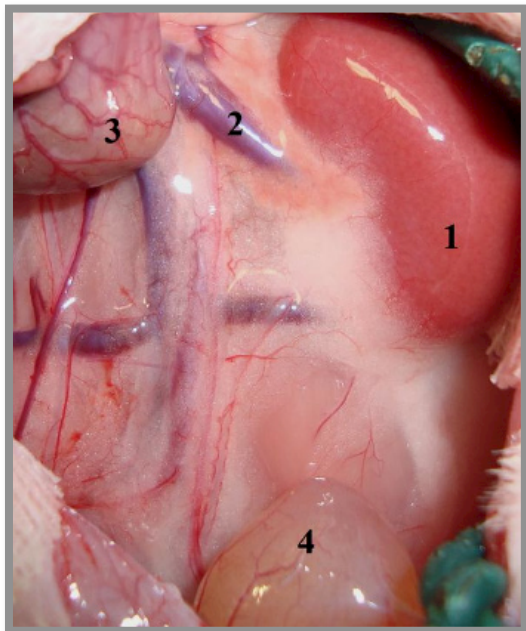


Abb. 8: Übersicht des Operationsfeldes nach Laparotomie

- 1** linke Niere
- 2** V. renalis
- 3** Colon descendens
- 4** Harnblase

Zu Beginn der Implantation erfolgte die Nephrektomie der linken Niere des Spendertieres. Dafür wurde zuerst die Nierenkapsel eröffnet und die A./V. renalis sowie der Ureter mittels Massenligatur (5/0, Polyester, Medipoint, Hamburg, Deutschland) abgebunden. Die Durchtrennung der Strukturen wurde schließlich nahe dem Nierenhilus vorgenommen. Die Niere konnte im Anschluss entfernt werden (Abb. 9).

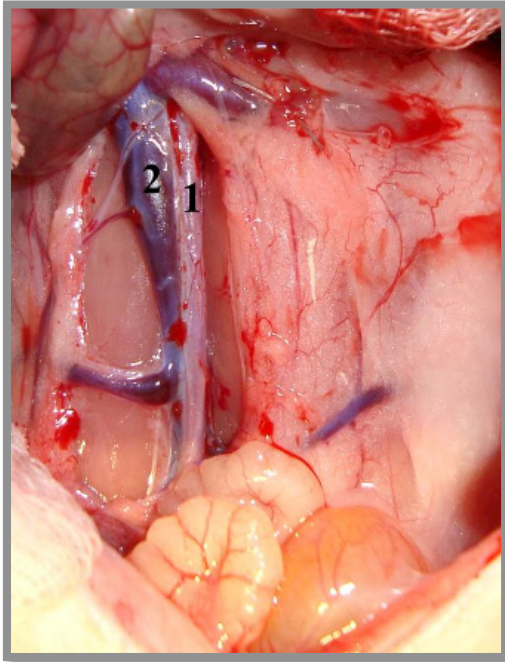


Abb. 9: Übersicht des Operationsfeldes nach Nephrektomie

- 1 freipräparierte Aorta
- 2 freipräparierte V. cava caudalis

Im weiteren Verlauf wurden die großen Gefäße – V. cava caudalis und Aorta – im Bauchraum freigelegt und sauber freipräpariert (Abb. 9). Im Zuge dessen wurden diese voneinander getrennt und alle venösen und arteriellen Gefäßabgänge im Bereich caudal der Abzweigung der V. renalis und cranial der Aortenaufzweigung im Beckenbereich mit einem Elektrokauter ligiert und durchtrennt. Im sich anschließenden Schritt wurden die venösen und arteriellen Klemmen caudal der V. renalis und cranial der Aortenaufzweigung gesetzt, um den Blutfluss im Operationsbereich zu unterbrechen. Die Klemmensetzung erfolgte in Richtung des Blutflusses: craniale arterielle Klemme, caudale arterielle Klemme, caudale venöse Klemme und craniale venöse Klemme (Abb. 10).

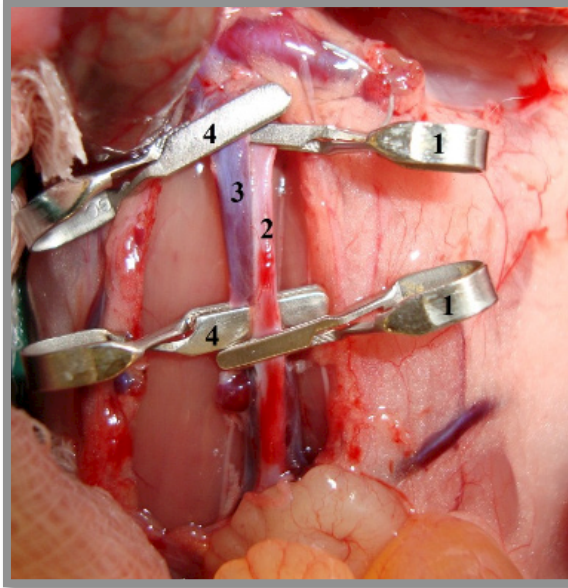


Abb. 10: Übersicht des Operationsfeldes nach Setzen der Gefäßklemmen

- 1 arterielle Gefäßklemmen
- 2 Aorta
- 3 V. cava caudalis
- 4 venöse Gefäßklemmen

Die Eröffnung der Gefäße wurde nun durch anfängliches Perforieren des Gefäßes mittels einer gebogenen Kanüle vorgenommen. Mit einer Gefäßschere wurde dann der jeweilige Schnitt in cranialer Richtung verlängert. Der Einschnitt der Aorta erfolgte etwa 4 mm cranial der Aortenaufzweigung und hatte eine Länge von ca. 3 mm. Der Schnitt der V. cava war etwa 5 mm lang und erfolgte 5 mm cranial der caudalen venösen Klemme. Mit Hilfe von physiologischer Kochsalzlösung (NaCl 0,9 %; B. Braun Melsungen AG, Melsungen) wurde nun der abgeklemmte Bereich durch den jeweiligen Einschnitt vom Blut freigespült und eventuell entstandene Blutgerinnsel entfernt.

Die Spenderniere mit Nierengefäßen und Ureter, die zwischenzeitlich bei 4 °C in UW-Lösung über 20 Stunden gelagert wurde, wurde im Folgenden auf der linken Bauchseite in ihrer später vorgesehenen Position platziert. Im Laufe der Operation wurden die Niere sowie die Aorta und die V. cava mittels physiologischer Kochsalzlösung (NaCl 0,9 %; B. Braun Melsungen AG, Melsungen) feucht gehalten.

Der Aortenstumpf wurde nun so in die physiologische Lage gebracht, dass dieser nicht verdreht und somit der Zugang der A. renalis nicht blockiert war. Zur anfänglichen Fixierung des cranialen Aortenstumpfes befestigte man diesen dann am cranialen und caudalem Ende jeweils an der vorgenommenen Aorteninzision. Mit einer fortlaufenden Naht wurde die Vorderseite des Aortenstumpfes nun an die Aorta angenäht. Mit dem venösen Patch der Spenderniere wurde auf die gleiche Weise verfahren, sodass dieser auf der Vorderseite an der

V. cava befestigt war. Anschließend wurde die Niere zur rechten Bauchwand gewendet und die Rückseite wie zuvor beschrieben ebenso mit Hilfe einer vorlaufenden Naht genäht. Für das Nähen der Gefäße wurden Fäden der Stärke 9/0 (Ethilon, Ethicon, Livingston, Scotland) verwendet. Vor dem vollständigen Verschluss des venösen Patches war eine sorgfältige Spülung der V. cava mit Kochsalzlösung (NaCl 0,9 %; B. Braun Melsungen AG, Melsungen) notwendig, damit keine Luftblasen in dem Gefäß zurückblieben. Durch das caudale noch geöffnete Ende des Aortenstumpfes wurde die Aorta ebenso gespült und der Stumpf mit einer Ligatur (5/0, Polyester, Medipoint, Hamburg, Deutschland) so verschlossen, dass auch die Aorta luftblasenfrei war (Abb. 11).

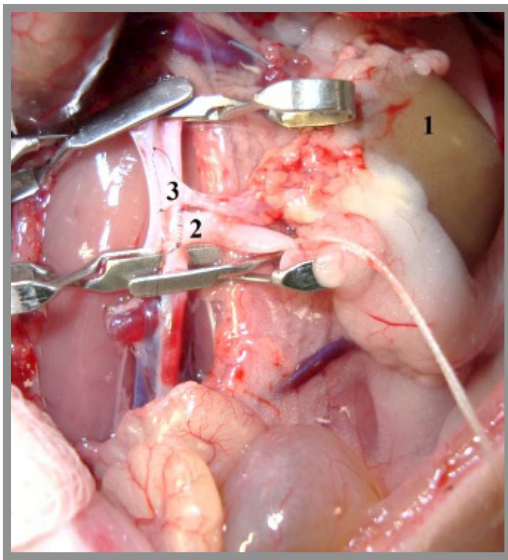


Abb. 11: Übersicht des Operationsfeldes nach Adaption der Nierengefäße des Transplantates

- 1 nichtperfundierte Transplantatniere
- 2 adaptierter arterieller Anteil
- 3 adaptierter venöser Anteil

Das Öffnen der Klemmen erfolgte nun in umgekehrter Reihenfolge des Blutflusses. Die Niere färbte sich infolge der wiedereinsetzenden Durchblutung langsam hellrot bis hin zur physiologisch roten Nierenfarbe. Zum Schutz wurde die Niere im Folgenden dann im Fettgewebe in Höhe der ursprünglichen Niere eingebettet, sodass diese konstant in ihrer Lage gehalten wird.

Im letzten Schritt erfolgte schließlich das Einnähen des Ureters in die Blase. Dafür wurde dieser vom umliegenden Fettgewebe vorsichtig freipräpariert und das distale Ende des Ureters mit der Präparierschere schräg abgeschnitten. An der höchsten Stelle des Schnittes wurde nun ein Faden (10/0, Ethilon, Ethicon, Livingston, Scotland) ligiert. Das Lumen des Ureters darf

in diesem Zusammenhang nicht eingeeengt oder verschlossen werden. An der Blase erfolgte im Bereich der Apex das vorsichtige Abpräparieren der Blasenmuskulatur. Das Endothel der Blase wölbte sich nun heraus und sollte intakt bleiben. Die Nadel des Fadens, an dem der Ureter befestigt wurde, wurde schließlich durch das Blasenendothel gezogen, sodass die Nadel an der Vorderwand der Blase wieder nach außen trat. Der Faden wurde nun so lange angezogen, bis die Ligatur des Fadens am Ureter in der Blase sichtbar wird. So kann sichergestellt werden, dass sich der Ureter in der Blase befindet und der Urin ordnungsgemäß ablaufen kann. Zur Befestigung des Fadens an der Blase wurden nun zwei Stiche durch die Blasenoberfläche vorgenommen und nach dem zweiten Stich verknotet. Zum Schutz des Ureters und zum Schließen des Loches in der Blase wurde abschließend das periurethrale Fettgewebe mit einem Faden (9/0, Ethilon, Ethicon, Livingston, Scotland) mit vier Einzelheften locker an der Blase fixiert.

Im letzten Schritt wurde das Darmkonvolut in den Bauchraum zurückverlagert, sodass sich der Darm wieder in natürlicher Lage befand. Vor dem Verschließen des Bauchraumes ist das Spülen mit physiologischer Kochsalzlösung (NaCl 0,9 %; B. Braun Melsungen AG, Melsungen) angezeigt, um Fadenreste zu entfernen und mögliche durch den operativen Eingriff entstandene Flüssigkeitsverluste auszugleichen. Der Verschluss des Bauchraumes und der Haut erfolgte mit einer fortlaufenden Naht (3/0, Surgicryl – Polyglycolic Acid, smi AG, Hünningen, Belgium). Im Zuge der Analgesie wurde Buprenorphinhydrochlorid (0,05 mg/kgKG s.c.; Temgesic ® Reckitt Benckiser Healthcare Ltd., Berkshire, United Kingdom) appliziert. Das Tier wurde während der Aufwachphase unter einer Rotlichtlampe positioniert. Die Operationszeit betrug ca. 90 min.

3.3.5. Einbau der osmotischen Minipumpe

Das Befüllen der osmotischen Minipumpen (Osmotic Pump Model 2ML1, alzet, DURECT Corporation, Cuperino, California, USA) sowie die anschließende Lagerung in physiologischer Kochsalzlösung (NaCl 0,9 %; B. Braun Melsungen AG, Melsungen) bei einer Temperatur von 37 ° - 38 °C erfolgte ca. 24 h vor Einbau der Minipumpe. Vor dem Befüllen der Pumpe erfolgte die Adaption des Katheters (Polythene Tubing; Innendurchmesser 0,75 mm) an die Minipumpe, der schließlich in die V. femoralis gelegt wird. Die Abgabe der Substanz über die Minipumpe erfolgt konstant mit einem Volumen von 10 µl/Stunde. Der

Einbau der osmotischen Minipumpen ins Empfängertier wurde jeweils nach Beendigung der Implantation bzw. nach Beendigung der Warmischämiezeit vorgenommen. Während der Operationsvorbereitung wurden dafür ebenso der Nackenbereich des Tieres und der Bereich des rechten Inguinalspaltes rasiert. Nach Desinfektion (Softasept ®, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) des Nackenbereiches erfolgte zuerst ein Hautschnitt. Die Haut wurde anschließend vorsichtig mit einer Schere etwa ca. 8 cm nach caudal von der darunterliegenden Muskulatur gelöst. Im Folgenden wurde der Bereich des rechten Inguinalspaltes desinfiziert (Softasept ®, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) und ein Hautschnitt entlang des Inguinalspaltes vorgenommen.

Im weiteren Verlauf wurde der bereits präparierte Bereich im Nacken des Tieres mit Hilfe eines Trokars in Richtung des rechten Oberschenkels verlängert, sodass dieser nun im rechten Inguinalspalt sichtbar wurde. Nach Entfernung des Trokars blieb die Plastikschrühülle des Trokars zurück. Nun wurde die osmotische Minipumpe vorsichtig im Nackenbereich platziert und der Katheter durch die Schrühülle des Trokars in den Inguinalbereich gelegt. Es folgte nun der Verschluss des Hautschnittes im Nackenbereich (3/0, Surgicryl – Polyglycolic Acid, smi AG, Hünningen, Belgium). Um den Katheter in die V. femoralis zu legen, wurde eine stumpfe Präparation entlang des Inguinalspaltes mit Wattestäbchen vorgenommen, sodass A., V. sowie N. femoralis gut sichtbar wurden. Die Vene wurde nun von der darüberliegenden A. femoralis getrennt und anschließend das distale Ende der Vene mit einem Haltefaden (5/0, Polyester, Medipoint, Hamburg, Deutschland) abgebunden. Dieser Faden wurde an der Unterlage des Tieres auf der linken Seite unter Aufbau einer Spannung fixiert. Mit einem weiteren Haltefaden (5/0, Polyester, Medipoint, Hamburg, Deutschland), bei dem der Knoten vorbereitet wurde und der proximal des ersten Fadens gelegt wurde, wurde auf die gleiche Weise verfahren. Mit Hilfe der schmalen gebogenen Pinzette wurde das restliche Blut auf der Vene vorsichtig nach proximal gestrichen. Zur Eröffnung des Gefäßes wurde eine Gefäßschere genutzt. Das Gefäß wurde dann mit der Pinzette aufgespreizt und der Katheter unter Verwendung der gebogenen Pinzette in die vorbereitete Öffnung nach proximal in Richtung Abzweigung der V. cava im Bauchraum vorgeschoben. Das Verschieben des Katheters sollte ausreichend weit sein, sodass dieser auch bei Bewegung des Tieres im Anschluss nicht mehr hinaus rutschen kann. Das Fixieren des Katheters erfolgte abschließend mit den zuvor fixierten Haltefäden. Der Verschluss der Haut im Inguinalspalt wurde schließlich unter Schonung des Katheters mit einer fortlaufenden Naht (3/0, Surgicryl – Polyglycolic Acid, smi AG, Hünningen, Belgium) vorgenommen.

3.4. Versuchsdesign

Das Ziel des Versuches ist die Untersuchung der protektiven Wirkung von N – Oktanoyl – Dopamin (NOD) im Vergleich zu Dopamin in Bezug auf Ischämie-Reperfusionsschäden, auf die Nierenfunktion nach Transplantation und auf das Langzeitüberleben des Transplantates. Die hier vorliegende Studie ist unterteilt in einen Vor- und einen Hauptversuch. Im Vorversuch wurde im MRT das Arterial Spin Labeling (ASL) im direkten Vergleich mit einer kontrastmittelunterstützten Messung unter Anwendung eines Schadensmodells für das akute Nierenversagen (Warmischämiemodell) etabliert.

Der Hauptversuch wurde in drei Teilbereiche mit je einem Schadensmodell untergliedert, bei dem jeweils NOD als Therapeutikum angewendet wurde. Bei den Schadensmodellen handelte es sich um ein gut standardisiertes Warmischämiemodell, um ein akutes allogenes und ein chronisches allogenes Transplantationsmodell mit jeweils einer Kaltischämieschädigung. Die Behandlung mit NOD erfolgte über eine osmotische Minipumpe im Warmischämiemodell über 5 Tage und in den Transplantationsmodellen jeweils über 7 Tage. Vor Versuchsende wurde jeweils die Untersuchung der Nierenperfusion im MRT mittels ASL durchgeführt.

3.5. Gruppenaufbau

Die Unterteilung der Gruppen erfolgte vorab in 3 Operationsmodelle mit jeweils 3 Behandlungsgruppen:

3.5.1. Warmischämiemodell:

Nach Beendigung der Ischämiezeit sowie dem Verschluss der Bauchdecke und der Haut wurde in allen Gruppen eine osmotische Minipumpe (Osmotic Pump Model 2ML1, alzet, DURECT Corporation, Cuperino, California, USA) sowie der intravenöse Zugang mittels Katheter (Polythene Tubing; Innendurchmesser 0,75 mm) in die V. femoralis vorgenommen. Die osmotische Minipumpe gab die jeweilige Substanz kontinuierlich über 5 Tage mit einem Volumen von 10 µl/Stunde ab.

Gruppe 1: *Behandlung mit NaCl (= Kontrolle)* (n = 8)

Die osmotische Minipumpe wurde mit physiologischer Kochsalzlösung (NaCl 0,9 %; B. Braun Melsungen AG, Melsungen) gefüllt.

Gruppe 2: *Behandlung mit Dopamin (DA)* (n = 8)

Die Befüllung der Minipumpe erfolgte mit Dopamin (Dopamin Fresenius 200 mg/5 ml, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland) in einer Konzentration von 5 µg/kg/min.

Gruppe 3: *Behandlung mit NOD* (n = 8)

Die osmotische Minipumpe wurde mit N – Oktanoyl – Dopamin mit einer Konzentration von 7,5 µg/kg/min gefüllt.

3.5.2. Akutes Nierentransplantationsmodell:

Nach Beendigung der Nierentransplantation erfolgte der Einbau der osmotischen Minipumpe in alle drei Versuchsgruppen. Die jeweilige Substanzabgabe erfolgte kontinuierlich über 7 Tage mit einem Volumen von 10 µl/Stunde.

3.6. Arterial Spin Labeling (ASL)

Neben der Anwendung eines exogenen Kontrastmittels zur quantitativen Perfusionsmessung im MRT (DCE-MRT) steht mit ASL seit Beginn der 90er Jahre darüber hinaus eine vollständig nichtinvasive Messmethode zur Verfügung (Detre, Leigh et al. 1992). An Bedeutung gewinnt diese Messtechnik dadurch vor allem bei der Untersuchung von Patienten, die durch eine Vorerkrankung, wie z.B. einer eingeschränkten Nierenfunktion, bereits einem erhöhten Risiko ausgesetzt sind. Die Perfusionsmessung mit Hilfe von ASL beruht auf der Nutzung der Protonen im Blut als endogenes Kontrastmittel, wodurch die Gabe eines exogenen Kontrastmittels, wie Gadolinium, nicht mehr notwendig ist (Petersen, Zimine et al. 2006; Martirosian, Boss et al. 2010; Artz, Sadowski et al. 2011).

Die tierexperimentellen ASL - Messungen wurden unter Einsatz eines speziellen Kleintiervolumenresonators (Fa. Rapid, Würzburg, Deutschland) in einem Ganzkörper - Magnetresonanztomographen mit 3.0 Tesla Feldstärke (Siemens TimTrio 32 x 102, Siemens HealthCare Sector, Erlangen, Deutschland) durchgeführt.

3.6.1 Das Prinzip der ASL - Technik

Zur Akquirierung eines perfusionsgewichteten Bildes mit Hilfe der ASL - Technik war vor der Durchführung die Festlegung einer Markierungsschicht und einer Ausleseschicht notwendig. Letzteres ist der Bereich, in dem die Perfusion in den Nieren bestimmt werden soll und der letztlich für die Bildgebung verwendet wird. Die Markierung der Protonen im Blut in der gewählten Markierungsschicht erfolgte durch die Inversion ihrer Magnetisierung mittels eines Hochfrequenz-Puls (HF-Puls). Nach einer Inversionszeit von 0,5 sec – 2 sec, während der das markierte Blut in die Ausleseschicht gelangt, erfolgte dort die Akquirierung des Signals.

Zur Durchführung der Invertierung gibt es grundsätzlich zwei Methoden, die Anwendung finden: das kontinuierliche ASL (continous ASL, cASL) und das gepulste ASL (pulsed ASL, pASL). Während der cASL – Methode wird ein längerer (1 sec – 5 sec) und schwächerer Puls zur Invertierung verwendet. Die pASL – Technik gebraucht dagegen einen kurzen HF-Puls (< 20 ms) und wurde im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich angewendet. Bei der Perfusionsmessung mittels ASL handelt es sich um eine Subtraktionsmethode bei der mindestens zwei Bilder akquiriert und anschließend voneinander subtrahiert werden. Ziel

dabei ist die Eliminierung des Signals des statischen Gewebes, da dies in beiden Aufnahmen identisch ist und sie sich somit nur durch das Perfusionssignal der eingeflossenen Protonen unterscheiden. Je nach Markierungsschema unterscheiden sich beide Aufnahmen primär durch das Vorhandensein der Markierung oder durch die relative Lage der Markierungs- zur Ausleseschicht bzw. deren Ausdehnung.

In der vorliegenden Arbeit wurde das FAIR (flow - sensitive alternating inversion recovery) – Schema verwendet, welches zuerst von Kwong et al. beschrieben wurde (Kwong, Chesler et al. 1994). Dabei erfolgte die Markierung der Protonen in der ersten Aufnahme global (tag), d.h. alle Protonen in der Sendereichweite der Spule werden durch einen HF-Puls invertiert (globale Inversion). Nach der Inversionszeit erfolgte die Auslese des Signals in der Ausleseschicht. Schließlich wurde ein weiteres, diesmal schichtselektives Bild (control) akquiriert. Hier erfolgte die Markierung der Protonen ausschließlich in der Ausleseschicht (selektive Inversion), wo nach der Inversionszeit dann auch die Auslese stattfand (Kim 1995; Petersen, Zimine et al. 2006; Martirosian, Boss et al. 2010).

3.6.2 Die Auswertung der ASL - Messung

Zur Auswertung der ASL – Messung wurde die Subtraktion von tag- und control- Bild durchgeführt. Man erhielt so ein perfusionsgewichtetes Bild (Petersen, Zimine et al. 2006). Zur Quantifizierung der renalen Perfusion wurden mit Hilfe eines selbstgeschriebenen MATLAB - Skripts (The MathWorks, Natick, MA, USA) Perfusionskarten erstellt. Der Wert jedes Pixels dieser Karte entsprach anschließend der Perfusion am entsprechenden Ort. Durch Zuordnung einer Farbskala konnten Areale mit hoher Perfusion (rot) und Bereiche mit einer verminderten Perfusion (blau) besser dargestellt und unterschieden werden. Die Perfusion wurde dabei absolut in ml/100 g Nierengewebe/min angegeben (Abb. 12).

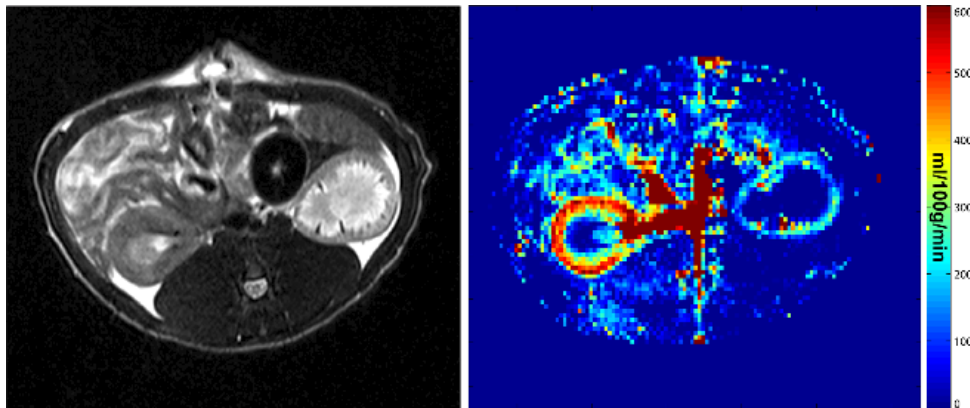


Abb. 12: Exemplarische Darstellung einer ASL-Perfusionskarte
links – Aufnahme einer T2 - gewichteten Turbo-SpinEcho Sequenz
 (Auflösung: 0,3 mm x 0,3 mm; Schichtdicke: 1 mm)
rechts – dazugehörige Perfusionskarte

3.6.3 Vorversuch im MRT zur Etablierung des ASL nach akutem Nierenversagen

Zur Etablierung des Arterial Spin Labelings nach akutem Nierenversagen im Rattenmodell wurden bei 5 nativen Ratten ein ischämisches Nierenversagen (Warmischämiemodell) linksseitig durch Abklemmen der Nierengefäße über 45 min induziert. Die rechte native Niere stellte die gesunde Kontrollniere dar.

Die Perfusionmessung im MRT mittels ASL erfolgte 5 Tage nach Induktion des Nierenversagens. Ziel dieses Vorversuches war es zu prüfen, ob es mit Hilfe der ASL - Sequenz möglich ist, einen Perfusionsunterschied in einer gesunden und kranken Niere festzustellen. Vergleichend dazu erfolgte die Perfusionmessung nach Kontrastmittelgabe (DCE-MRT).

3.7. Histologische Untersuchungen

Nach Beendigung des jeweiligen Beobachtungszeitraumes wurde bei jedem Tier eine Laparotomie durchgeführt und schließlich die linke Niere entnommen. Dafür wurde vorab die Nierenkapsel entfernt und eine Massenligatur um die Nierengefäße vorgenommen. Die Fixierung der Nierenproben erfolgte in gepuffertem Formalin (4 %).

3.7.1. Anfertigung eines Paraffinschnittes

Zur Anfertigung eines Paraffinschnittes aus den Nierengeweben erfolgte nach der Fixierung der Proben in gepuffertem Formalin über mindestens 24 Stunden eine Entwässerung mit Hilfe einer Alkoholreihe (Ethanol) in aufsteigender Konzentration. Xylene (z.B. Xylol) wurden als Clearing Reagent verwendet. Im Anschluss erfolgte das Einbetten der Probe in Paraffin. Die beschriebenen Arbeitsschritte wurden in einem Autotechnikum (Leica, Deutschland) durchgeführt.

Übersicht der einzelnen Arbeitsschritte:

- | | |
|---|---|
| 1. zur vollständigen Fixierung der Gewebeprobe: | 45 min in 10 % Formalin |
| 2. zur Entwässerung des Gewebes: | 45 min jeweils in 50 %, 70 % und 95 % Alkohol sowie 3 x 45 min in 100 % Alkohol |
| 3. Intermedium zwischen Alkohol und Paraffin:
(Lösungsmittel des Alkohols) | 3 x 45 min in Xylol |
| 4. Einbetten der Probe: | 2 x 1 Stunde Paraffin |

Im Folgenden wurden mit einem Mikrotom (Rotationsmikrotom Reichert - Jung Biocut 2030, Reichert Jung, Deutschland) 3 µm dicke Nierenschnitte unter Auftrag auf silanisierte Objektträger angefertigt. Das Trocknen der Schnitte erfolgte über Nacht in einem Wärmeschrank mit einer Temperatur von 37 °C.

3.7.2. Lichtmikroskopische Untersuchungen

3.7.2.1 Hämatoxylin – Eosin – Färbung (H&E- Färbung)

Bei der H&E – Färbung handelt es sich um eine Übersichtsfärbung, die für die morphologische Diagnostik bevorzugt angewendet wird. In der hier vorliegenden Studie wurde diese Färbung durchgeführt, um die Transplantationsabstoßung mittels der Banff - Klassifikation bewerten zu können.

Übersicht der einzelnen Arbeitsschritte:

- | | |
|--|---|
| 1. Entfernung des Paraffin:
(Farbstoffe = hydrophil) | 3 × 5 min in Xylol |
| 2. Einbringen eines wässrigen Mediums:
(Rehydrieren) | jeweils 2 min in 100 %, 96 %, 80 % und
70 % Alkohol sowie 2 x 2 min in
Leitungswasser |
| 3. Kernfärbung: | 12 min in Hämatoxylin |
| 4. Spülung: | 3 x kurz in Leitungswasser schwenken |
| 5. Bläuen:
(Erhöhung pH; dadurch Entstehung
blauvioletter Färbung) | 15 min in Leitungswasser |
| 6. Plasmafärbung: | 2 min in Eosin (wässrig, 0,1 %) |
| 7. Spülung: | 1 x kurz in Leitungswasser schwenken |
| 8. Entwässerung: | jeweils 1 min in 80 % und 90 % Alkohol
sowie 2 x 2 min in 100 % Alkohol |
| 9. Klären: | 3 x 2 min Xylol |

Im letzten sich anschließenden Arbeitsschritt wurden die Gewebeschnitte mit Depex mounting medium (VWR International bvba/sprl, Leuven, Belgien) abgedeckt.

3.7.3. Immunhistochemie

Die Immunhistochemie basiert auf der Anwendung von spezifischen Antikörpern zum Nachweis von bestimmten Antigenen im spezifischen Gewebe unter Bildung eines Antigen - Antikörper - Komplexes. Zur Charakterisierung der Entzündungsinfiltrate in den Nieren wurde in dieser Studie die ED1 - und die MHC II - Färbung durchgeführt. Bei der ED1 - Färbung kommt es zur Bindung vom Erstantikörper an CD68 auf Makrophagen. Bei der MHC II - Färbung befindet sich das Antigen (= MHC – Proteinkomplex) auf der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen und von Lymphozyten. Bei dem Erstantikörper handelte es sich jeweils um einen Maus-anti-Ratte-Antikörper. Der biotinylierte Zweitantikörper (Pferd-anti-Maus-Antikörper) fungierte als Brückenantikörper zum anschließenden enzymmarkierten Avidin-Biotin-Komplex. Dabei diente die Meerrettichperoxidase als Enzym. Weiterhin wurde Wasserstoffperoxid als Substrat sowie Diaminobenzidin (DAB) als Chromogen verwendet, wodurch es schließlich zu einer braunen Färbung an dem Ort der Antigen-Antikörper-Reaktion kam.

Übersicht der einzelnen Arbeitsschritte:

- | | |
|--|---|
| 1. Entfernung des Paraffins | Xylol- und Ethanolreihe (100 %, 96 %, 80 %) |
| 2. Waschung | mit Tris Buffered Saline (TBS) |
| 3. Antigendemaskierung | für ED1: 10 min Inkubation in Citratpuffer (pH 6,0 - 6,3) bei ca. 500 Watt; dann 10 min bei 270 Watt in der Mikrowelle
für MHC II: 5 min Inkubation in Tris-EDTA-Puffer bei 500 Watt |
| 4. nach Abkühlung Waschung | mit TBS |
| 5. Blockade der endogenen Peroxidase | mit Gemisch aus Wasserstoffperoxid (2 % des Gesamtgemisches) und Methanol über 30 min |
| 6. Waschung | mit TBS |
| 7. Blockade des unspezifischen Hintergrundes | 20 min mit 10 % Pferdeserum |

8. Blockade des endogenen Biotins	15 min Avidin, dann 15 min Biotin (Avidin/Biotin Blocking Kit, Linaris Biologische Produkte GmbH, Wertheim, Deutschland)
9. Waschung	mit TBS
10. Inkubation mit Erstantikörper	über Nacht bei 4 °C; Maus-anti-Ratte- Antikörper; Verdünnung mit TBS 1 : 200
11. Waschung	mit TBS
12. Inkubation mit Zweiantikörper	über 45 min bei Raumtemperatur; Pferd-anti- Maus-Antikörper; Verdünnung mit TBS 1 : 200
13. Waschung	mit TBS
14. Inkubation mit Avidin-Biotin- Complex-Lösung (horseradish peroxidase, Linaris Biologische Produkte GmbH, Deutschland)	über 30 min
15. Waschung	mit TBS
16. Inkubation mit DAB- Substratchromogenlösung (Diaminobenzidin; Peroxidase Substrate Kit, Linaris Biologische Produkte GmbH, Deutschland)	1 – 5 min (Beobachtung unter Mikroskop)
17. bei Erreichen optimaler Farbintensität	Stoppen der Reaktion mit destilliertem Wasser
18. Gegenfärbung/Kernfärbung zur besseren Darstellung der Morphologie	5 min mit Hämatoxylin
19. Dehydrierung	Ethanol- (80 %, 96 %, 100 %) und Xylolreihe
20. Eindecken	mit Depex mounting medium (VWR International bvba/sprl, Leuven, Belgien)

Die Verdünnung der Antikörper erfolgte mit 2 % TBS/BSA (Bovines Serum Albumin). Als Negativkontrolle wurde der erste Antikörper nicht verwendet.

Bei der Auswertung wurden pro Schnitt bei einer 400 - fachen Vergrößerung mindestens 10

Gesichtsfelder pro histologischen Schnitt ausgewertet und die Positivität pro Fläche in μm^2 bzw. direkt numerisch als Anzahl der Zellen angegeben.

Übersicht verwendeter Antikörper:

- **Erstantikörper:**

ED1	Verdünnung 1 : 200	(MAK0341R; Linaris biologische Produkte GmbH Deutschland)
MHC II	Verdünnung 1 : 200	(Cat. No. SM084PX; Acris Antibodies GmbH, Herford, Deutschland)

- **Zweitantikörper:**

Anti-Mouse IgG (H + L), biotinylated, Verdünnung 1 : 200 (BA-2001; Linaris biologische Produkte GmbH Deutschland)

3.7.3.1. ED1

ED1 ist ein Anti-CD68-Antikörper. Bei CD68 handelt es sich um ein transmembranöses Glykoprotein, welches in zytoplasmatischen Granula sowie im geringeren Anteil membranständig auf Makrophagen vorkommt. Der Nachweis des ED1 - Antigens erfolgt dabei auf eingewanderten, phagozytotischen Makrophagen und steht somit in Zusammenhang mit der Darstellung und Beurteilung von inflammatorischen Prozessen in der Niere (Dijkstra and Damoiseaux 1993; Damoiseaux, Dopp et al. 1994; van den Berg, Dopp et al. 2001).

3.7.3.2. MHC II

MHC II ist ein Proteinkomplex, der nur auf antigenpräsentierenden Zellen (APC) und Lymphozyten exprimiert wird und somit assoziiert ist mit der Regulation der adaptiven Immunantwort (Friese, Jones et al. 2005; Jones, Fugger et al. 2006; Shin, Ebersold et al. 2006). Durch Endozytose aufgenommene exogene Antigene können so auf der Oberfläche der

Zelle präsentiert werden und von CD4 + - T-Zellen erkannt werden (Inaba and Inaba 2005). Die MHC II - Färbung dient ebenso wie die ED1 - Färbung der Beurteilung der renalen Inflammation unter Berücksichtigung einer anderen Population von Entzündungszellen.

3.7.4. Banff - Klassifikation

Die Banff - Klassifikation, die ihre Anfänge bereits im Jahre 1991 in Banff/Kanada fand, stellt eine internationale Standardisierung von Kriterien zur Beschreibung der histologischen Befunde von Abstoßungsreaktionen nach Nierentransplantation dar, mit dem Ziel eine Prognose über das Langzeitüberleben des Transplantates stellen zu können (Solez, Axelsen et al. 1993). Während diese Klassifikation zuerst nur für transplantierte Nieren verwendet wurde, sind nun auch vergleichbare Klassifikationen für andere Organe wie z.B. Herz und Leber beschrieben (Solez 2010).

Das ursprüngliche offizielle Banff - Schema ist unterteilt in folgende Kategorien: hyperakute Abstoßung, Borderline Veränderungen, akute Abstoßungsreaktion, chronische Transplantatnephropathie sowie sonstige Veränderungen. Die akute Abstoßung und die chronische Nephropathie sind jeweils in drei Schweregrade eingeteilt. Bei der akuten Abstoßungsreaktion werden dabei die interstitielle Infiltration und die Schwere der Tubulitis sowie Vaskulitis beurteilt, während das Augenmerk bei der chronischen Nephropathie in der Beurteilung der interstitiellen Fibrose und von Tubulusatrophien liegt (Solez, Axelsen et al. 1993). Durch den Fortschritt der medizinischen Forschung war die Banff - Klassifikation im Laufe der letzten Jahre mehreren Aktualisierungen und Modifizierungen unterworfen (Racusen, Halloran et al. 2004; Solez, Colvin et al. 2007; Solez, Colvin et al. 2008; Sis, Mengel et al. 2010; Mengel, Sis et al. 2012). Die letzte Anpassung der diagnostischen Kriterien für renale Transplantatbiopsien erfolgte gegenwärtig im Jahre 2011, auf dessen Vorgaben sich die Beurteilung der Banff - Klassifikation in dieser Studie bezieht (Mengel, Sis et al. 2012). Tab. 1 zeigt zusammenfassend und vereinfacht die jeweiligen Schweregrade der Banff - Kategorien nach Sis et al. (Sis, Mengel et al. 2010).

Tab. 1: Kategorien der Banff-Klassifikation mit Schweregrade nach Sis et al. 2010

Kategorie	wesentliche Aspekte und Schweregrade
Normalbefund	
Hyperakut	Antikörper - vermittelt; Sensibilisierung; Nachweis von C4d
Borderline	milde Tubulitis, ohne Arteriitis
Akut	Grad 1A: interstitielle Infiltration > 25% und moderate Tubulitis Grad 1B: interstitielle Infiltration > 25 % und schwere Tubulitis Grad 2A: bis moderate Arteriitis Grad 2B: schwere Arteriitis > 25 % Lumeneinengung Grad 3: Transmurale Arteriitis, Nekrosen
Chronisch	Grad 1: milde interstitielle Fibrose und Tubulusatrophie Grad 2: moderate interstitielle Fibrose und Tubulusatrophie Grad 3: schwere interstitielle Fibrose und Tubulusatrophie

3.8. Ausschlusskriterien

Transplantierte Tiere, bei denen eine Ureterstenose, Hydronephrose, Gefäßstenose, Thrombose, Blutungen oder Infektionen auftraten, wurden von der statistischen Analyse ausgeschlossen.

3.9. Statistische Auswertungen

Die Angabe der Zahlenwerte erfolgt als Mittelwert unter Nennung der Standardabweichung (SD). Der Kruskal – Wallis – Test für multiple Vergleiche unabhängiger Gruppen wurde bei kontinuierlichen Daten mit ermittelter nicht-parametrischer Verteilung angewendet. Bei parametrischer Verteilung wurde der ANOVA - Test ausgeführt. Ergab sich bei diesem Test eine Signifikanz, erfolgte der gruppenweise Vergleich mit Tukey – Kramer – HSD – Test unter Beachtung der *experimentwise error rate*. Überlebenszeitvergleiche wurden mittels Kaplan-Maier getätigt. Histologische ordinale Daten wurden für Kontingenztabelle mit 2 x 2 Feldern mit dem Fisher – Exact - Test ausgewertet. Bei mehr als 2 x 2 Feldern wurde der Fisher-Freeman-Halton Test ausgewertet.

Die statistische Auswertung erfolgt mit der Software JMP ® (SAS; 10.0.0). Die Durchführung des Fisher – Freeman – Halton Test erfolgte mit SPSS (IBM; 21.0.0.0). Statistische Signifikanz wird definiert als $p < 0,05$.

4. Ergebnisse

4.1. Organfunktion nach Empfängerbehandlung im Warmischämiemodell

4.1.1. Körpergewicht

Die Körpergewichte der Tiere wurden jeweils an Tag 0 präoperativ und an Tag 5 nach Induktion des akuten Nierenversagens erhoben. Es konnten hierbei signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden. Die durchschnittlichen Gewichtsverluste waren in der Kontrollgruppe und in der DA - Gruppe am höchsten. In der Kontrollgruppe zeigte sich mit 14,5 % die größte Veränderung. Dies entspricht einem Gewichtsverlust von 39,75 g. Die DA - Gruppe wies eine durchschnittliche Gewichtsveränderung von 10,7 % auf, was einen Verlust von 29 g bedeutet. In der NOD - Behandlungsgruppe war diese Gewichtsveränderung am geringsten. Es kam nur zu einem durchschnittlichen Gewichtsverlust von 3,05 % bzw. 13 g. Die Gewichtsveränderungen innerhalb 5 Tage im Gruppenvergleich sind signifikant unterschiedlich ($p = 0,0087$). Auch im gruppenweisen Vergleich zeigte sich eine Signifikanz zwischen der Kontroll- und der NOD - Behandlungsgruppe ($p = 0,0064 *$). Die Unterschiede zwischen der DA - Gruppe und der Kontrollgruppe sowie zwischen der NOD - und der DA - Gruppe sind statistisch nicht signifikant (DA > Kontrolle: $p = 0,2634$; NOD > DA: $p = 0,1151$) (Abb. 13).

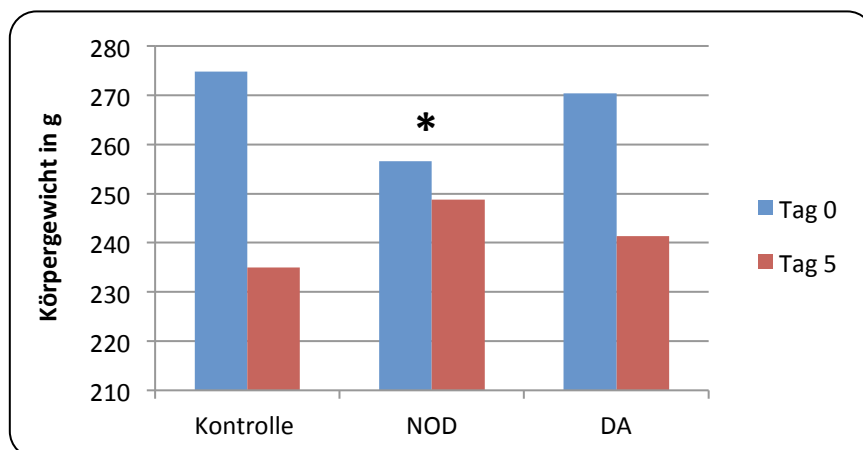


Abb. 13: Vergleich Körpergewicht an Tag 0 präoperativ und Tag 5 nach Induktion des akuten Nierenversagens; NOD > Kontrolle: $p = 0,0064 *$ (Tukey – Kramer – HSD - Test)

4.1.2. Nierenfunktion

Um einen Zusammenhang zwischen Empfängerbehandlung mit physiologischer Kochsalzlösung, Dopamin und NOD in Bezug auf die Nierenfunktion herzustellen, wurden als Hauptparameter für diese Untersuchung Kreatinin und Harnstoff bestimmt. Die Blutabnahmen für die Bestimmung der Nierenfunktionsparameter erfolgte retrobulbär an Tag 0 präoperativ, sowie an Tag 1, 3 und 5 postoperativ.

4.1.2.1. Kreatinin

In allen Gruppen zeigte sich im Laufe des Beobachtungszeitraums über 5 Tage ein deutlicher Anstieg des Kreatininwertes, der in der DA - und NOD - Gruppen seinen höchsten Punkt an Tag 1 (DA: $2,44 \pm 0,90$ mg/dl; NOD: $2,42 \pm 0,36$ mg/dl) und in der Kontrollgruppe an Tag 3 ($3,52 \pm 1,70$ mg/dl) hatte und im weiteren Verlauf wieder absank (Abb. 14).

An Tag 1 postoperativ zeigt die Kontrollgruppe einen durchschnittlichen Kreatininwert von $3,02$ mg/dl. Es konnte zwischen den Gruppen keine statistische Signifikanz zwischen den jeweiligen Kreatininwerten festgestellt werden ($p = 0,0888$). Erst ab Tag 3 wird deutlich, dass der Unterschied im durchschnittlichen Kreatininwert zwischen den Gruppen signifikant unterschiedlich ist (Kontrolle: $3,52 \pm 1,70$ mg/dl, DA: $2,25 \pm 1,62$ mg/dl, NOD: $1,04 \pm 0,60$ mg/dl; $p = 0,0157$ *). Im gruppenweisen Vergleich wurde deutlich, dass der Unterschied in den Kreatininwerten zwischen der NOD - Gruppe und der Kontrollgruppe hoch signifikant ist ($p = 0,0038$). Der direkte Vergleich zwischen Kontroll - und DA - Gruppe sowie zwischen NOD - und DA - Gruppe war statistisch nicht unterschiedlich (Kontrolle > DA: $p = 0,1893$; NOD > DA: $p = 0,2069$). Im Vergleich zu der Kontrollgruppe setzte die Erholung der Nierenfunktion bei den Behandlungsgruppen also signifikant schneller ein. Bei der NOD - Gruppe war im weiteren Verlauf die Erholung der Nierenfunktion am deutlichsten ausgeprägt. An Tag 5 nach Induktion des akuten Nierenversagens konnte ebenso ein hoch signifikanter Unterschied im Gruppenvergleich festgestellt werden (Kontrolle: $2,04 \pm 1,63$ mg/dl, DA: $1,43 \pm 1,12$ mg/dl, NOD: $0,46 \pm 0,10$ mg/dl; $p = 0,0083$ **). Der gruppenweise Vergleich machte einen wesentlichen Unterschied zwischen der NOD - und DA - Gruppe ($p = 0,0403$) sowie zwischen der NOD- und der Kontrollgruppe ($p = 0,0032$) deutlich. Zwischen den jeweils anderen Gruppen konnten jeweils keine Signifikanzen gezeigt werden (Kontrolle > DA: $p = 0,4309$). Alle Zusammenhänge sind in Tabelle 3 und 4 zusammenfassend dargestellt. Tab. 2 zeigt die durchschnittlichen Kreatininwerte dargestellt je Messzeitpunkt.

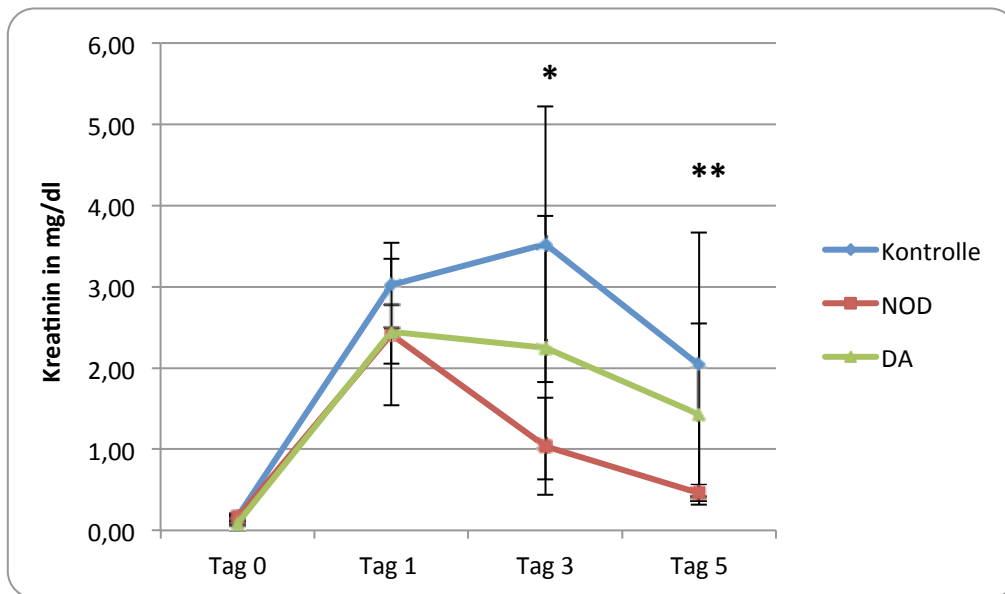


Abb. 14: Verlauf des Kreatininwertes im Gruppenvergleich bis 5 Tage postoperativ; Tag 3: * $p = 0,0157$, Tag 5: ** $p = 0,0083$ (Kruskal – Wallis – Test)

Tab. 2: Übersicht der mittleren Kreatininwerte in mg/dl an Tag 0 präoperativ bis 5 Tage nach akutem Nierenversagen

Gruppe	Tag 0	Tag 1	Tag 3	Tag 5
Kontrolle	0,17	3,02	3,52	2,04
Dopamin	0,09	2,44	2,25	1,43
NOD	0,16	2,42	1,04	0,46

Tab. 3: Statistische Signifikanzen der Kreatininwerte im Gruppenvergleich über 5 Tage mittels Kruskal – Wallis – Test

	<i>Tag 1</i>	<i>Tag 3</i>	<i>Tag 5</i>
<i>Gruppenvergleich</i>	p = 0,0888	p = 0,0157	p = 0,0083

Tab. 4: Statistische Signifikanzen der Kreatininwerte im direkten gruppenweisen Vergleich über 5 Tage mittels Kruskal – Wallis – Test

<i>gruppenweiser Vergleich</i>	<i>Tag 1</i>	<i>Tag 3</i>	<i>Tag 5</i>
NOD vs. Kontrolle	nicht signifikant	p = 0,0038	p = 0,0032
NOD vs. Dopamin	nicht signifikant	p = 0,2069	p = 0,0403
Dopamin vs. Kontrolle	nicht signifikant	p = 0,1893	p = 0,4309

4.1.2.2. Harnstoff

Die Blutabnahme zur Bestimmung des Harnstoffwertes wurde wie bei Kreatinin beschrieben durchgeführt. Die durchschnittlichen Harnstoffwerte sind in Tab. 5 zusammenfassend dargestellt. In der Kontroll - und der DA - Gruppe zeigte sich in der Übersicht ein kontinuierlicher Anstieg des Harnstoffwertes bis zum 3. Tag (Kontrolle: 503,05 ± 231,94 mg/dl; DA: 375,15 ± 252,94 mg/dl) nach Induktion des akuten Nierenversagens. Nur in der NOD - Gruppe ist der höchste Punkt des Harnstoffanstieges bereits an Tag 1 erreicht (274,23 ± 24,14 mg/dl), bevor es anschließend wieder zu einer Senkung des Wertes kommt (Abb. 15). Im Gruppenvergleich zeigte sich signifikanter Unterschied zwischen den Harnstoffwerten der jeweiligen Gruppen an Tag 3 (Kontrolle: 503,05 ± 231,94 mg/dl, NOD: 198,11 ± 106,64 mg/dl, DA: 375,15 ± 252,94 mg/dl; p = 0,0427[#]) und an Tag 5 (Kontrolle: 387,44 ± 293,78 mg/dl, NOD: 89,75 ± 32,69 mg/dl, DA: 307,88 ± 250,43 mg/dl; p = 0,0064^{*}). In der gruppenweisen Betrachtung an Tag 3 konnte eine Signifikanz im Unterschied zwischen der NOD - und der Kontrollgruppe dargestellt werden (p = 0,0101). Alle weiteren

4. Ergebnisse

Vergleichen erwiesen sich als nicht signifikant zu diesem Beobachtungszeitpunkt (Kontrolle > DA: $p = 0,3184$; NOD > DA: $p = 0,2701$).

An Tag 5 war der Unterschied zwischen der Kontroll - und der DA - Gruppe statistisch betrachtet nicht unterschiedlich ($p = 0,4948$), während die Unterschiede im Harnstoffanstieg zwischen der NOD - und DA - Gruppe sowie zwischen NOD - und Kontrollgruppe signifikant waren (NOD > DA: $p = 0,0136$; NOD > Kontrolle: $p = 0,0054$). Es zeigt sich also auch hier, dass sich die Nierenfunktion bei den NOD behandelten Tieren signifikant schneller erholte. In den Tabellen 6 - 7 sind diese Zusammenhänge zusammenfassend dargestellt.

Tab. 5: Übersicht der mittleren Harnstoffwerte in mg/dl an Tag 0 präoperativ bis 5 Tage nach akutem Nierenversagen

Gruppe	Tag 0	Tag 1	Tag 3	Tag 5
Kontrolle	40,94	280,25	503,05	387,44
Dopamin	37,03	274,23	198,11	89,75
NOD	37,70	283,85	375,15	307,88

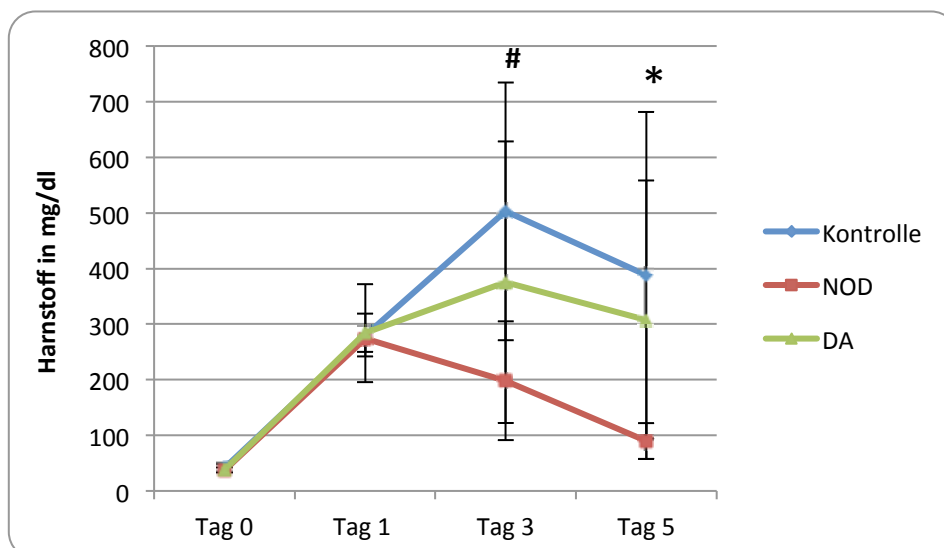


Abb. 15: Verlauf des Harnstoffwertes im Gruppenvergleich bis 5 Tage postoperativ; Tag 3: $p = 0,0427$ #, Tag 5: $p = 0,0064$ * (Kruskal – Wallis – Test)

Tab. 6: Statistische Signifikanzen der Harnstoffwerte im Gruppenvergleich über 5 Tage mittels Kruskal – Wallis – Test

	<i>Tag 1</i>	<i>Tag 3</i>	<i>Tag 5</i>
<i>Gruppenvergleich</i>	p = 0,5381	p = 0,0427	p = 0,0064

Tab. 7: Statistische Signifikanzen der Harnstoffwerte im direkten gruppenweisen Vergleich über 5 Tage mittels Kruskal – Wallis – Test

<i>gruppenweiser Vergleich</i>	<i>Tag 1</i>	<i>Tag 3</i>	<i>Tag 5</i>
NOD vs. Kontrolle	nicht signifikant	p = 0,0101	p = 0,0054
NOD vs. Dopamin	nicht signifikant	p = 0,2701	p = 0,0136
Dopamin vs. Kontrolle	nicht signifikant	p = 0,3184	p = 0,4948

4.1.3. Renale Inflammation

Nach Beendigung des Beobachtungszeitraumes von 5 Tagen und sich anschließender Nierenentnahme sowie Konservierung in Formalin wurden histologische Schnitte angefertigt und immunhistochemisch gefärbt. Die Auswertung der Immunhistochemie erfolgte durch die Prüfung von 10 Gesichtsfeldern pro Schnitt (400 – fache Vergrößerung) auf die Anzahl der ED1 - positiven Zellen.

4.1.3.1. ED1 - Färbung (Makrophagen)

In den Nieren der NOD - Behandlungsgruppe kam es zu einem geringeren Anstieg der Infiltration mit Makrophagen im Vergleich zu der Kontrollgruppe und der DA - Gruppe (durchschnittliche Anzahl ED1 - positiven Zellen pro Gesichtsfeld: NOD - $23,1 \pm 8,77$ Zellen; Kontrolle - $33,7 \pm 12,37$ Zellen, DA - $37,0 \pm 12,52$ Zellen). Dieser Unterschied alle Gruppen betrachtend ist hoch signifikant ($p = 0,0001$). Im gruppenweisen Vergleich wird deutlich, dass sich die renale Infiltration zwischen den Gruppen Dopamin und NOD ($p = 0,0001$ *) sowie zwischen Kontrollgruppe und der NOD - Gruppe ($p = 0,002$ #) signifikant unterscheidet (Abb. 16).

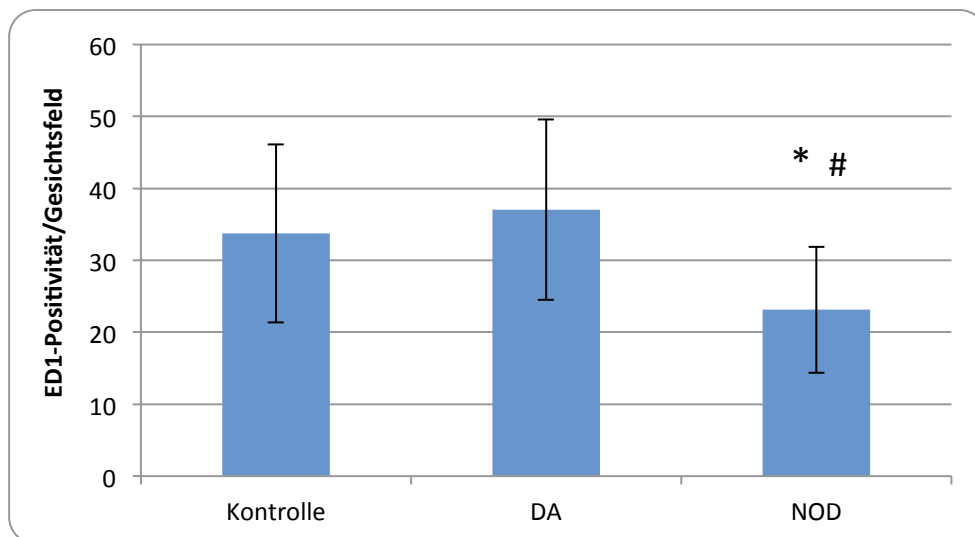


Abb. 16: Durchschnittliche ED1 - Positivität je Gesichtsfeld im Gruppenvergleich nach akutem Nierenversagen; NOD > Kontrolle: $p = 0,002$ #, NOD > DA: $p = 0,0001$ * (Tukey – Kramer – HSD – Test)

4.2. Organfunktion nach Empfängerbehandlung im akuten Transplantationsmodell

4.2.1. Körpergewichte

Die Körpergewichte wurden jeweils präoperativ sowie ein zweites Mal nach 7 Tage zum Ende des Beobachtungszeitraumes dokumentiert. In der NOD - Gruppe zeigte sich die geringste Veränderung der Körpergewichte mit durchschnittlich 23,7 g. In der DA - Gruppe nahmen die Tiere durchschnittlich 26,8 g und in der Kontrollgruppe zeigte sich deutlich der größte Gewichtsverlust von 34,3 g. Die Unterschiede in den Gewichtsverlusten sind jedoch statistisch nicht signifikant ($p = 0,1042$).

4.2.2. Nierenfunktion

Die retrobulbären Blutabnahmen zur Bestimmung der Nierenfunktionsparameter Kreatinin und Harnstoff (angegeben in mg/dl) wurden durchgeführt an Tag 0 vor Beginn der Transplantation sowie postoperativ an Tag 1, 3, 5 und 7. Die Entnahme an Tag 0 erfolgte zur Dokumentation der initialen physiologischen Nierenfunktion.

4.2.2.1. Kreatinin

Der Verlauf des Kreatininwertes wies in allen Behandlungsgruppen ein typisches Muster auf. So stieg das Kreatinin ein Tag nach Transplantation bei jedem Tier deutlich an und blieb auf einem hohen Niveau bis mindestens Tag 3, bevor es anschließend bis zum Tag 7 nach der Transplantation wieder auf einen beinahe physiologischen Kreatininwert von $< 0,8$ mg/dl absank. In Tab. 8 sind die durchschnittlichen Kreatininwerte je Behandlungsgruppe im Vergleich dargestellt. Dabei lässt sich zwar die Tendenz zu einer verbesserten Nierenfunktion in der NOD - Gruppe ab Tag 1 nach Transplantation erkennen, die sich in folgenden Tagen fortsetzt. Statistisch signifikant sind die Unterschiede zwischen den durchschnittlichen Nierenfunktionswerten im Gruppenvergleich aber zu keinem Zeitpunkt der Beobachtung (Tab. 9).

Tab. 8: Übersicht der Kreatininwerte nach Nierentransplantation bis 7 Tage postoperativ

Gruppe	Tag 0	Tag 1	Tag 3	Tag 5	Tag 7
Kontrolle	0,17	2,70	1,87	0,87	0,56
# DA	0,16	2,58	1,94	0,87	0,68
NOD	0,16	2,49	1,32	0,69	0,47

Tab. 9: Statistische Signifikanzen der Kreatininwerte im Gruppenvergleich bis 7 Tage nach Nierentransplantation (Kruskal – Wallis – Test)

	<i>Tag 1</i>	<i>Tag 3</i>	<i>Tag 5</i>	<i>Tag 7</i>
<i>Gruppenvergleich</i>	p = 0,7618	p = 0,2364	p = 0,6606	p = 0,1432

4.2.2.2. Harnstoff

Der Verlauf der Harnstoffwerte über 7 Tage nach Nierentransplantation ist simultan zum Verlauf des Kreatininwertes. Auch hier zeigt ein Anstieg des Harnstoffwertes bis zum Tag 3 postoperativ bis es im Anschluss wieder zu einem Absinken kommt. Lediglich in der NOD - Gruppe erfolgt die Senkung des Harnstoffwertes bereits nach Tag 1. Tab. 10 fasst die Harnstoffwerte in der Übersicht zusammen. Die Unterschiede zwischen den Harnstoffwerten sind ebenso zu keinem Messzeitpunkt statistisch signifikant (Tab. 11).

Tab. 10: Übersicht der Harnstoffwerte nach Nierentransplantation bis 7 Tage postoperativ

Gruppe	Tag 0	Tag 1	Tag 3	Tag 5	Tag 7
Kontrolle	34,64	281,36	286,18	138,82	78,91
DA	36,25	298,88	318,50	163,88	90,75
NOD	37,22	298,56	232,56	125,33	81,00

Tab. 11: Statistische Signifikanzen der Harnstoffwerte im Gruppenvergleich bis 7 Tage nach Nierentransplantation (Kruskal – Wallis – Test)

	<i>Tag 1</i>	<i>Tag 3</i>	<i>Tag 5</i>	<i>Tag 7</i>
<i>Gruppenvergleich</i>	p = 0,2059	p = 0,4826	p = 0,6462	p = 0,8292

4.2.3. Renale Inflammation

Im akuten Transplantationsmodell wurden den Transplantatempfänger nach einer Beobachtungszeit von 7 Tagen nach Nierentransplantation die transplantierten Nieren entnommen. Nach Fixierung in Formalin und Einbettung in Paraffin wurden histologische Schnitte angefertigt. Neben der H&E - Färbung wurden die Schnitte immunhistochemisch gefärbt. Zur Prüfung der ED1 - sowie MHC II - Positivität wurden jeweils 10 Gesichtsfelder je Schnitt ausgewertet und die Positivität in $\mu\text{m}^2/\text{Fläche}$ bzw. in Prozent angegeben.

4.2.3.1. ED1 - Färbung

Die Infiltration mit Makrophagen ist nach der Behandlung mit Dopamin im Vergleich zur Kontroll- und NOD - Behandlungsgruppe deutlich reduziert (DA: $8400,72 \pm 3415,00/\mu\text{m}^2$ bzw. $2,19 \pm 0,89 \%$; NOD: $11834,74 \pm 5569,18/\mu\text{m}^2$ bzw. $3,09 \pm 1,45 \%$; Kontrolle: $13134,23 \pm 6378,95/\mu\text{m}^2$ bzw. $3,43 \pm 1,66 \%$) und ist hoch signifikant (DA > NOD: $p < 0,0001 *$; DA > Kontrolle: $p < 0,0001 **$). Die Kontroll- und NOD - Behandlungsgruppe wiesen vergleichend keinen signifikanten Unterschied auf ($p = 0,5267$). Abb. 17 zeigt die durchschnittliche Infiltration der Nieren mit Makrophagen dargestellt in der ED1 - Positivität.

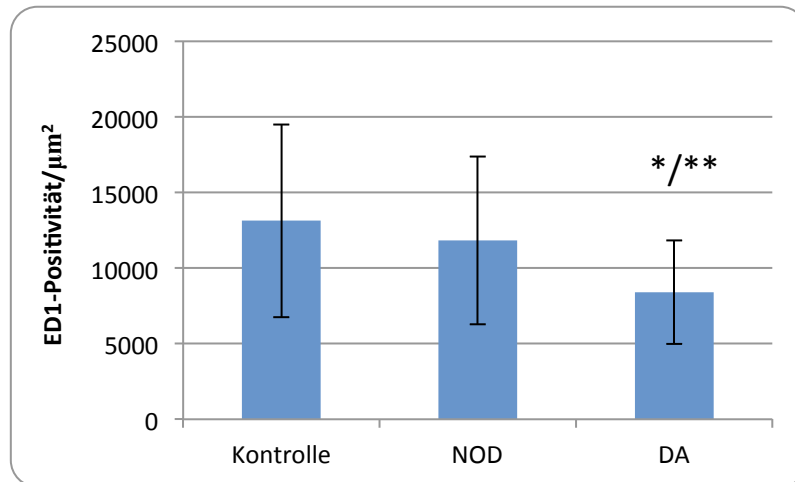


Abb. 17: Durchschnittliche ED1- Positivität/µm² im Gruppenvergleich nach akuter Transplantation; DA > NOD: p < 0,0001 *, DA > Kontrolle: p < 0,0001 (Kruskal – Wallis – Test)**

4.2.3.2. MHC II - Färbung

Nach Behandlung mit NOD zeigte sich eine signifikant geringere Infiltration mit MHC II - positiven Zellen im Vergleich zur DA - Behandlungsgruppe (NOD ($3656,83 \pm 2080,21/\mu\text{m}^2$) > DA ($7571,43 \pm 3890,92/\mu\text{m}^2$): p < 0,0001 *). Auch der Vergleich zwischen der Kontroll- ($5038,27 \pm 4954,84/\mu\text{m}^2$) und der DA - Gruppe zeigte eine signifikant verminderte MHC II-Positivität in der Kontrollgruppe (p < 0,0001 **). Zwischen der NOD- und der Kontrollgruppen zeigten sich keine Unterschiede in der Infiltration (p = 0,0726). Abb. 18 stellt die durchschnittliche MHC II - Positivität im Gruppenvergleich dar.

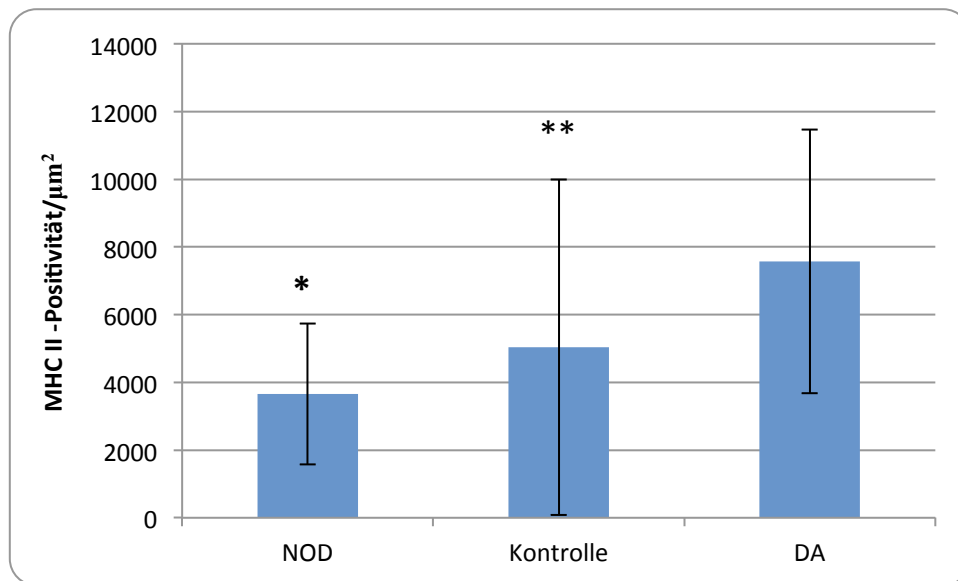


Abb. 18: Durchschnittliche MHC II - Positivität/ μm^2 im Gruppenvergleich nach akuter Transplantation; NOD > DA: $p < 0,0001$ *, Kontrolle > DA: $p < 0,0001$ ** (Kruskal – Wallis – Test)

4.3. Empfängerbehandlung und akute Abstoßung

4.3.1. Banff - Klassifikation

Zur Bestimmung der Ausprägung der akuten Transplantatabstoßung nach der Banff - Klassifikation wurden final die transplantierten Nieren entnommen und konserviert sowie histologische Schnitte angefertigt. Die Beurteilung nach der Banff - Klassifikation erfolgte auf einem H&E-Schnitt. Tab. 12 zeigt die Ergebnisse der Banff - Klassifikation nach Nierentransplantation mit akuter Abstoßungsreaktion.

Tab. 12: Banff - Klassifikation zur Beurteilung der akuten Abstoßung nach Nierentransplantation; Darstellung erfolgt in absoluten Zahlen und in Prozentwerten in Klammern (I = interstitielle Zellinfiltration, T = Tubulitis, V = Vaskulitis)

<i>BANFF-KRITERIUM</i>	<i>KONTROLLGRUPPE</i>	<i>DOPAMIN-GRUPPE</i>	<i>NOD - GRUPPE</i>
I0	-	-	-
I1	-	-	-
I2	-	-	-
I3	9 (100)	8 (100)	9 (100)
T0	-	-	-
T1	-	-	-
T2	9 (100)	8 (100)	9 (100)
T3	-	-	-
V0	3 (33)	5 (62)	2 (22)
V1	5 (56)	3 (38)	7 (78)
V2	1 (11)	-	-
V3	-	-	-

Die Auswertung der Banff - Klassifikation in Hinblick auf die akute Abstoßung unter Anwendung des Fisher - Exact - Tests zeigte in Bezug auf die Infiltration mit Entzündungszellen im Interstitium sowie bei den Tubulitiden keinerlei Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen. In allen Gruppen wurde eine Zellinfiltration von mehr als 50 % des Nierengewebes sowie eine moderate Tubulitis diagnostiziert. Unterschiede zwischen den Gruppen ließen sich bei der Beurteilung der Schwere einer vorhandenen Vaskulitis feststellen. In ein Drittel der Niere der Kontrollgruppe wurden keine Vaskulitiden gefunden (Grad 0). Eine milde Vaskulitis zeigte sich in 56 % der Fälle und in einer Niere eine moderate Vaskulitis. In der DA - Gruppe waren größtenteils keine Vaskulitiden vorhanden (62 %) bzw. in 38 % eine milde Form. Die NOD - Gruppe wies im Gegensatz dazu vermehrt die milde Form der Vaskulitis auf (Grad 1 zu 78 %) und in nur 22 % der Niere fehlten Anzeichen einer Vaskulitis.

Der Tab. 12 entnehmend wird deutlich, dass es in Bezug auf die zelluläre Infiltration sowie im Bereich der Tubulitis zwischen den Gruppen keinerlei signifikante Unterschiede gab. Bei der Auswertung der Vaskulitiden ergab sich zwar eine Tendenz in der DA - Gruppe aufgrund einer nicht vorliegenden Vaskulitis in mehr als 60 %, diese Unterschiede konnte jedoch statistisch nicht als signifikant nachgewiesen werden.

4.4. Organfunktion nach Empfängerbehandlung im chronischen Transplantationsmodell

4.4.1. Nierenfunktion

Zur Bestimmung der Nierenfunktion mittels Kreatinin und Harnstoff wurden den Tieren an Tag 0, in der 4. Woche nach Transplantation und anschließend alle 2 Wochen bis zur 14. Woche nach Transplantation Blut retrobulbär entnommen.

Die Blutparameter sollen den Zusammenhang der Nierenfunktion nach Transplantation nach einem längeren Zeitraum (14 Wochen) darstellen und somit die Wirkung von physiologischer Kochsalzlösung, Dopamin und NOD vergleichend zeigen.

4.4.1.1. Kreatinin

Nach einem Beobachtungszeitraum von 14 Wochen nach Nierentransplantation sind zu keinem Zeitpunkt der Messung die Kreatininwerte zwischen den Gruppen signifikant unterschiedlich (Kruskal – Wallis – Test: 4. Woche: $p = 0,327$; 6. Woche: $p = 0,2054$; 8. Woche: $p = 0,1452$; 10. Woche: $p = 0,613$; 12. Woche: $p = 0,3307$; 14. Woche: $p = 0,1526$) (Abb. 19), weshalb auch der gruppenweise Vergleich der Kreatininwerte unbeachtet bleibt. Die Behandlung der Empfänger mit NOD, Dopamin oder NaCl führt auf lange Sicht zu einer vergleichbaren Wirkung.

Tab. 13 zeigt zusammenfassend die durchschnittlichen Kreatininwerte je Woche mit Hinweis auf die jeweilige Stichprobengröße. Die unterschiedlichen Stichprobengrößen ergeben sich durch Ausscheiden von Organempfängern durch Transplantatversagen während des Beobachtungszeitraumes.

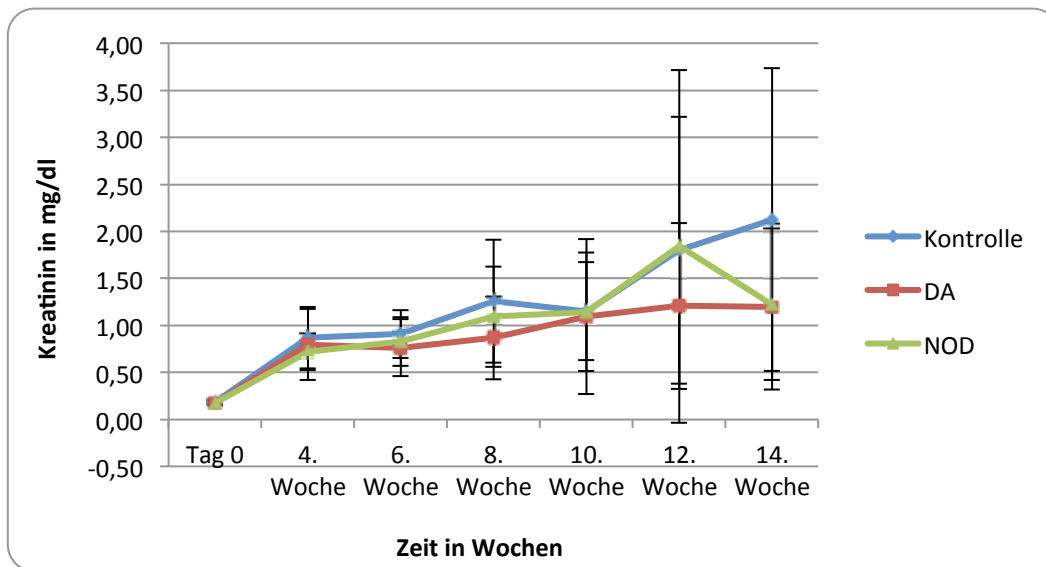


Abb. 19: Verlauf des Kreatininwertes im Gruppenvergleich bis 14 Wochen postoperativ

Tab. 13: Übersicht der Kreatininwerte in mg/dl über 14 Wochen nach Nierentransplantation

Gruppe	Woche 4	Woche 6	Woche 8	Woche 10	Woche 12	Woche 14
Kontrolle	0,87 (n = 13)	0,91 (n = 13)	1,26 (n = 13)	1,15 (n = 10)	1,80 (n = 10)	2,13 (n = 9)
Dopamin	0,80 (n = 13)	0,76 (n = 13)	0,87 (n = 13)	1,09 (n = 12)	1,21 (n = 11)	1,20 (n = 9)
NOD	0,72 (n = 14)	0,83 (n = 14)	1,09 (n = 14)	1,14 (n = 10)	1,84 (n = 9)	1,23 (n = 7)

4.4.1.2 Harnstoff

Die Unterschiede der Harnstoffwerte in den Gruppen sind über den gesamten Zeitraum betrachtet zu keinem Messzeitpunkt signifikant unterschiedlich (Kruskal – Wallis – Test: 4. Woche: $p = 0,5737$; 6. Woche: $p = 0,3355$; 8. Woche: $p = 0,2352$; 10. Woche: $p = 0,4629$; 12. Woche: $p = 0,5135$, 14. Woche: $p = 0,1606$) (Abb. 20). Die Empfängerbehandlung mit NOD, Dopamin oder NaCl führt daher zu vergleichbaren Werten. Ein gruppenweiser Vergleich wurde daher nicht durchgeführt. Tab. 14 zeigt vergleichend die durchschnittlichen Harnstoffwerte über den gesamten Beobachtungszeitraum nach Transplantation.

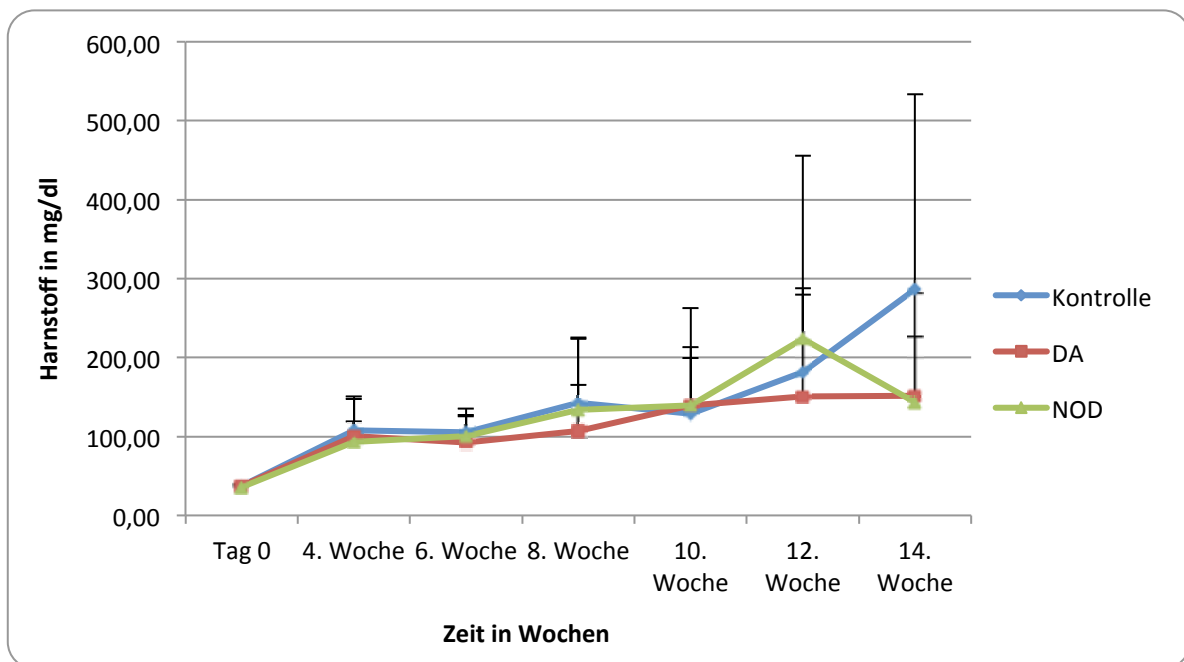


Abb. 20: Verlauf des Harnstoffwertes im Gruppenvergleich bis 14 Wochen postoperativ

Tab. 14: Übersicht der Harnstoffwerte in mg/dl über 14 Wochen nach Nierentransplantation

Gruppe	Woche 4	Woche 6	Woche 8	Woche 10	Woche 12	Woche 14
Kontrolle	107,69 (n = 13)	105,23 (n = 13)	142,92 (n = 13)	128,70 (n = 10)	181,20 (n = 10)	286,22 (n = 9)
Dopamin	100,85 (n = 13)	92,62 (n = 13)	107,15 (n = 13)	139,75 (n = 12)	150,55 (n = 11)	151,22 (n = 9)
NOD	92,86 (n = 14)	100,79 (n = 14)	133,93 (n = 14)	139,70 (n = 10)	224,11 (n = 9)	143,29 (n = 7)

4.4.1.3 Nierenclearance

Die renale Clearance wurde unter Anwendung folgender Formel berechnet:

$$C_{\text{Kreatinin}} = \frac{\text{Urin}_{\text{Kreatinin}} \times \text{Harnvolumen in ml}}{\text{Plasma}_{\text{Kreatinin}} \times \text{Zeit in min}}$$

Die Berechnung – angegeben in ml/min – erfolgte simultan zu den anderen Nierenfunktionsparametern im Abstand von zwei Wochen beginnend 4 Wochen postoperativ über 14 Wochen. Die Nierenclearance ist als Übersicht in Tabelle 15 dargestellt.

Die renale Clearance über einen Beobachtungszeitraum von 8 Wochen ist zwischen den Gruppen nicht signifikant unterschiedlich (Kruskal – Wallis – Test: 4. Woche: $p = 0,2299$; 6. Woche: $p = 0,115$; 8. Woche: $p = 0,0941$). Zum Zeitpunkt 10 Wochen nach Transplantation zeigen die Empfängertiere einen signifikanten Unterschied in der Clearance ($p = 0,0374$). Im gruppenweisen Vergleich wird deutlich, dass die Tiere, die mit Dopamin behandelt worden sind eine höhere renale Clearance haben als die Kontrollgruppe. Im weiteren Verlauf der Beobachtung lassen sich keine signifikanten Unterschiede feststellen (12. Woche: $p = 0,3605$; 14. Woche: $p = 0,1879$)

Tab. 15: Übersicht über die durchschnittliche Nierenclearance der Behandlungsgruppen (in ml/min)

<i>Gruppe</i>	<i>4. Woche</i>	<i>6. Woche</i>	<i>8. Woche</i>	<i>10. Woche</i>	<i>12. Woche</i>	<i>14. Woche</i>
Kontrolle	0,59	0,69	0,53	0,56	0,47	0,35
DA	0,82	0,88	1,04	0,95	0,73	0,75
NOD	0,76	0,66	0,67	0,63	0,74	0,59

4.4.2. Renale Inflammation

Im chronischen Transplantationsmodell wurden 14 Wochen nach Nierentransplantation die transplantierten Nieren gewonnen und zur Konservierung in Formalin gebracht. Anschließend wurden histologische Schnitte zur Immunhistochemie angefertigt. Die Auswertung erfolgte wie bereits unter Punkt 4.2.3. beschrieben.

4.4.2.1. ED1 - Färbung (Makrophagen)

Die Infiltration mit Makrophagen im Nierengewebe ist nach Behandlung mit Dopamin im Vergleich zur Behandlung mit NOD und mit NaCl am höchsten (Dopamin: $7177,17 \pm 5502,77/\mu\text{m}^2$ bzw. $1,87 \pm 1,43 \%$; NOD: $4247,01 \pm 3828,46/\mu\text{m}^2$ bzw. $1,11 \pm 0,99 \%$; Kontrolle: $3933,22 \pm 3036,23/\mu\text{m}^2$ bzw. $1,03 \pm 0,79 \%$). Dieser Unterschied ist im Gruppenvergleich hoch signifikant ($p < 0,0001$). Im direkten gruppenweisen Vergleich zeigte sich, dass die geringere Infiltration der inflammatorischen Zellen in der NOD - Gruppe im Vergleich zur DA - Gruppe hoch signifikant ist ($p < 0,0001$ *). Selbiges konnte zwischen der Kontrollgruppe und der DA - Gruppe festgestellt werden ($p < 0,0001$ **) (Abb. 21). Die NOD- und die Kontrollgruppe unterscheiden sich statistisch nicht ($p = 0,9661$). Abb. 22a-c zeigt exemplarische Darstellung der ED1 - Färbung in den jeweiligen Behandlungsgruppen.

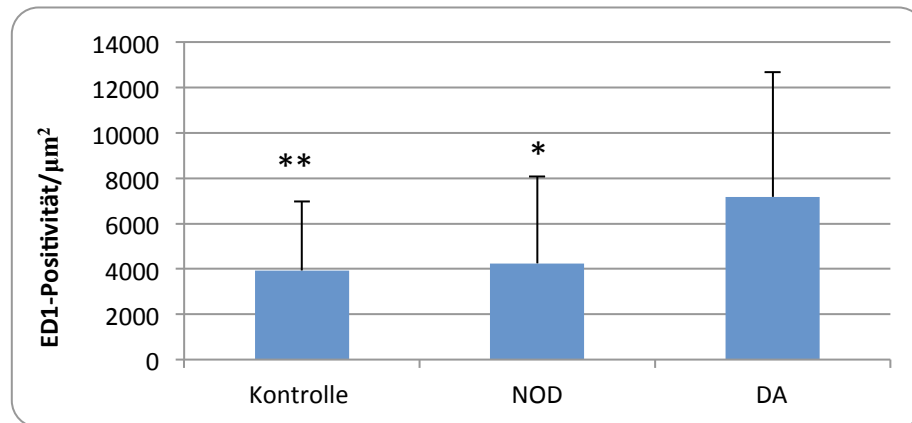


Abb. 21: Durchschnittliche ED1-Positivität/μm² im Gruppenvergleich nach chronischer Transplantation; NOD > DA: p < 0,0001 *, Kontrolle > DA: p < 0,0001** (Kruskal – Wallis – Test)

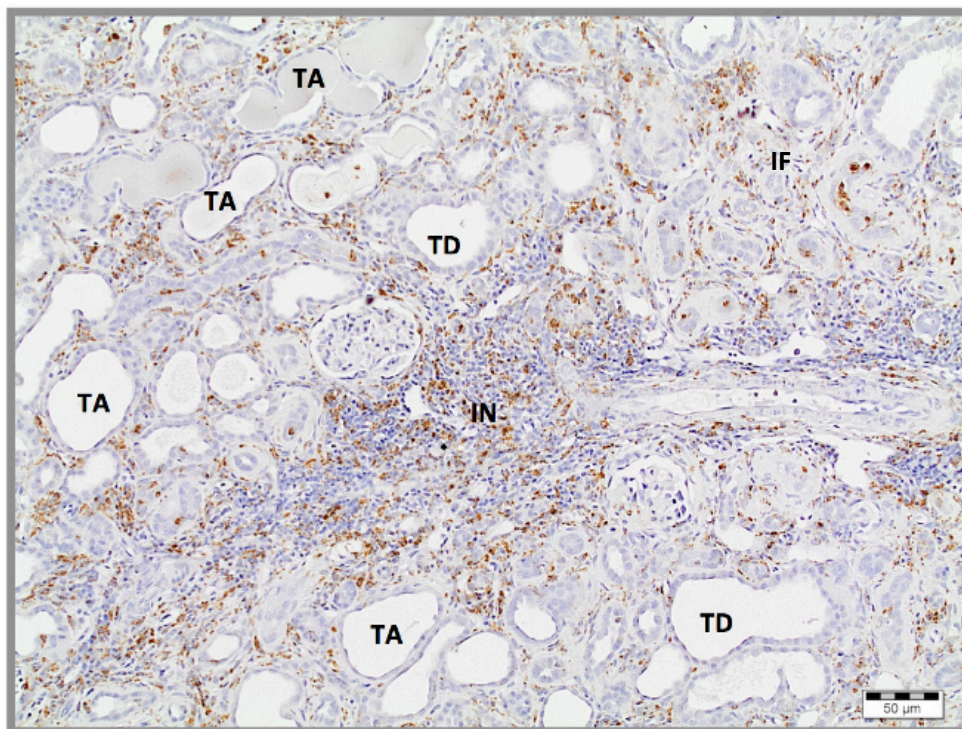


Abb. 22a: Niere, Ratte Nr. 6 aus Dopamin-Behandlungsgruppe, männlich, exemplarische Darstellung der ED1 - Färbung (TA = Tubulusatrophie; TD = Tubulusdilataation; IN = Infiltration mit Granulozyten und Makrophagen; IF = interstitielle Fibrose)

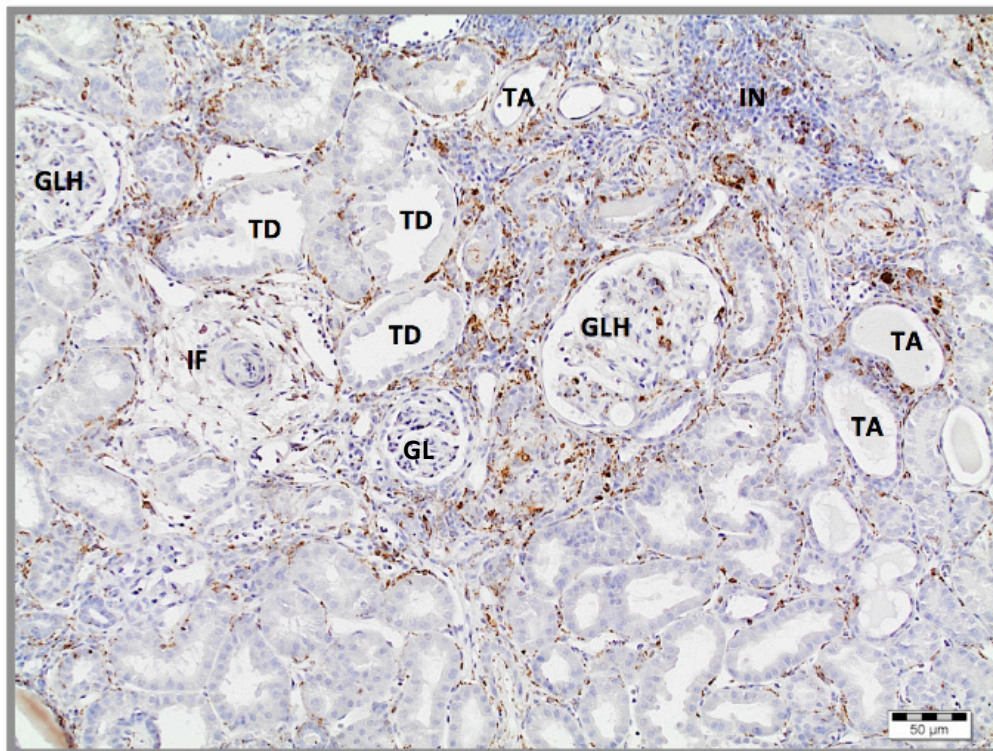


Abb. 22b: Niere, Ratte Nr. 8 aus NOD-Behandlungsgruppe, männlich, exemplarische Darstellung der ED1 - Färbung (TA = Tubulusatrophy; TD = Tubulusdilatation; IN = Infiltration mit Granulozyten und Makrophagen; GL = Glomerulus; GLH = glomeruläre Hypertrophie; IF = interstitielle Fibrose)

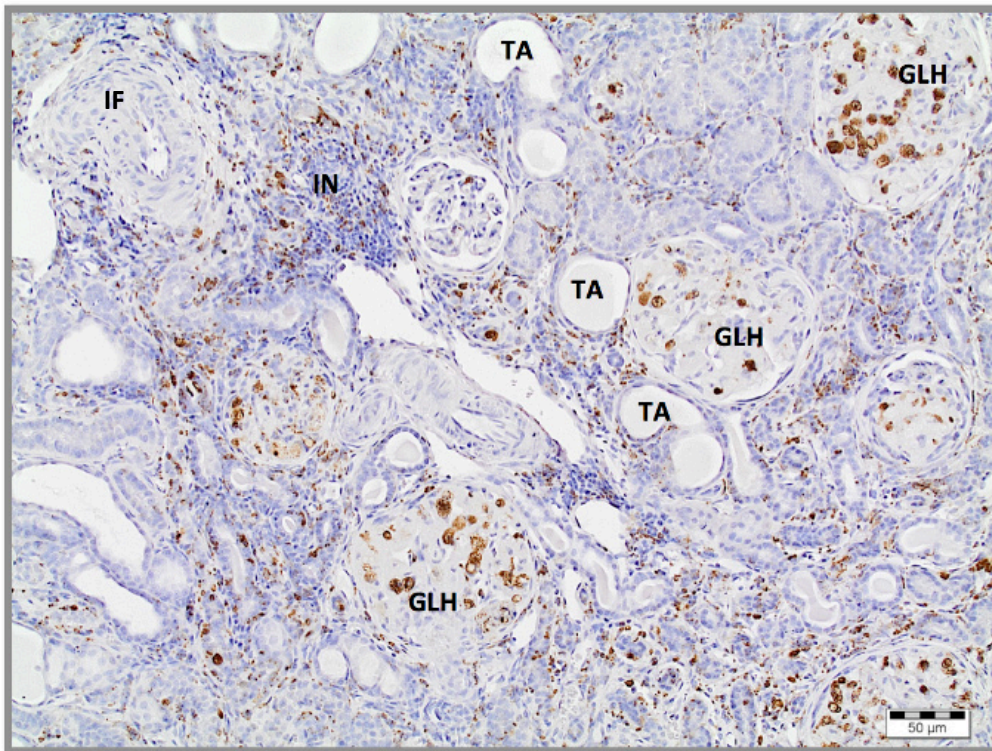


Abb. 22c: Niere, Ratte Nr. 3 aus Kontrollgruppe, männlich, exemplarische Darstellung der ED1 - Färbung (TA = Tubulusatrophie; IN = Infiltration mit Granulozyten und Makrophagen; GLH = glomeruläre Hypertrophie; IF = interstitielle Fibrose)

In allen angeführten exemplarischen Darstellungen der ED1 - Färbung sind zusätzlich noch weitere pathohistologische Befunde zu erheben. So zeigen alle immunhistologischen Bilder Tubulusatrophien (TA) sowie zusätzlich in Abb. 22a und 22b Tubulusdilatationen (TD). Letzteres ist gekennzeichnet durch ein noch erkennbares isoprismatisches Tubulusepithel, während bei einer Tubulusatrophie das Epithel deutlich abgeflacht ist. Weiterhin ist in allen Abbildungen eine vermehrte Infiltration mit Granulozyten und Makrophagen (IN) zu erkennen, die nicht über CD68 verfügen und somit nicht mittels ED1 angefärbt werden (beispielsweise Granulozyten). Im Interstitium ist weiterhin eine Fibrose (IF) vorhanden. Zusätzlich zu den genannten Befunden sind in Abb. 22b und 22c neben physiologischen Glomerula (GL) ebenso hypertrophierte Glomerula (GLH) zu sehen. Eine Hypertrophie beschreibt im Allgemeinen eine Größenzunahme durch Zellvergrößerung, welche beispielsweise als Kompensationsreaktion auftreten kann. In den Nieren kann es in Folge eines Nephronverlustes (z.B. durch unilaterale Nephrektomie) zu einer glomerulären Hypertrophie kommen (Hostetter 1995). Das vermeintlich prominente Zytoplasma in den Glomerula stellt vermutlich extrazellulär abgelagertes Amyloid dar, durch dessen Eigenfarbe das eigentliche Zytoplasma nicht mehr exakt darstellbar ist. Aufgrund von langanhaltender Antigenstimulation im hier vorliegenden chronischen Transplantationsmodell und der damit verbundenen Produktion von Immunglobulinen werden die von Makrophagen nicht vollständig abgebauten Proteine als Amyloid im Mesangium abgelagert. Besonders in Abb. 22c besteht der Verdacht einer reaktiven Amyloidose infolge chronischer entzündlicher Prozesse. Deutlich werden auch die ED1 - positiven Zellen, bei denen es sich folgerichtig um eingewanderte und aktivierte Mesangium - Makrophagen handelt.

4.4.2.2. MHC II-Färbung

Die Infiltration mit MHC II - positiven Zellen war in allen Behandlungsgruppen und der Kontrollgruppe gleich ausgeprägt. Es zeigte sich zwar eine Tendenz zur einer deutlich höheren Expression von MHC II - positiven Zellen in der NOD - Behandlungsgruppe (NOD: $11574,37 \pm 15643,63/\mu\text{m}^2$; Dopamin: $8928,31 \pm 11015,48/\mu\text{m}^2$; Kontrolle: $8906,83 \pm 10592,03/\mu\text{m}^2$), aber die Unterschiede konnten statistisch nicht als signifikant nachgewiesen werden ($p = 0,0779$). Deutlich erkennbar ist weiterhin, dass in allen untersuchten Gruppen eine sehr große Standardabweichung vorlag. In Abb. 23 ist die MHC II - Positivität je μm^2 für die jeweiligen Gruppen und die dazugehörige Standardabweichung graphisch dargestellt.

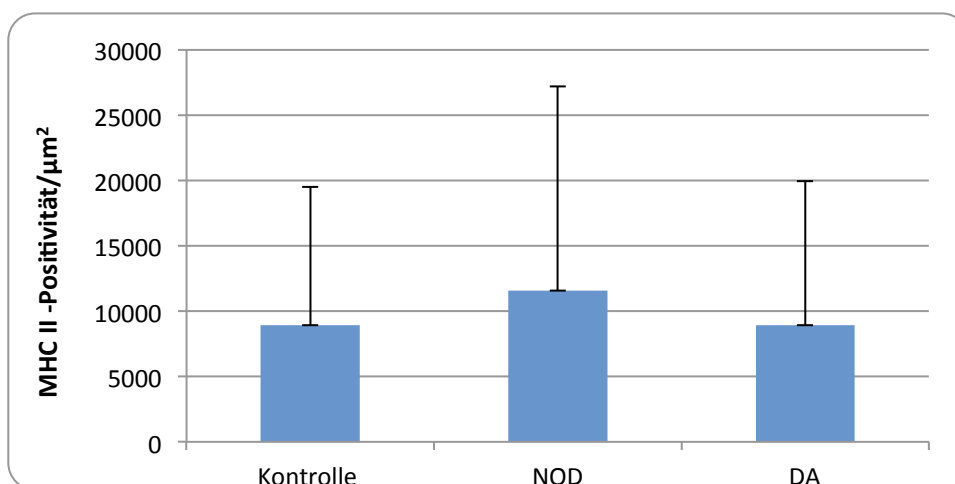


Abb. 23: Durchschnittliche Expression von MHC II - Positivität/ μm^2 im Gruppenvergleich nach chronischer Transplantation; $p = 0,0779$ (Kruskal – Wallis – Test)

4.4.3. Langzeitüberleben der Empfänger

In der Betrachtung des Langzeitüberlebens der Organempfänger wurde deutlich, dass in der NOD - Gruppe 50 % der Empfänger vor Beendigung des Beobachtungszeitraumes von 14 Wochen nach Transplantation durch Versterben oder Euthanasie ausgeschieden sind und damit im Vergleich das größte Ausscheiden darstellt. In der DA - Gruppe sind es 23,1 % und in der Kontrollgruppe 30,8 %. Obwohl das Überleben in der NOD - Gruppe im Vergleich deutlich geringer ist als in den anderen Behandlungsgruppen, ist dieser Unterschied in der Überlebenszeit nicht signifikant ($p = 0,3340$). Abb. 24 zeigt die dazugehörige Überlebensgrafik nach Kaplan - Meier.

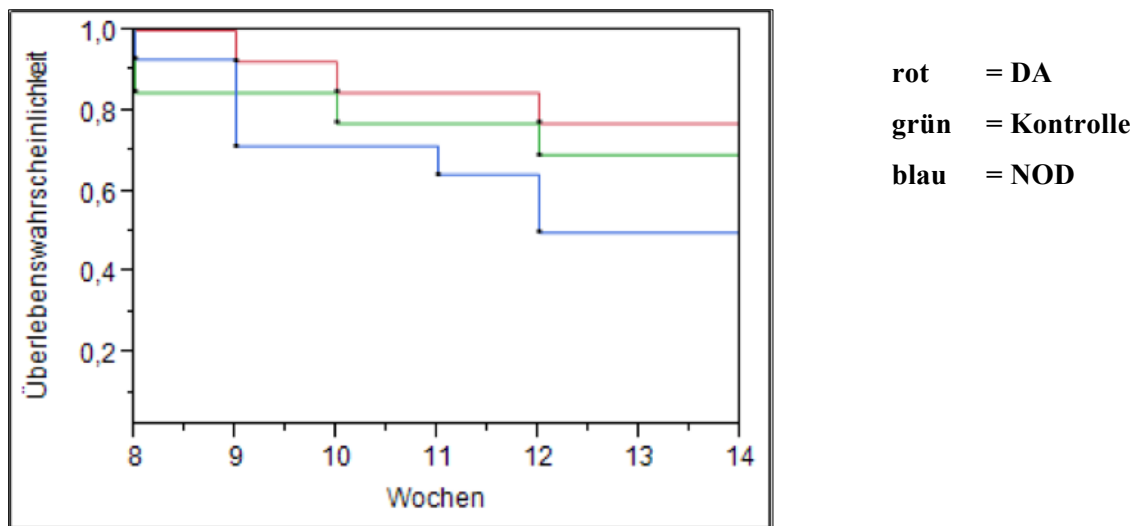


Abb. 24: Überlebensgrafik nach Kaplan - Meier als Übersicht im Gruppenvergleich

4.5. Empfängerbehandlung und chronische Abstoßung

4.5.1. Banff - Klassifikation

Zur Klassifizierung der chronischen Abstoßungsreaktion werden die interstitielle Infiltration mit Entzündungszellen sowie der Grad der Tubulitiden und Vaskulitiden herangezogen. Wie bei der akuten Abstoßung wird auch hier die Einteilung in 3 Schweregrade gewählt (Grad 0 = keine Veränderungen bis Grad 3 = ausgeprägte/schwere Veränderungen). Die Beurteilung und Auswertung der akuten Abstoßungsreaktion erfolgt simultan zum Vorgehen bei der akuten Transplantatabstoßung (Punkt 4.3.1). Nach der Aktualisierung der Banff - Kriterien im Jahre 2009 (Sis, Mengel et al. 2010) erfolgt die Klassifizierung der chronischen Abstoßungsreaktion nach folgender Einteilung:

- Grad 0 keine Veränderungen
- Grad I milde interstitielle Fibrose, Tubulusatrophie und Vaskulitis
(< 25 % der Rindenfläche)
- Grad II moderate interstitielle Fibrose, Tubulusatrophie und Vaskulitis
(< 26 – 50 % der Rindenfläche)
- Grad III schwere interstitielle Fibrose, Tubulusatrophie/-verlust und
Vaskulitis (> 50 % der Rindenfläche)

Zusätzlich wird noch der Grad der Vaskulitiden beurteilt. Tab. 16 zeigt jeweilige Ausprägung der Banff - Kriterien geordnet nach der jeweiligen Gruppe.

Tab. 16: Banff - Klassifikation zur Beurteilung der chronischen Abstoßung nach Nierentransplantation; Darstellung in absoluten Zahlen und in Prozentwerten in Klammern
(cI = chronische interstitielle Fibrose, cT = chronische Tubulusatrophie, cV = chronische Vaskulitiden mit Lumeneinengungen)

<i>BANFF-KRITERIUM</i>	<i>KONTROLLGRUPPE</i>	<i>DOPAMIN - GRUPPE</i>	<i>NOD - GRUPPE</i>
cI0	-	-	-
cI1	-	-	-
cI2	-	4 (33)	1(8)
cI3	12 (100)	8 (67)	12 (92)
cT0	-	-	-
cT1	-	4 (33)	1 (8)
cT2	6 (50)	5 (42)	11(84) *
cT3	6 (50)	3 (25)	1 (8)
cV0	-	-	-
cV1	6 (50)	8 (67)	10 (77)
cV2	6 (50)	4 (33)	3 (23)
cV3	-	-	-

Die Auswertung der Banff - Klassifikation mittels Fisher - Exact - Test zeigt, dass sich die NOD - Gruppe in Bezug auf die Schwere einer chronischen interstitiellen Fibrose nicht deutlich von der Kontrollgruppe unterscheidet, während in der DA - Gruppe die interstitielle Fibrose um ein Drittel milder ausfiel im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Schwere der chronischen Tubulusatrophie wurde in der Kontrollgruppe jeweils in 50 % der ausgewerteten Nieren mit Grad 2 sowie Grad 3 bewertet. In der DA - Gruppe zeigte sich zwar in einem Drittel der Nieren eine milde Tubulusatrophie (Grad 1) im Vergleich zur NOD - Gruppe (Grad 1 hier 8 %), dafür konnten aber auch in einem Viertel der Nieren eine schwere chronische Tubulusatrophie (Grad 3) festgestellt werden, während dieser Schweregrad nur bei 8 % der untersuchten Nieren in der NOD - Gruppe diagnostiziert wurde. In der NOD - Gruppe wurde hauptsächlich eine moderate chronische Tubulusatrophie (Grad 2 zu 84 %) festgestellt.

Bei der Beurteilung der Schwere der Vaskulitiden zeigten sich in allen Gruppen sowohl milde als auch moderate chronischen Vaskulitiden mit Lumeneinengungen. In der Kontrollgruppe konnte erneut zu 50 % Grad 1 und zu 50 % der Grad 2 diagnostiziert werden, während in der DA-Gruppe nur ein Drittel die moderate Form der Vaskulitis aufwies und zwei Drittel die milde Form. In der NOD - Gruppe war dieses Verhältnis etwa ein Viertel zu drei Viertel (Grad 2: 23 %, Grad 1: 77 %).

Zusammenfassend wird deutlich, dass die Schwere der Abstoßungsreaktionen der Nieren in den jeweiligen Gruppen sich zwar in der Tendenz unterscheiden, sich aber diese Unterschiede nicht als statistisch signifikant bewerten lassen. Lediglich in Bezug auf die Tubulitiden zeigte sich eine Signifikanz zwischen der NOD - und der Kontrollgruppe ($p = 0,047 *$). Die NOD - Gruppe zeigte hier vermehrt mildere Tubulitiden. Abb. 25 - 27 zeigen exemplarische Bilder der Kategorien mit den jeweiligen Schweregrade, die in dieser Studie beobachtet wurden.

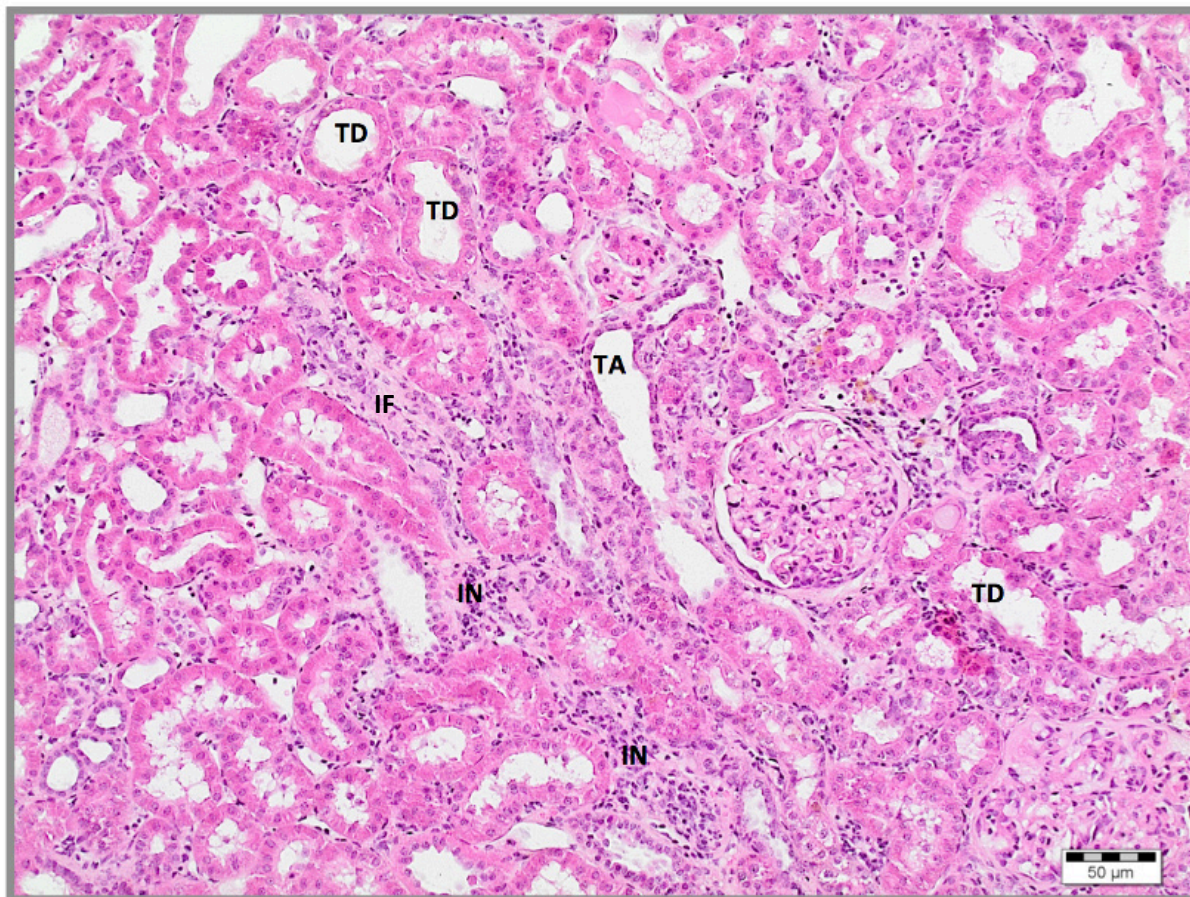


Abb. 25a: Niere, Ratte Nr. 4 aus Dopamin - Behandlungsgruppe, männlich, exemplarische Darstellung einer interstitiellen Fibrose Grad 2, H&E (TA = Tubulusatrophie; TD = Tubulusdilataation; IN = Infiltration mit Granulozyten und Makrophagen; IF = interstitielle Fibrose)

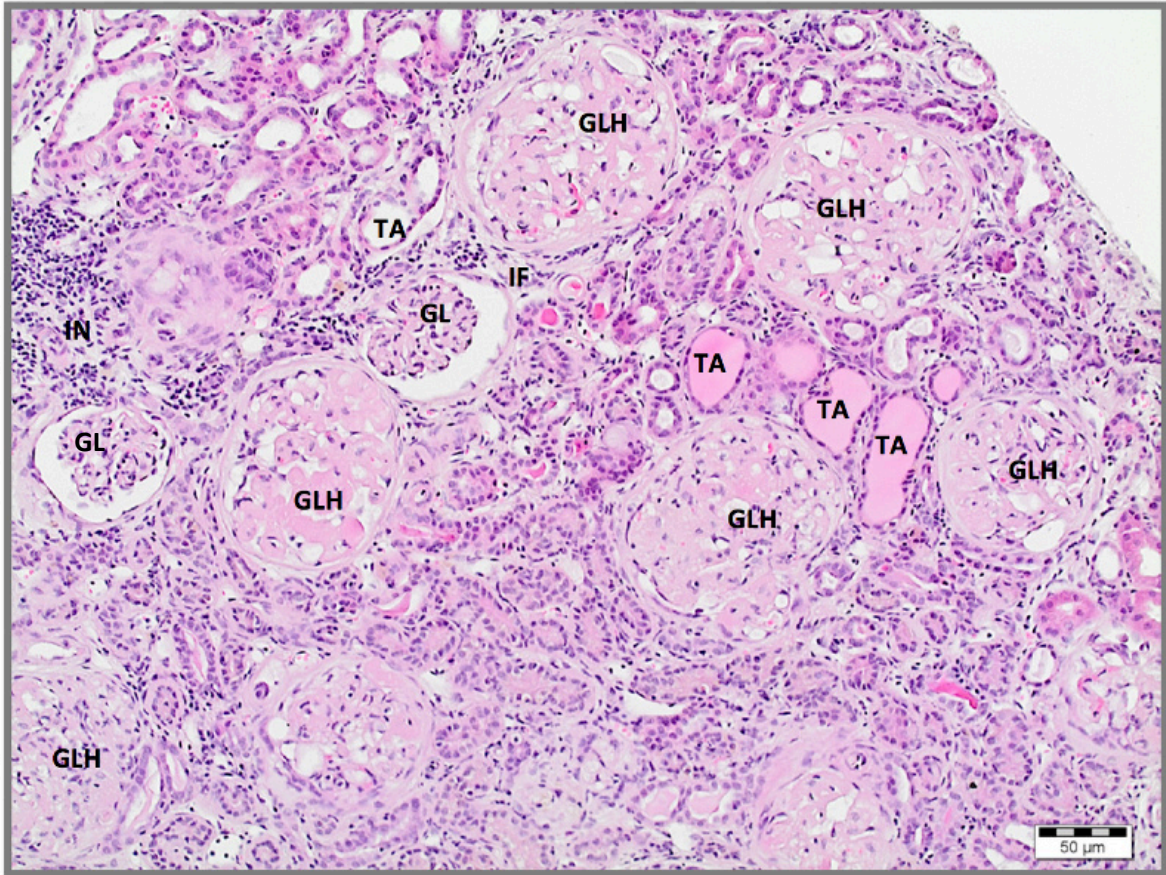


Abb. 25b: Niere, Ratte Nr. 13 aus Kontrollgruppe, männlich, exemplarische Darstellung einer interstitiellen Fibrose Grad 3; H&E (TA = Tubulusatrophie; GL = Glomerulus; GLH = glomeruläre Hypertrophie; IN = Infiltration mit Granulozyten und Makrophagen; IF = interstitielle Fibrose)

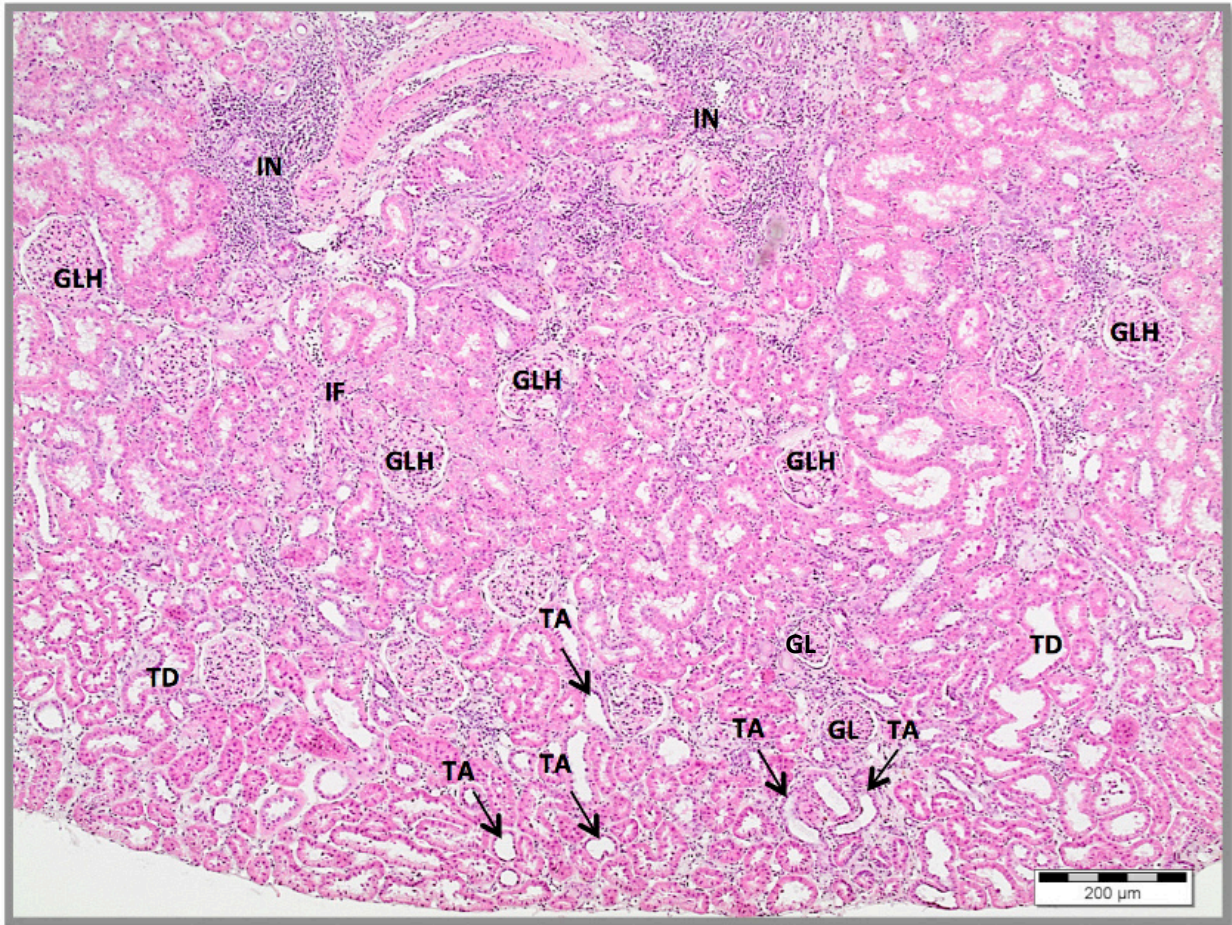


Abb. 26a: Niere, Ratte Nr. 20 Dopamin - Behandlungsgruppe, männlich, exemplarische Darstellung einer Tubulusatrophie Grad 1 (< 25 % der kortikalen Tubuli atrophiert), H&E
(TA = Tubulusatrophie; TD = Tubulusdilatation; GL = Glomerulus; GLH = glomeruläre Hypertrophie; IN = Infiltration mit Granulozyten und Makrophagen; IF = interstitielle Fibrose)

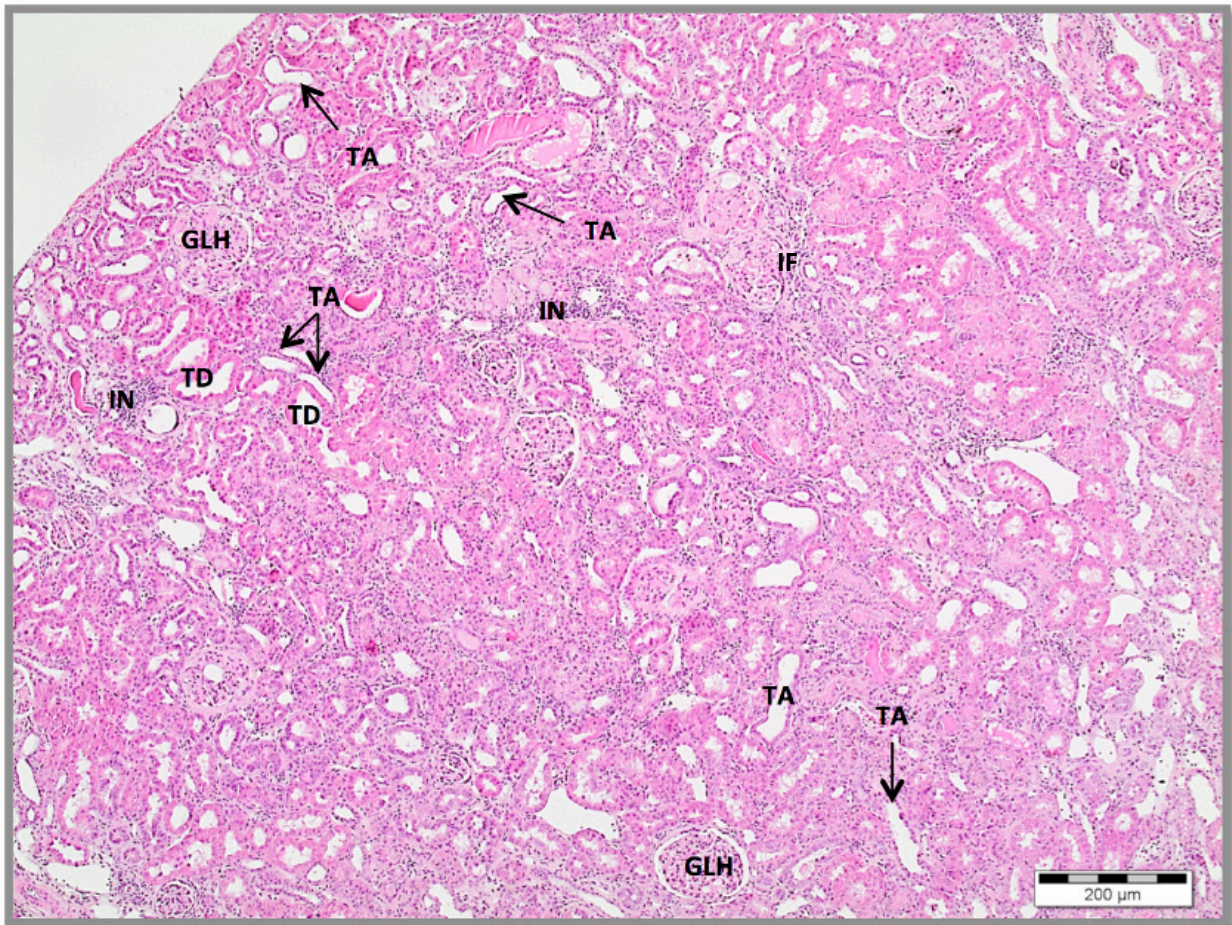


Abb. 26b: Niere, Ratte Nr. 10 Kontrollgruppe, männlich, exemplarische Darstellung einer Tubulusatrophie Grad 2 ($> 25\%$ - $< 50\%$ der kortikalen Tubuli atrophiert), H&E
(TA = Tubulusatrophie; TD = Tubulusdilataion; GLH = glomeruläre Hypertrophie; IN = Infiltration mit Granulozyten und Makrophagen; IF = interstitielle Fibrose)

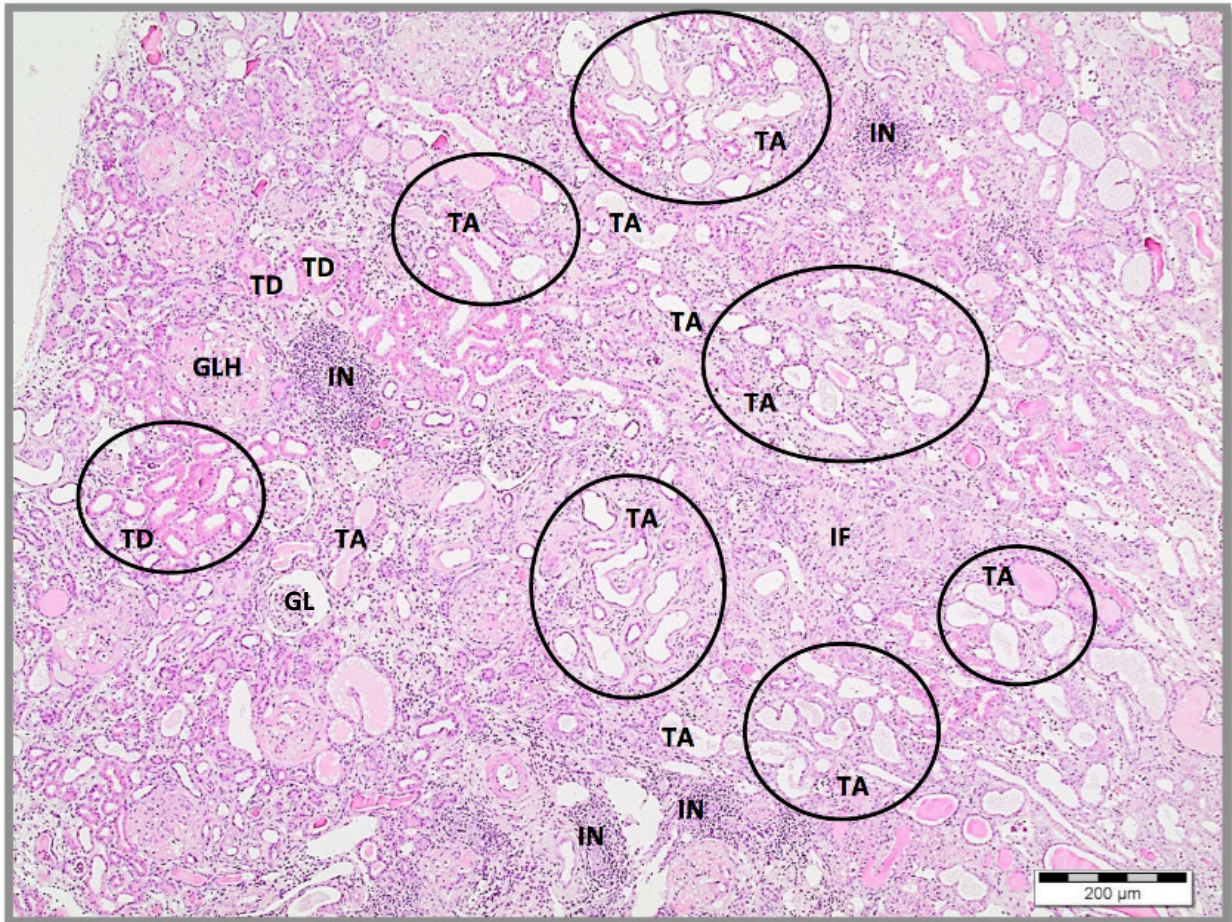


Abb. 26c: Niere, Ratte Nr. 8 Kontrollgruppe, männlich, exemplarische Darstellung einer Tubulusatrophie Grad 3 (> 50 % der kortikalen Tubuli atrophiert), H&E (TA = Tubulusatrophie; TD = Tubulusdilataion; GL = Glomerulus; GLH = glomeruläre Hypertrophie; IN = Infiltration mit Granulozyten und Makrophagen; IF = interstitielle Fibrose)

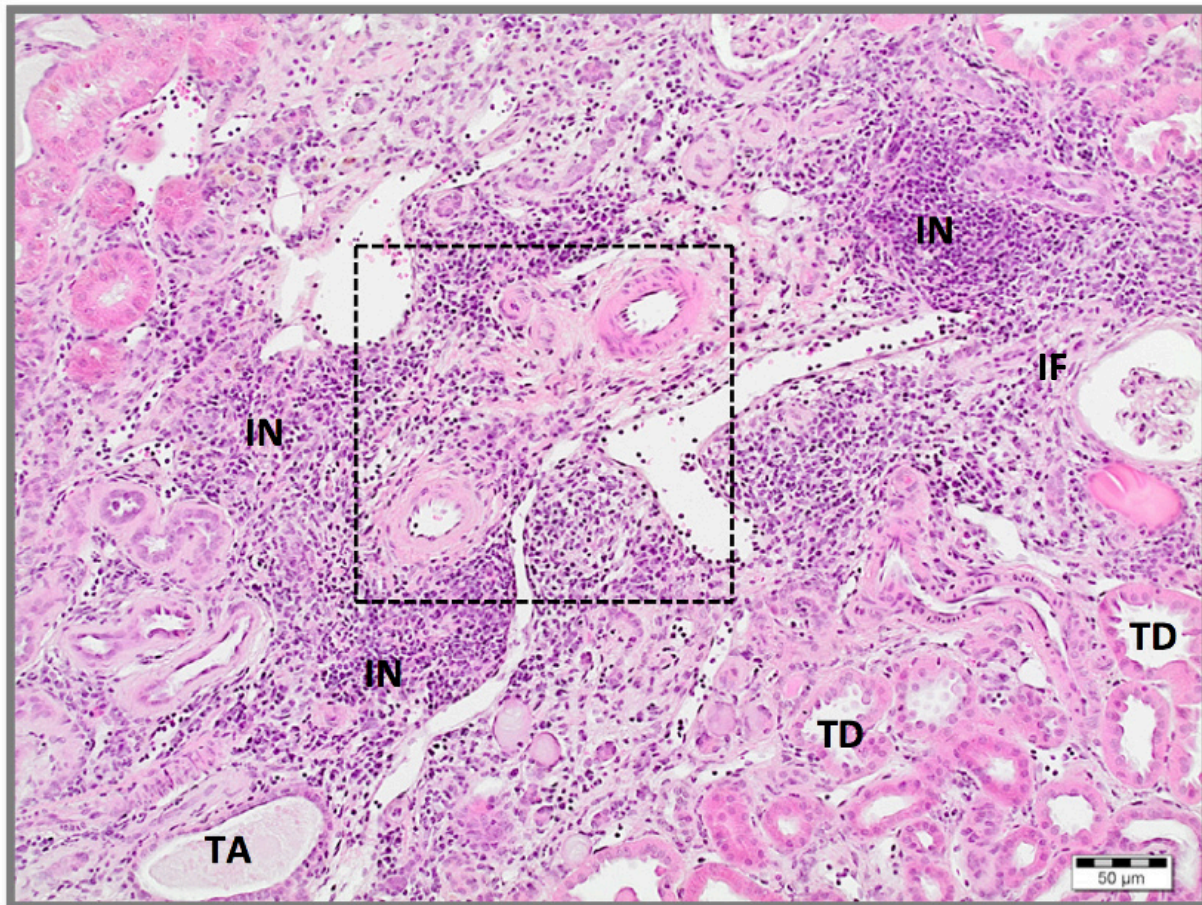


Abb. 27a: Niere, Ratte Nr. 8 aus NOD - Behandlungsgruppe, männlich, exemplarische Darstellung einer chronischen Vaskulitis mit Lumeneinengung Grad 1, H&E; Markierung zeigt eine vaskuläre Lumeneinengung von < 25 %; (TA = Tubulusatrophie; TD = Tubulusdilataation; IN = Infiltration mit Granulozyten und Makrophagen; IF = interstitielle Fibrose)

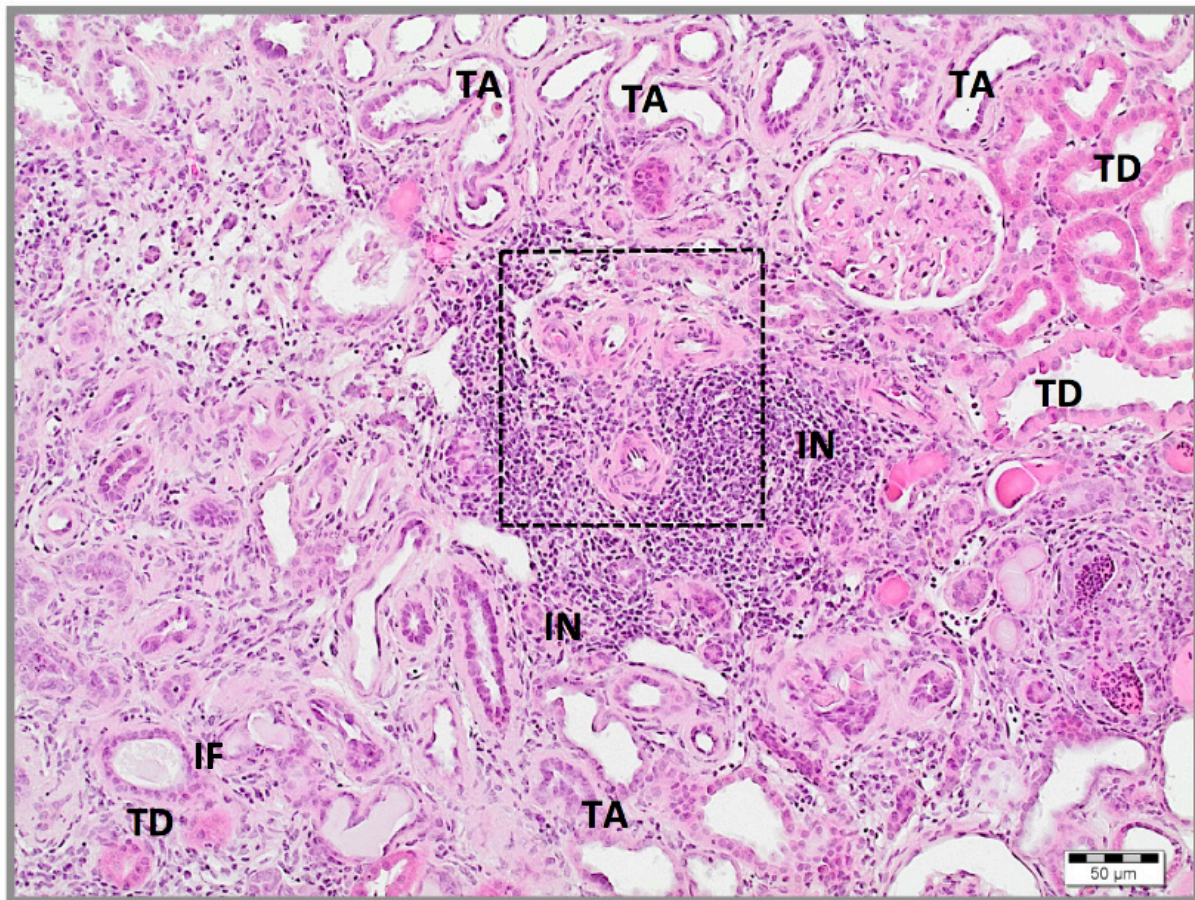


Abb. 27b: Niere, Ratte Nr. 14 aus Kontrollgruppe, männlich, exemplarische Darstellung einer chronischen Vasculitis mit Lumeneinengung Grad 2, H&E; Markierung zeigt eine vaskuläre Lumeneinengung von 25 - 50 %; (TA = Tubulatrophy; TD = Tubulodilatation; IN = Infiltration mit Granulozyten und Makrophagen; IF = interstitielle Fibrose)

In den vorangegangenen H&E - Schnitten zur Darstellung der Banff - Kriterien (Abb. 25 - 27) sind ebenso wie in den Schnitten zur ED1 - Färbungen weitere pathohistologische Befunde zu nennen. Dabei handelt es sich wie unter Punkt 4.4.2.1. beschriebenen Veränderungen in Form von Tubulatrophy (TA), -dilatationen (TD), Infiltrationen mit Granulozyten und Makrophagen (IN) sowie eine interstitielle Fibrose (IF). In Abb. 25b sind erneut hypertrophierte Glomerula (GLH) sichtbar. Dies deutet erneut auf die Verdachtsdiagnose einer Amyloidose hin. In jener Abbildung sind auch atrophische Tubuli mit azidophilem Inhalt zu sehen, bei dem es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um proteinhaltigen Harn handelt.

4.6. Nierenperfusionsmessungen im Magnetresonanztomographen

4.6.1. Etablierung des ASL im MRT nach akutem Nierenversagen

Unter Anwendung der ASL – Sequenz im Vergleich zum kontrastmittelgestützten Verfahren konnte im Vorversuch gezeigt werden, dass es mit Hilfe der nichtinvasive ASL - Messung möglich ist, Unterschied in der renalen Perfusion darzustellen. Es ergab sich, dass die native rechte Niere eine deutlich höhere Nierenperfusion aufwies als die linke Niere mit akutem Nierenversagen (Zimmer, Zollner et al. 2013). Bei den Perfusionsmessungen im Hauptversuch kam deshalb nur noch die schonende ASL - Messmethode zum Einsatz.

4.6.2. Nierenperfusionsmessungen nach Induktion des akuten Nierenversagens

Die renale Perfusion im Cortex nach 5 - tägiger Behandlung von Dopamin oder NOD ergab, dass die NOD - Gruppe im Vergleich zwar bessere Perfusionswerte aufwies als die DA- und Kontrollgruppe, dieser Unterschied aber unter Anwendung der Varianzanalyse (ANOVA) nicht statistisch signifikant ist (NOD: $333,5 \pm 30,79$ ml/100 g Nierengewebe/min, DA: $298,25 \pm 38,26$ ml/100 g Nierengewebe/min, Kontrolle: $297,75 \pm 87,04$ ml/100 g Nierengewebe/min; $p = 0,6953$). Die Perfusion in Medulla war in der DA - Gruppe im Vergleich zur NOD - und Kontrollgruppe am höchsten, aber auch dieser Unterschied stellte sich als nicht signifikant heraus (DA: $63,75 \pm 26,58$ ml/100 g Nierengewebe/min, NOD: $29,25 \pm 14,57$ ml/100 g Nierengewebe/min, Kontrolle: $49,50 \pm 27,17$ ml/100 g Nierengewebe/min; $p = 0,2484$).

4.6.3. Nierenperfusionsmessungen nach akutem Transplantationsmodell

Nach Auswertung der Perfusionswerte, die nach einer allogenen Transplantation und einem Beobachtungszeitraum von 7 Tagen im MRT mit Hilfe der ASL - Sequenz gemessen wurden, zeigten sich vergleichbare Ergebnisse wie nach akutem Nierenversagen und im chronischen Transplantationsmodell, die jedoch nicht statistisch signifikant waren (Vergleich alle Gruppen/ANOVA: Cortex - $p = 0,2182$ // Medulla – $p = 0,4809$). Auch zeigte sich in

diesem Modell, dass die Perfusion im Cortex in der NOD - Gruppe mit $211,25 \pm 60,38$ ml/100 g/min sowie in der Medulla mit $18,25 \pm 12,29$ ml/100 g/min am geringsten im Vergleich zur DA - Gruppe (Cortex: $272,71 \pm 66,52$ ml/100 g/min//Medulla: $32,71 \pm 32,95$ ml/100 g/min) und zur Kontrollgruppe (Cortex: $241,00 \pm 56,64$ ml/100 g/min//Medulla: $22,88 \pm 14,94$ ml/100 g/min) war.

Abb. 28 zeigt exemplarisch die Perfusionskarten zweier transplantierter Tiere nach einem Beobachtungszeitraum von 7 Tagen, wobei jeweils die waagerechten Abbildungen zu einem Tier gehören. Die abgebildeten Schichten sind annähernd gleich. Die Abbildungen zeigen vergleichend oben ein Tier mit einer besseren renalen Perfusion (381 ml/100 g/min), während die Perfusion der Niere des unteren Tieres deutlich sichtbar geringer ist (116 ml/100 g/min).

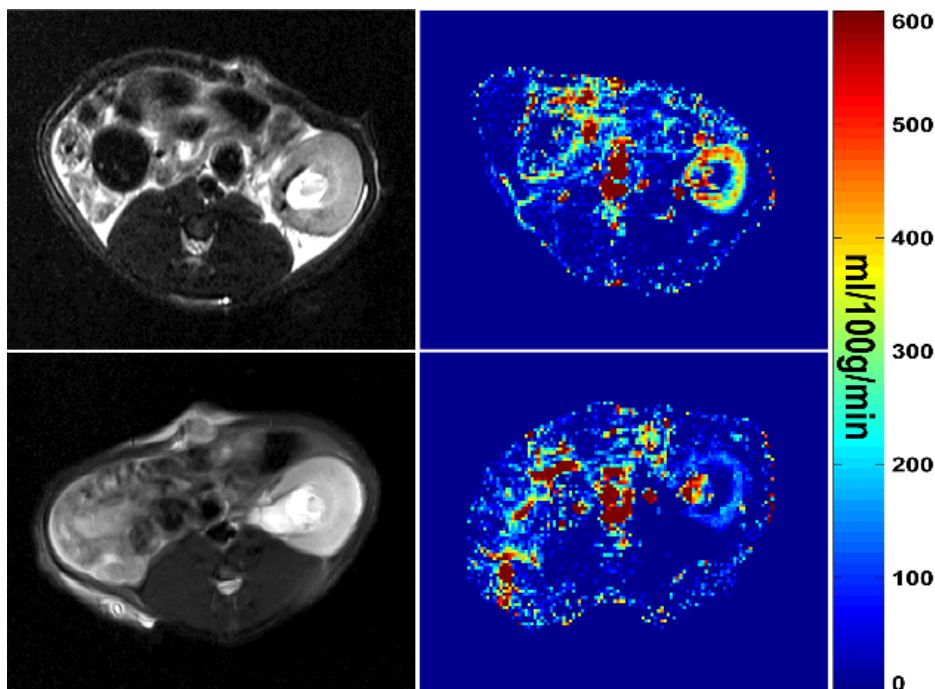


Abb. 28: Exemplarische Darstellung von renaler Perfusion nach ASL - Messung im akuten Transplantationsmodell – vergleichende Darstellung zweier Organempfänger
links oben/links unten – Aufnahme einer T2 - gewichteten Turbo-Spinecho Sequenz;
rechts oben/rechts unten – dazugehörige Perfusionskarte

Tier oben: bessere renale Perfusion nach Transplantation im Vergleich (= 381 ml/100 g/min);

Tier unten: schlechtere renale Perfusion nach Transplantation im Vergleich (= 116 ml/100 g/min)

4.6.4. Nierenperfusionsmessungen nach chronischem Transplantationsmodell

Nach Beendigung des Beobachtungszeitraumes von 14 Wochen nach Transplantation wurde mittels ASL - Sequenz die renale Perfusion im Cortex im MRT bestimmt. In der DA - Gruppe lag die durchschnittliche Perfusion im Cortex der transplantierten Niere mit $388,00 \pm 114,75$ ml/100 g/min am höchsten gefolgt von der NOD - Gruppe mit $341,57 \pm 104,47$ ml/100 g/min. In der Kontrollgruppe konnte eine Perfusion von $302,17 \pm 89,26$ ml/100 g/min gemessen werden. Die Unterschiede in der durchschnittlichen renalen Perfusion ist im Gruppenvergleich nicht signifikant unterschiedlich (ANOVA; $p = 0,4088$). In der Medulla ergaben sich nahezu identische Perfusionswerte in den drei Behandlungsgruppen, sodass eine Signifikanz ebenso nicht besteht (Kontrolle: $56,67 \pm 37,98$ ml/100 g/min; NOD: $58,29 \pm 42,86$ ml/100 g/min; DA: $59,86 \pm 50,42$ ml/100 g/min) (ANOVA; $p = 0,9939$)

4.6.5. Korrelation der renalen Perfusion mit vaskulären Veränderungen im Transplantat

Bringt man die renale Perfusion mit dem Grad der vaskulären Schädigung im Transplantat in Verbindung, so zeigt sich, dass die Behandlungsgruppe, die im Durchschnitt eine mildere Vaskulitis bzw. chronisch vaskuläre Veränderungen ausweist, auch im Vergleich eine höhere renale Perfusion zeigt und umgekehrt (Tx akut: NOD – durchschnittliche renale Perfusion: 211 ml/100 g/min bei V1 in 75 % der Nieren vs. DA – durchschnittliche renale Perfusion: 272 ml/100 g/min bei V1 in 28,6 % der Nieren /// Tx chronisch: Kontrolle – durchschnittliche renale Perfusion: 302 ml/100 g/min bei cV2 in 50 % der Nieren vs. DA - durchschnittliche renale Perfusion: 388 ml/100 g/min bei cV2 in 14,3 % der Nieren). Obwohl sich durch die Korrelationsanalyse keine eindeutigen Zusammenhänge darstellen ließen, ist dennoch ein Zusammenhang zwischen diesen Parametern nicht ausgeschlossen.

5. Diskussion

5.1. Zusammenfassung der wichtigsten Aspekte dieser Arbeit

Der hier vorliegenden Studie liegen die Untersuchungen von Tsagogiorgas et al. zugrunde, in denen gezeigt werden konnte, dass sich eine NOD - Vorbehandlung nach akutem ischämischen Nierenversagen nephroprotektiv verhält. Zusätzlich wurde festgestellt, dass NOD als TRPV1-Agonist in *in vitro* Experimenten fungieren kann, was unter Umständen zu den nephroprotektiven Eigenschaften des NOD im Rahmen von Ischämie - Reperfusionsschäden beitragen kann, wie schon von anderen TRPV1 - Agonisten bekannt ist (Tsagogiorgas, Wedel et al. 2012). Hierdurch ergeben sich in diesem Versuchsaufbau Überlegungen bezüglich weiterer antiinflammatorischer Wirkungen und positiver Effekte auf die renale Perfusion, da TRPV1 - Agonisten auch vasodilatatorische Eigenschaften aufweisen. Das Ziel dieser Studie war es zu ergründen, ob sich NOD ebenso positiv auf die Nierenfunktion nach akutem ischämischen Nierenversagen auswirkt, wenn es als Therapeutikum nach dem Auftreten der Ischämie eingesetzt wird und ob die bekannten protektiven Eigenschaften auch in Zusammenhang mit einer Nierentransplantation deutlich werden. Weiterhin sollte untersucht werden, ob NOD die Nierenperfusion positiv beeinflusst. Dies wurde mit Hilfe einer nichtinvasiven Sequenz im MRT untersucht. Die Ergebnisse und damit die wichtigsten Aussagen dieser Arbeit lassen sich in folgenden Punkten zusammenfassen:

- (1) Eine Behandlung mit NOD verbessert die Nierenfunktion und reduziert die renale Inflammation nach akutem ischämischen Nierenversagen.
- (2) Eine NOD - Behandlung nach einer Kaltpräservierung von 20 Stunden zeigt keinen positiven Effekt auf die Nierenfunktion und das Langzeitüberleben des Transplantates nach Nierentransplantation.
- (3) Nach einer Behandlung mit NOD kommt es in den untersuchten Schadensmodellen zu keiner signifikanten Verbesserung der renalen Perfusion.

5.2. Einfluss von NOD bei akutem Nierenversagen und Nierentransplantation

Aufgrund der seit langem bestehenden Diskrepanz zwischen der Zahl der Organspender – auch verstärkt durch den neuerlichen Rückgang der Spendebereitschaft durch Organspendeskandale – und im Gegensatz dazu den Patienten auf den Wartelisten ist es ein Ziel der Transplantationsmedizin, die vorhandenen Organe größtmöglich zu schützen. Auch in unserer Abteilung steht dieser Aspekt u.a. im Fokus der Forschung. So konnten bereits die protektiven Eigenschaften von Katecholaminen auf Ischämie - Reperfusionsschädigungen und auf das Transplantatüberleben sowohl im klinischen als auch im experimentellen Bereich gezeigt werden (Schnuelle, Lorenz et al. 1999; Schnuelle, Berger et al. 2001; Schnuelle, Yard et al. 2004; Gottmann, Notheisen et al. 2005; Gottmann, Brinkkoetter et al. 2006; Hoeger, Reisenbuechler et al. 2008; Schnuelle, Gottmann et al. 2009). Die durchgeführten *in vitro* Versuche zum Wirkungsmechanismus von Katecholaminen – besonders von Dopamin – führten schließlich zur Entwicklung des Dopaminderivates N – Oktanoyl – Dopamin (Beck, Brinkkoetter et al. 2004; Yard, Beck et al. 2004; Brinkkoetter, Beck et al. 2006; Liu, Hoeger et al. 2007; Losel, Schnetzke et al. 2010). Nachdem die protektive Wirkung von N – Oktanoyl – Dopamin (NOD) dann *in vitro* von Losel et al. gezeigt wurde (Losel, Schnetzke et al. 2010), konnten Tsagogiorgas et al. in ihrer Studie schließlich nachweisen, dass sich eine Vorbehandlung mit NOD in Form einer Bolusapplikation protektiv auf die Warmischämieschäden bei experimentellen akuten Nierenversagen auswirkt (Tsagogiorgas, Wedel et al. 2012). In der vorliegenden Studie konnte nun gezeigt werden, dass sich eine Behandlung mit NOD über 5 Tage ab Induktion des akuten ischämischen Nierenversagens ebenso schützend auf die Nierenfunktion der geschädigten Niere auswirkt. Durch eine Ischämie wird eine lokale Inflammation ausgelöst, die sich auch im Anschluss während der Reperfusion fortsetzt. Es kommt zur Aktivierung von Leukozyten, zur Hochregulierung von Chemokinen und Zytokinen wie Interleukine und TNF- α sowie Aktivierung des Komplementsystems (Kinsey, Li et al. 2008; Jang and Rabb 2009). Der Einsatz von NOD als Therapeutikum in der hier vorliegenden Studie bewirkte nach Ischämie eine deutlich reduzierte Inflammation in den Nieren in Form von geringerer Infiltration mit Monozyten und Makrophagen, eine signifikant schnellere Erholungszeit der Nierenfunktion und ein deutlich besseres Allgemeinbefinden der Tiere, gemessen an den Körpergewichtszunahmen.

In Vorstudien konnte *in vitro* bereits gezeigt werden, dass Katecholamine eine protektive Wirkung nach Kaltpräservierung aufweisen, sodass die Schädigungen auf Endothelzellen deutlich reduziert wurden (Yard, Beck et al. 2004). Auch nach Ischämie - Reperfusion wurden *in vivo* die protektiven Eigenschaften von Katecholaminen deutlich. Die Gabe von Dopamin führte in diesem Zusammenhang zur verbesserten Nierenfunktion nach akutem ischämischen Nierenversagen und zeigte weniger endotheliale Zellschädigungen nach einer Kaltpräservierungszeit von 24 Stunden (Gottmann, Brinkkoetter et al. 2006). Für NOD stellten Losel et al. *in vitro* schließlich fest, dass es im Vergleich zu Dopamin 40 x protektiver auf zuvor durch Kaltischämie geschädigten HUVECs wirksam ist. Durch die Modifikation von Dopamin weist NOD nun eine höhere Lipophilie auf. Es kann somit besser in die Zellen gelangen und deshalb stärker protektiv wirksam sein (Losel, Schnetzke et al. 2010). In nachfolgenden *in vitro* und *in vivo* Versuchen konnte Tsagogiorgas et al. darüber hinaus noch weitere positive und protektive Effekte von NOD auf die Inflammation und die IRI - Schädigung zeigen. So ist NOD *in vitro* dosisabhängig in der Lage, die TNF- α - induzierte Inflammation – durch Inhibition der NF κ B - Aktivierung – zu reduzieren. TNF- α wird eine wesentliche Rolle bei der Pathogenese von I/R - Schäden zugesprochen (Ueda, Tsuji et al. 2009; Tsagogiorgas, Wedel et al. 2012).

Die protektive Wirkung von NOD auf Ischämie - Reperfusionsschäden lässt sich möglicherweise weiterhin durch seine Funktion als TRPV1 - Agonist in Verbindung bringen, welche von Tsagogiorgas et al. gezeigt werden konnte (Tsagogiorgas, Wedel et al. 2012). Die Rolle von TRPV1 ist grundsätzlich kontrovers diskutiert, da sowohl positive als auch negative Effekte beschrieben werden. So konnten Ueda et al. in zwei Studien nachweisen, dass die orale Anwendung von Capsaicin sowie die eines anderen TRPV1 - Agonisten, SA13353, jeweils die renale Dysfunktion nach Ischämie - Reperfusion abschwächt. Auch histopathologisch ließen sich in der mit einem TRPV1 - Agonist behandelten Gruppe weniger Schädigungen feststellen, die üblicherweise beim akuten Nierenversagen entstehen (Ueda, Tsuji et al. 2008; Ueda, Tsuji et al. 2009).

Diese Versuchsergebnisse stehen in vollständiger Übereinstimmung mit den hier beschriebenen Studienergebnissen. Durch die Anwendung von NOD konnte eine reduzierte Infiltration der Nieren mit Entzündungszellen wie Monozyten und Makrophagen festgestellt werden. Dies wiederum signalisiert eine geringere renale Inflammation, welche in der Kontrollgruppe sowie in der mit Dopamin behandelten Gruppe im Vergleich deutlich ausgeprägter waren. Unterstützt werden diese Ergebnisse von weiteren Studien, die zeigen,

dass auch in anderen Organen die protektive Wirkung einer TRPV1 - Stimulation nach I/R - Schädigung nachweisbar ist. So machen Wang et al. (2012) deutlich, dass die Anwendung von Capsaicin vor Ischämie - Reperfusion die Inflammation in der Lunge sowie den oxidativen Stress nach Ischämie beim Kaninchen reduziert. Sie schlussfolgern daraus, dass die Stimulation von TRPV1 mit der Freisetzung von CGRP diese protektiven Effekte maßgeblich verursacht (Wang, Ji et al. 2012). Auch konnten Harada et al. nach einer Vorbehandlung mit Capsaicin eine schützende Wirkung nach Ischämie - Reperfusion in der Leber feststellen. Es konnte hierbei ein Anstieg von CGRP gezeigt werden (Harada, Okajima et al. 2002). Wang et al. (2005) legen dann im Folgenden dar, dass TRPV1 auch das Herz vor ischämischen Schädigungen schützt. Durch eine Studie mit TRPV1-Knockout-Mäusen zeigte sich, dass die Freisetzung von Substanz P für diese protektive Wirkung verantwortlich sein könnte (Wang and Wang 2005). Zhong et al. untersuchte dann – ebenfalls in einer Studie mit TRPV1-Knockout-Mäuse – die Wirkung von N-Oleoyldopamin, ein anderes Katecholamin mit Funktion eines TRPV1-Agonisten, nach Ischämie-Reperfusionsschädigung am Herzen. Der Einsatz von N-Oleoyldopamin führte in diesem Zusammenhang zu einer verbesserten kardialen Funktion unter Aktivierung von TRPV1 (Zhong and Wang 2008). Im Gegensatz dazu zeigen Alawi et al. historisch bedingte negative Zusammenhänge auf, die mit TRPV1 in Verbindung gebracht werden. Dazu gehören neuropathischer Schmerz, Hyperalgesie, Arthritis und chronisch - entzündliche Darmerkrankungen (Alawi and Keeble 2010; White, Urban et al. 2011).

Die beschriebene reduzierte Inflammation in der Niere nach der Gabe von NOD bei akutem Nierenversagen könnte sehr wahrscheinlich als ein Grund für die verbesserte Nierenfunktion gesehen werden. So spielt die Inflammation eine wesentliche Rolle bei der Entstehung eines ischämischen akuten Nierenversagens (Bonventre and Zuk 2004). Dabei führt die akute Inflammation zu einer Organdysfunktion und möglicherweise zum Organversagen (Gueler, Gwinner et al. 2004). Da die ischämischen Schädigungen durch das Einwirken des angeborenen (Makrophagen, neutrophile Granulozyten, dendritische Zellen) und erworbenen Immunsystems (T-Lymphozyten, B-Lymphozyten) maßgeblich bestimmt ist (Kinsey, Li et al. 2008; Bonventre and Yang 2011), beeinflusst im Umkehrschluss eine antiinflammatorische Intervention den Grad der Schädigung und damit sehr wahrscheinlich die Organfunktion. Bonventre führt weiterhin an, dass durch eine Inflammation die lokale Blutzufuhr im Cortex und in der äußeren Medulla reduziert wird, was sich im Folgenden erneut ungünstig auf die Funktion der Tubuli auswirkt (Bonventre 2007). Ein Zusammenhang zwischen einer

reduzierten Inflammation und einer dadurch verbesserten Nierenfunktion ist darum denkbar.

Nachdem NOD im Zusammenhang mit dem akuten Nierenversagen vielversprechende protektive Eigenschaften zeigen konnte, ließen sich im Gegensatz dazu bei einer Behandlung eines Transplantatempfängers mit NOD über 7 Tage keinerlei positive Wirkungen darstellen. In diesem Versuchsaufbau wurde nach der Nierenexplantation eine Kaltpräsenzzeit von 20 Stunden vorgenommen, die sich negativ auf die initiale Funktion des Organes und das Transplantatüberleben auswirken kann (Salahudeen, Haider et al. 2004; van der Vliet and Warle 2013). Auch zeigen de Groot et al. deutlich, dass die zellulären Schädigungen in der Reperfusionphase nach Warm- und Kaltischämie deutlich unterschiedlich ausgeprägt sind. So verlangsamt die Kaltpräsenz – nach schneller Anflutung des Organes mit einer geeigneten Präsenzlösung und anschließender Lagerung bei 4 °C – eines Organes den anaeroben Metabolismus, reduziert die Akkumulation toxischer Substanzen und verringert Zellschwellungen. Die Präsenzlösung kann aber gleichzeitig nicht die Schäden verhindern, die durch eine Ischämie entstehen (Koo, Welsh et al. 1998; Salahudeen 1999; Perico, Cattaneo et al. 2004; Salahudeen 2004; de Groot and Rauen 2007; Hoeger, Lueg et al. 2011). In dem vorliegenden Versuch wurde zur Kaltpräsenz die University of Wisconsin (UW) - Lösung verwendet, welche im Vergleich zu anderen Präsenzlösungen als besonders geeignet dargestellt wird (Salahudeen 2004). So konnten Hoeger et al. in einer experimentellen Studie im direkten Vergleich der beiden gängigsten Präsenzlösungen in der Nierentransplantationsmedizin – UW - Lösung und Histidin - Tryptophan - Ketoglutarat (HTK) – eine deutlich bessere Wirksamkeit der UW - Lösung bei prolongierter Kaltpräsenz in *in vivo* Experimenten an der Ratte darstellen. In einem isogenen Nierentransplantationsmodell wurde unter Anwendung verschiedener Kaltischämiezeiten bei der Anwendung von UW - Lösung eine bessere Organfunktion und Überlebenswahrscheinlichkeit festgestellt (Hoeger, Lueg et al. 2011).

Es ist vielfach beschrieben, dass eine lange Kaltischämiezeit sehr eng mit einer verzögert einsetzenden Transplantatfunktion (delayed graft function, DGF) in Verbindung steht, welche wiederum Einfluss hat auf das Transplantatüberleben sowie möglicherweise auch vermehrt eine akute Abstoßungsreaktion zur Folge haben kann (Koo, Welsh et al. 1998; Angelescu, Kraus et al. 2003; Perico, Cattaneo et al. 2004; Salahudeen 2004; Quiroga, McShane et al. 2006; van der Vliet and Warle 2013). Neben der DGF weist Salahudeen darauf hin, dass Kaltischämieschäden im Transplantat zu einer erhöhten Immunogenität führen, was wiederum die Entstehung von akuten und chronischen Abstoßungsreaktionen fördert (Salahudeen 2004).

Halloran et al. beschreiben in diesem Zusammenhang einen Kreislauf, der die Funktion und das Langzeitüberleben des Transplantates beeinflusst. So führt eine ischämische Schädigung der Nieren zu einer Inflammation, was eine immunologische Antwort in Form einer erhöhten MHC - Expression induziert. Als Folge kommt es zu weiteren Schädigungen, was letztlich zu einer chronischen Abstoßungsreaktion im Transplantat führen kann (Halloran, Homik et al. 1997).

Katecholaminen – im Besonderen Dopamin – wird besonders eine protektive Wirkung bezüglich des Kaltpräservationschadens zugeschrieben, was bereits in zahlreichen *in vitro*, experimentellen und in klinischen Studien beschrieben wurde. So reduziert der Einsatz von Dopamin *in vitro* u.a. die Synthese proinflammatorischer Mediatoren, inhibiert die Expression von Adhäsionsmolekülen und die Produktion von Zytokinen und Chemokinen (Uusaro and Russell 2000; Kapper, Beck et al. 2002; Beck, Brinkkoetter et al. 2004; Beck, Hanusch et al. 2005). Vielfach diskutiert ist in der Transplantationsmedizin der Einsatz von Dopamin als Spenderpräkonditionierung. So haben Gottmann et al. in einer experimentellen Studie die Wirkung von Dopamin auf das Transplantatüberleben nach Nierentransplantation untersucht. Es zeigte sich, dass die Spendervorhandlung mit Dopamin das Kurz - und Langzeitüberleben des Transplantates – auch nach langer Kaltischämie – verbessert. Zusätzlich kam es nach Dopaminvorbehandlung zu einer reduzierten Infiltration mit Makrophagen und Monozyten im Transplantat (Gottmann, Notheisen et al. 2005). Unterstützt werden diese Ergebnisse von Hoeger et al., die eine Präkonditionierung bei hirntoten Spendern untersuchte (Hoeger, Gottmann et al. 2007; Hoeger, Reisenbuechler et al. 2008). In der Klinik führte eine Behandlung von hirntoten Spendern mit Katecholaminen zu weniger Abstoßungsreaktionen im Empfänger nach Nierentransplantation, zu einem verbesserten Langzeitüberleben des Transplantates, zu einer besseren initialen Transplantatfunktion und damit zu weniger Dialysen in der ersten Woche nach Nierentransplantation (Schnuelle, Lorenz et al. 1999; Schnuelle, Yard et al. 2004; Schnuelle, Gottmann et al. 2009).

In dieser hier vorliegenden Studie wurde der Aspekt der Spenderpräkonditionierung nicht untersucht, sondern es wurde sich ausschließlich mit der Anwendung als Therapeutikum und den Auswirkungen auf das Transplantat beschäftigt, wodurch sich gänzlich neue Aspekte ergeben. Beispielsweise würde die Anwendung eines antiinflammatorischen Therapeutikums ohne nephrotoxische Nebenwirkungen im Empfänger den Einsatz des nephrotoxischen CsA reduzieren oder gar vollständig ersetzen, was sich günstig auf die Ausbildung einer chronischen Transplantatabstoßung auswirken würde. Aus diesem Grund wurde in dem hier

vorliegenden Versuchsaufbau auf eine immunsuppressive Therapie in den Empfängertieren verzichtet. Jedoch konnte in dieser Studie weder im akuten noch im chronischen Transplantationsmodell eine signifikante Verbesserung der Nierenfunktion erzielt werden. Im chronischen Transplantationsmodell zeigte sich durch NOD - Gabe eine deutliche Reduzierung der Infiltration von Makrophagen und Monozyten. Diese Ergebnisse haben jedoch eine hohe Streuung und sind daher kritisch zu betrachten. Im akuten Transplantationsmodell führte im Gegensatz dazu die Dopaminbehandlung zu einer deutlich geringeren Inflammation, dargestellt durch eine reduzierte Infiltration mit Entzündungszellen wie Makrophagen. Auch hier sind hohe Standardabweichungen dokumentiert.

Mit Hinblick auf die Abstoßungsreaktionen in dieser Studie zeigten sich zumindest im chronischen Transplantationsmodell nach NOD - Behandlung mildere Formen der Tubulitiden und weniger chronische vaskuläre Veränderungen, auch wenn dafür statistische Signifikanzen fehlen. Einen positiven Einfluss auf den Schweregrad einer Abstoßungsreaktion erbrachte bisher lediglich eine Spenderpräkonditionierung mit Dopamin. Dabei zeigte sich eine signifikant geringere Präsenz von Tubulusatrophien im chronischen Transplantationsmodell (Gottmann, Notheisen et al. 2005). Auch in einem starken allogenen Transplantationsmodell zeigten sich nach Dopaminbehandlung signifikant mildere Tubulitiden (Liu, Hoeger et al. 2007). In einem Hirntodmodell und einer Anwendung von Dopamin als Spenderbehandlung führte bei Hoeger et al. in einem milderem allogenen Transplantationsmodell in gleicher Weise zu milderem Tubulitiden und somit in diesem Zusammenhang zu einer reduzierten akuten Abstoßungsreaktion (Hoeger, Reisenbuechler et al. 2008). Die Effekte einer NOD - Behandlung sind möglicherweise nicht weitreichend genug, um in einem allogenen Transplantationsmodell mit einer verlängerten Kaltischämiezeit nachweisbar zu sein. Durch die Kaltpräservierung war das Spenderorgan mit hoher Wahrscheinlichkeit schon so massiv geschädigt, als es in den Empfänger implantiert wurde, sodass die möglichen Effekte einer Behandlung mit NOD überlagert wurden. Auch die fehlende Immunsuppression nach Transplantation führte sehr wahrscheinlich dazu, dass starke Abstoßungsreaktionen auftraten, die durch eine NOD - Behandlung nicht mehr aufgehoben werden konnten.

Zusammenfassend wird deutlich, dass NOD im Zusammenhang mit einem ischämischen akuten Nierenversagen vielversprechend protektiv wirksam ist und sich dadurch neue Therapiemöglichkeiten ergeben könnten, während eine Behandlung nach Nierentransplantation in dieser hier vorliegenden Studie keinen protektiven Einfluss zeigte.

5.3. Einfluss von NOD auf die renale Perfusion gemessen mit Arterial Spin Labeling

Nach der Identifizierung von NOD als TRPV1 - Agonist (Tsagogiorgas, Wedel et al. 2012) wurde nun in der vorliegenden Studie untersucht, ob sich NOD positiv auf die renale Perfusion auswirkt. Die Stimulation von TRPV1 führt – wie vielfach beschrieben – unter anderem zu einer Ausschüttung von CGRP und Substanz P (Li and Wang 2008; Alawi and Keeble 2010; Benarroch 2011). Beide Substanzen sind Neurotransmitter im zentralen und peripheren Nervensystem, die außerdem als starke Vasodilatoren gelten (Harrison and Geppetti 2001; Mizutani, Okajima et al. 2009; Benarroch 2011; Jin, Sun et al. 2012). Ob sich die vasodilatative Wirkung und in Folge dessen eine verbesserte Nierenperfusion im MRT zeigen lässt, wurde im Rahmen dieser Studie mit Hilfe der ASL - Sequenz untersucht. Für die Anwendung der ASL - Sequenz spricht, dass diese Messung vollständig nichtinvasiv ist, da die Protonen im Blut als endogenes Kontrastmittel dienen und eine beschädigte Niere somit keinen weiteren Belastungen ausgesetzt wird (Winter, St Lawrence et al. 2011; Liss, Cox et al. 2013). Winter et al. weisen auf die Möglichkeit hin, mit Hilfe einer nichtinvasiven Messung der renalen Perfusion zusätzliche Informationen zu erhalten, die sowohl für die Diagnostik als auch für eine optimale Therapiewahl unterstützend sein könnten. Da die ASL - Sequenz für die Bestimmung des zerebralen Blutflusses bereits etabliert ist (Petersen, Zimine et al. 2006; Detre, Wang et al. 2009), ergeben sich nun vielversprechende Perspektiven für Perfusionsmessungen in anderen Organen wie in den Nieren. So konnten Winter et al. in einer vergleichenden Studie mit Kaninchen feststellen, dass ASL und die dynamische kontrastmittelunterstützte Messmethode (DCE-MRT) vergleichbare Ergebnisse für die renale Perfusion im Cortex ergaben. In dieser Studie wurden allerdings lediglich gesunde Nieren miteinander verglichen (Winter, St Lawrence et al. 2011).

Vor Beginn der vorliegenden Studie sind zur Messung der renalen Perfusion nach akutem ischämischen Nierenversagen im MRT in einem Versuch renale Perfusionsmessungen durchgeführt worden, die zur Etablierung der ASL - Sequenz im Vergleich zur kontrastmittelunterstützten Messungen dienten. Basierend auf diesen initialen Versuchen sind die Messungen in der vorliegenden Studie aufgebaut. Im Vorversuch konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, unter Anwendung der ASL - Sequenz Perfusionsunterschiede zwischen kranken und gesunden Nieren darzustellen (Zimmer, Zollner et al. 2013).

Durch die Anwendung eines gut standardisierten Warmischämie Modells zur Induktion des akuten Nierenversagens sowie zweier Nierentransplantationsmodelle mit Beobachtungszeiträumen von 7 Tagen und 3 Monaten konnten die erwarteten Ergebnisse, eine verbesserte Perfusion in den NOD - Behandlungsgruppen im Vergleich zu den anderen Gruppen, nur bedingt gezeigt werden. Neben den Wirkungsstudien von NOD auf die renale Perfusion sollte zum anderen Aussagen darüber getroffen werden können, ob mit Hilfe der ASL - Sequenz eine Differenzierung zwischen verschiedenen Schädigungen möglich ist. Unterschiede in den Perfusionswerten zeigten sich hierbei lediglich als eine Tendenz. So ließ sich im chronischen Transplantationsmodell feststellen, dass Transplantatnieren mit milderer vaskuläre Veränderungen – beurteilt mit Hilfe der Banff - Klassifikation – tendenziell bessere renalen Perfusionswerte aufwiesen. Tendenzen für einen Zusammenhang zwischen renaler Perfusion und Nierenfunktion ließen sich innerhalb der jeweiligen Behandlungsgruppen ebenso feststellen. So war es möglich, einem Empfängertier mit eingeschränkter Nierenfunktion eine geringere und einem Empfängertier mit einer besseren Nierenfunktion einen höheren Perfusionswert zuzuordnen. Jedoch waren auch diese jeweiligen Unterschiede statistisch nicht signifikant.

Die Beobachtungen von Zimmer et al. sind in einem sehr guten Einklang mit Untersuchungen von Michaely et al., die ebenso die Möglichkeit darlegen, mit Hilfe einer nichtinvasiven Messung wie ASL Unterschiede in der renalen Perfusion zwischen gesunden und kranken Personen darstellen zu können (Michaely, Schoenberg et al. 2004). Erste Messungen mit ASL bei transplantierten Patienten wurden von Lanzmann et al. durchgeführt, die zeigen konnten, dass diese Sequenz in der Lage ist, signifikante Unterschiede in der renalen Perfusion gesunder Probanden und transplantierten Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion darzustellen (Lanzman, Wittsack et al. 2010). Diese Ergebnisse konnten später von Artz et al. bestätigt werden, die die Messung der renalen Perfusion zusätzlich mit der Messung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) verbanden (Artz, Sadowski et al. 2011). Diese Forschungsergebnisse heben zwar die vielversprechenden Möglichkeiten einer nichtinvasiven Messmethode hervor, können aber nur bedingt mit den hier vorliegenden Ergebnissen verglichen werden. So gibt es bei der hier vorliegenden Studie weder im Warmischämie Modell noch bei den Transplantationsmodellen eine native – d.h. gesunde – Kontrollgruppe. Bei den jeweiligen Kontrollgruppen wurde ebenso entweder das akute Nierenversagen induziert oder eine Nierentransplantation durchgeführt. Es wurde lediglich auf eine Behandlung mit Dopamin oder NOD verzichtet.

Neben der guten Reproduzierbarkeit und der fehlenden Invasivität der ASL - Sequenz sind auch Nachteile dieser Messmethode beschrieben. Das Signal - zu - Rausch - Verhältnis (SNR) ist in diesem Fall mit weniger als 1 % der Gewebesignalintensität sehr niedrig, besonders bei reduzierter renaler Perfusion (Golay, Hendrikse et al. 2004; Winter, St Lawrence et al. 2011; Odudu, Francis et al. 2012; Zimmer, Zollner et al. 2013). Das SNR beschreibt das Verhältnis zwischen dem MR - Signal und der Stärke des Hintergrundrauschens (Nitz, Runge et al. 2007). Um das niedrige SNR der ASL - Messung in dieser Studie zu verbessern, wurden pro Messung 30 Bilder aufgenommen und für die Auswertung gemittelt (Lanzman, Wittsack et al. 2010; Odudu, Francis et al. 2012). Die ASL - Sequenz ist weiterhin limitiert durch die Empfindlichkeit für Atembewegungen, da das perfusionsgewichtete Bild durch eine Subtraktionstechnik akquiriert wird (Artunc, Rossi et al. 2011; Zimmer, Zollner et al. 2013). Die jeweiligen MRT - Messungen wurden weiterhin an einem humanen MRT - Scanner (mit 3 T magnetischer Flussdichte) durchgeführt, d.h. eine Verringerung der Schichtdicke zur Auswahl des Inversionsbereiches ist auf maximal 8 mm begrenzt. Eine kleine Schichtdicke für die Inversion erhöht die Wahrscheinlichkeit einer lokal genaueren Perfusionsmessung, da der betreffende Bereich zuverlässiger eingegrenzt werden kann und der ermittelte Wert mit höherer Wahrscheinlichkeit der tatsächlichen Perfusion entspricht. Die Aufnahme einer dünneren Schicht hat allerdings wiederum den Nachteil eines geringeren SNR (Nitz, Runge et al. 2007; Weishaupt, Köchli et al. 2009).

Eine weitere Limitation dieser Messung ist die renale Perfusion selbst. Snoeijs et al. machen deutlich, dass der gesamte renale sowie der regionale kortikale Blutfluss in den Tagen nach Reperfusion in Nieren mit verzögerter Nierenfunktion (DGF) generell niedriger ist als in sofort funktionierenden Transplantaten (Snoeijs, van Heurn et al. 2010). Sutton et al. machen in diesem Zusammenhang auf die große Bedeutung der vaskulären Zellschädigungen nach Ischämie aufmerksam, die wiederum die renale Perfusion beeinträchtigt (Sutton, Fisher et al. 2002). So kommt es nach der Reperfusion zu einer Reparationsphase, wobei die Genesung der Niere in Funktion und Struktur als nicht vollständig betrachtet wird. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass sich die Gefäßdichte bis zur 40. Woche nach Ischämie - Reperfusion signifikant reduziert. Diese Veränderungen sind besonders im Bereich der äußeren Medulla zu finden (Basile, Donohoe et al. 2001). Höbelt et al. konnten simultan von einem Verlust von 45 % der Gefäßdichte bis 4 Wochen nach Ischämie-Reperfusion zeigen (Höbelt, Lee et al. 2007). Die Mechanismen, die nach Ischämie - Reperfusion zu einer Veränderung der renale Perfusion führen, sind noch nicht vollständig verstanden. Es wird von einer Imbalance zwischen

Mediatoren ausgegangen, die entweder zur renalen Vasodilatation oder Vasokonstriktion führen (Sutton, Fisher et al. 2002). Auch konnten Dragun et al. feststellen, dass nach einer Kaltpräservierung von mehr als 6 Stunden deutlich mehr Schädigungen im Endothelium vorhanden sind als bei einer kürzeren Kaltischämiezeit (Dragun, Hoff et al. 2001). Um die Perfusion als Parameter mit dem Grad der Nierenschädigung in Verbindung zu bringen, ist das Betrachten der vaskulären Veränderungen daher von Bedeutung. Histologisch können die Gefäßschädigungen mittels der Banff - Klassifikation beurteilt werden. Rein deskriptiv konnte in der hier vorliegenden Studie festgestellt werden, dass es möglicherweise einen Zusammenhang zwischen dem Grad der Gefäßläsionen – dargestellt durch das Banff - Scoring – und der renalen Perfusion gibt. Sowohl im akuten als auch im chronischen Transplantationsmodell zeigten die Behandlungsgruppen mit einer höheren Klassifizierung und damit mit einer höheren Schädigungen eine niedrigere Perfusion und umgekehrt. In selbigem Kontext untersuchten Wang et al. (1998) in einer Studie in einem isogenen sowie allogenen Transplantationsmodell die renale Perfusion mittels Arterial Spin Labeling. Es konnte gezeigt werden, dass sich die renale Perfusion in beiden Modellen am dritten Tag nach Transplantation nicht signifikant unterschieden, während eine Messung am siebten Tag nach OP eine deutlich geringere Perfusion im allogenen Modell als im isogenen Modell zeigte. Auch konnte eine Korrelation zwischen renaler kortikaler Perfusion und histologisch nachgewiesenen Abstoßungsreaktionen gezeigt werden (Wang, Hendrich et al. 1998). Die Ergebnisse von Wang et al. (1998) sind mit den hier vorliegenden Ergebnissen nicht vollständig vergleichbar, da sich der Studienaufbau in zwei wesentlichen Aspekten unterscheidet, die den Ausgang einer Studie beeinflussen können. Die wesentlichen Unterschiede sind die Wahl des Tiermodells (Wang: ACI/Fisher vs. Fisher/Lewis) sowie die Kaltischämiezeit (Wang: 20 min vs. 20 h). Zusätzlich dazu wurde die Banff - Klassifikation im Lauf der Jahre diversen Erweiterungen und Überarbeitungen unterzogen (Racusen, Solez et al. 1999; Racusen, Halloran et al. 2004; Solez, Colvin et al. 2007; Sis, Mengel et al. 2010), sodass sich die semiquantitative Beurteilung der Läsionen in dieser Studie und jene bei Wang et al. (1998) maßgeblich unterscheiden dürften.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass in diesem Versuchsaufbau nicht möglich war, eine durch Stimulation von TRPV1 und Freisetzung von CGRP und Substanz P beschriebene Vasodilatation zu messen. Hierbei sollten zum einen die Limitationen der Sequenz beachtet werden sowie die renale Perfusion als Parameter, deren Veränderung nur bei ausreichender Schädigung der Gefäße deutlich wird. Für das chronische Modell wäre weiterhin denkbar,

dass die Zeit zwischen der NOD - Behandlung über 7 Tage und Perfusionsmessung zu lang ist und die Perfusion somit nur indirekt gemessen werden konnte. Weiterhin ist es wahrscheinlich, dass die Transplantatnieren durch vorherige Kaltischämie bereits so sehr geschädigt wurden, dass eine Verbesserung der Perfusion durch NOD möglicherweise nicht mehr darstellbar war. Zusätzlich ist beschrieben, dass CGRP eine Endothelium- und Stickstoffmonoxid - abhängige Vasodilatation mit direkter Auswirkung auf die glatten Muskelzellen ausübt (Benarroch 2011). Es ist daher denkbar, dass die Wirkung einer TRPV1-vermittelten CGRP - Freisetzung bei unterschiedlich geschädigten Gefäßen in der Niere nach Anwendung der Schadensmodelle auch zu unterschiedlichen Wirkungen führt. Das könnte möglicherweise die gegensätzliche Wirkung von NOD nach akutem ischämischen Nierenversagen und Nierentransplantation erklären.

Die alleinige Ermittlung der renalen Perfusion mittels ASL zu Zwecken der Diagnostik und Therapie ist momentan noch sehr kritisch zu beurteilen und sollte stets im Gesamtkontext gesehen werden. Eine generelle Unterscheidung zwischen kranker und gesunder Niere durch eine ASL - Messung ist dagegen sehr zuverlässig möglich.

5.4. Ausblick

Nach Beurteilung der angeführten Ergebnisse und deren Einordnung in den Gesamtkontext wird deutlich, dass viele Aspekte in Bezug auf NOD und deren Wirkungsweise noch nicht verstanden sind. So wirkt NOD in Zusammenhang mit Warmischämie protektiv und ist in der Lage, die Niere zu schützen, während eine protektive Wirkung nach längerer Kaltischämie und Transplantation in diesem Versuchsaufbau nicht vorhanden ist. Es besteht darum großer Bedarf, den Wirkungsmechanismus von NOD weiter zu untersuchen, um das Wirkungspotenzial genauer interpretieren zu können. Interessant ist hierbei auch die Rolle des NOD als TRPV1 - Agonist und in diesem Zusammenhang die potentielle Freisetzung von Substanz P und CGRP, die sich durch ihre stark vasodilatative Aktivität protektiv auf die Nierenfunktion bzw. auf den Gesamtzustand der Niere auswirken könnten. Dafür wäre es u.a. interessant, eine Studie mit TRPV1 – Knockout – Ratten in Kombination mit NOD durchzuführen und somit wichtige Erkenntnisse über die Wirkungsmechanismen der Substanz zu erhalten. Diese Studie ist aktuell in Planung.

Da das NOD in Zusammenhang mit einem akuten ischämischen Nierenversagen bereits wiederholt vielversprechende protektive Effekte gezeigt hat, könnte NOD, bzw. in gleicher Weise andere bereits zugelassene TRPV1 - Agonisten, ein wirksames Präparat zur Verbesserung der Nierenfunktion nach akutem Nierenversagen in der Humanmedizin darstellen. In Bezug auf die Anwendung von NOD bei Nierentransplantation sind noch weitere Untersuchungen notwendig. In dieser hier vorliegenden Studie fand lediglich eine Empfängerbehandlung statt, die jedoch durch Schädigungen durch Kaltischämie vorab negativ beeinflusst wurde. Interessant wäre es darum, vor der Nierentransplantation und Behandlung mit NOD eine Spenderpräkonditionierung, z.B. mit Dopamin durchzuführen, die die Schädigungen des Organes durch Kaltpräservierung reduziert und die Effekte einer NOD - Behandlung nach Transplantation dadurch eventuell deutlicher sichtbar machen würde.

6. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Wirkung des Dopaminderivates N – Oktanoyl – Dopamin (NOD) nach akutem ischämischen Nierenversagen und Nierentransplantation im akuten und im chronischen Modell untersucht. Dabei wurde der Einfluss auf die Nierenfunktion, auf die renale Inflammation, auf die Entstehung von Abstoßungsreaktionen und auf das Transplantatüberleben beurteilt. Abschließend sollte vor Termination der Tiere die renale Perfusion im MRT ermittelt und somit der Hypothese nachgegangen werden, ob NOD in seiner Funktion als TRPV1 - Agonist die renale Perfusion verbessert.

Ausgangspunkt waren die bereits bekannten protektiven Eigenschaften von Dopamin als Spenderpräkonditionierung bei Nierentransplantation sowie bei akutem Nierenversagen. Auch erste Untersuchungen mit NOD *in vitro* und als Bolusgabe vor Induktion des akuten Nierenversagens konnten bereits deutlich protektive Eigenschaften von NOD darstellen.

Eine Behandlung mit NOD über 5 Tage nach akutem ischämischen Nierenversagen führte auch in dieser Arbeit zu einer deutlichen Verbesserung der Nierenfunktion und zu einer Reduzierung der renalen Inflammation, die nach Ischämie - Reperfusion entsteht.

Die renale Inflammation wurde mittels Histologie und Immunhistochemie dargestellt. So wurden aktivierte Makrophagen durch ED1 gefärbt und im Allgemeinen antigenpräsentierende Zellen durch die MHC II - Färbung, als allgemeine Abstoßungskriterien wurde die Banff - Klassifikation herangezogen.

Die Anwendung von NOD als Therapeutikum nach Nierentransplantation mit einer Kaltischämiezeit von 20 Stunden erbrachte im Gegensatz zu den Ergebnisse nach akutem Nierenversagen weder auf kurze noch auf lange Sicht positive Effekte für die Nierenfunktion, die renale Inflammation, auf das Entstehung von Abstoßungsreaktionen sowie deren Schweregrad und auf das Langzeitüberleben.

Als Ursache für die fehlende Wirkung von NOD werden im Transplantationsmodell im Wesentlichen die Schädigungen nach verlängerter Kaltischämie gesehen. Dagegen sind im Warmischämiemodell des akuten Nierenversagens die schädigenden Mechanismen zu Behandlungsbeginn noch aktiv, was den Behandlungserfolg durch NOD in diesem Setting erklären könnte.

Da NOD bereits im Vorfeld schon als TRPV1 - Agonist identifiziert wurde und eine Stimulierung dieses Rezeptors mit der Ausschüttung von CGRP und Substanz P in Verbindung steht, wurde zusätzlich untersucht, ob eine Behandlung mit NOD zu einer

Verbesserung der renale Perfusion führt. Die Messung der Perfusion erfolgte unter Anwendung der nichtinvasiven ASL - Sequenz im MRT. Es konnten zwar gewisse mögliche Zusammenhänge zwischen der Perfusion und der Nierenfunktion sowie dem Schweregrad der vaskulären Veränderung im Transplantat festgestellt werden, jedoch erbrachte die Anwendung von NOD im Allgemeinen keine positiven Effekte auf die renale Perfusion.

7. Summary

Experimental studies on the reno-protective properties of N-octanoyl dopamine in *in vivo* models of ischemia induced acute kidney injury and renal transplantation

This study was designed to investigate if the dopamine derivate N-octanoyl-dopamine (NOD) has a benefit on acute ischemic kidney injury and on the outcome of renal transplantation after cold ischemia. For that reason the effect on renal function, renal inflammation, the incurrance of rejection and on graft survival has been evaluated. After all, renal perfusion has been determined in the MRI to examine the hypothesis if NOD, known as a TRPV1-agonist, has the capacity to improve renal perfusion.

The beneficial effect of donor dopamine treatment in a setting of acute kidney injury could already be demonstrated. We have also demonstrated that NOD has nephro-protective properties *in vitro* and after bolus pre-treatment application *in vivo*.

In this study NOD treatment is exerted in three experimental settings – warm ischemia model, acute and chronic renal transplantation setting. For renal function, creatinine and urea were analyzed in the blood plasma. In addition creatinine clearance was determined in a chronic transplantation setting. Renal inflammation was constituted using immunohistochemical methods like ED1 staining for activated macrophages and MHC II staining in general for antigen presenting cells. Evaluation of acute and chronic rejection was performed using Banff criteria.

The data of this study revealed that NOD treatment over 5 days after acute kidney injury improves renal function and reduces renal inflammation which occurs after warm ischemia-reperfusion injury. The application of NOD as a therapeutic agent after renal transplantation, either in an acute or in a chronic setting, offers in contrast to the findings after acute kidney injury no beneficial effect on renal function, renal inflammation, on rejection or longtime survival.

Presumptive, the non-beneficial properties of NOD on renal transplantation could be substantially caused by kidney injuries after prolonged cold preservation which cannot attenuate by NOD application afterwards. Donor dopamine treatment before transplantation would reduce the kidney injury after cold ischemia and would probably enhance NOD's protective abilities.

Whereas NOD was identified as a TRPV1-agonist before, it has been investigated if NOD treatment ameliorates renal perfusion. Stimulation of TRPV1 is followed by the release of CGRP and substance P which are two potent vasodilators. Renal perfusion was measured in the MRI using ASL as a completely non-invasive measurement. We have shown a possible connection between perfusion and renal function as well as between the severity of vascular alterations in the graft but in general NOD treatment has no beneficial effect on renal perfusion in this study design.

8. Literaturverzeichnis

- Abragam, A. (1961). Principles of Nuclear Magnetism, Oxford University Press, New York.
- Ait-Hsiko, L., T. Kraaij, et al. (2013). "N-octanoyl-dopamine is a potent inhibitor of platelet function." Platelets **24**(6): 428-434.
- Alawi, K. and J. Keeble (2010). "The paradoxical role of the transient receptor potential vanilloid 1 receptor in inflammation." Pharmacol Ther **125**(2): 181-195.
- Amann, K., M. Buttner, et al. (2011). "[Kidney transplant pathology]." Pathologie **32**(2): 124-134.
- Angelescu, M., T. Kraus, et al. (2003). "Assessment of renal graft function by perioperative monitoring of cortical microcirculation in kidney transplantation." Transplantation **75**(8): 1190-1196.
- Arakelov, A. and F. G. Lakkis (2000). "The alloimmune response and effector mechanisms of allograft rejection." Semin Nephrol **20**(2): 95-102.
- Araujo, M. and W. J. Welch (2006). "Oxidative stress and nitric oxide in kidney function." Curr Opin Nephrol Hypertens **15**(1): 72-77.
- Arslan, F., B. Keogh, et al. (2010). "TLR2 and TLR4 in ischemia reperfusion injury." Mediators Inflamm **2010**: 704202.
- Artunc, F., C. Rossi, et al. (2011). "MRI to assess renal structure and function." Curr Opin Nephrol Hypertens **20**(6): 669-675.
- Artz, N. S., E. A. Sadowski, et al. (2011). "Arterial spin labeling MRI for assessment of perfusion in native and transplanted kidneys." Magn Reson Imaging **29**(1): 74-82.
- Barry, J. M. and J. E. Murray (2006). "The first human renal transplants." J Urol **176**(3): 888-890.
- Basile, D. P., D. Donohoe, et al. (2001). "Renal ischemic injury results in permanent damage to peritubular capillaries and influences long-term function." Am J Physiol Renal Physiol **281**(5): F887-899.
- Beck, G., P. Brinkkoetter, et al. (2004). "Clinical review: immunomodulatory effects of dopamine in general inflammation." Crit Care **8**(6): 485-491.
- Beck, G., C. Hanusch, et al. (2005). "[Effects of dopamine on cellular and humoral immune responses in septic patients]." Anaesthesist **54**(10): 1012-1020.
- Bedi, D. S., L. V. Riella, et al. (2010). "Animal models of chronic allograft injury: contributions and limitations to understanding the mechanism of long-term graft dysfunction." Transplantation **90**(9): 935-944.
- Benarroch, E. E. (2011). "CGRP Sensory neuropeptide with multiple neurologic implications." Neurology **77**(3): 281-287.

- Berger, S. P., M. Hunger, et al. (2000). "Dopamine induces the expression of heme oxygenase-1 by human endothelial cells in vitro." Kidney Int **58**(6): 2314-2319.
- BMG (2012). Gesetz zur Regelung der Entscheidungslösung im Transplantationsgesetz. Bundesgesetzblatt Jahrgang 2012 Teil I Nr. 33, Bonn 18. Juli 2012, <http://www.bmg.bund.de/>.
- Bonventre, J. V. (2007). "Pathophysiology of acute kidney injury: roles of potential inhibitors of inflammation." Contrib Nephrol **156**: 39-46.
- Bonventre, J. V. and J. M. Weinberg (2003). "Recent advances in the pathophysiology of ischemic acute renal failure." J Am Soc Nephrol **14**(8): 2199-2210.
- Bonventre, J. V. and L. Yang (2011). "Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury." J Clin Invest **121**(11): 4210-4221.
- Bonventre, J. V. and A. Zuk (2004). "Ischemic acute renal failure: an inflammatory disease?" Kidney Int **66**(2): 480-485.
- Brinkkoetter, P. T., G. C. Beck, et al. (2006). "Hypothermia-induced loss of endothelial barrier function is restored after dopamine pretreatment: role of p42/p44 activation." Transplantation **82**(4): 534-542.
- Brinkkoetter, P. T., H. Song, et al. (2008). "Hypothermic injury: the mitochondrial calcium, ATP and ROS love-hate triangle out of balance." Cell Physiol Biochem **22**(1-4): 195-204.
- Broome, D. R. (2008). "Nephrogenic systemic fibrosis associated with gadolinium based contrast agents: a summary of the medical literature reporting." Eur J Radiol **66**(2): 230-234.
- Budde, K., M. Giessing, et al. (2006). "[Modern immunosuppression following renal transplantation. Standard or tailor made?]." Urologe A **45**(1): 9-17.
- Bundesärztekammer. "Richtlinien für die Wartelistenführung und die Organvermittlung zur Nierentransplantation." from www.bundesaeztekammer.de.
- Burton, C. J. and C. R. V. Tomson (1999). "Can the use of low-dose dopamine for treatment of acute renal failure be justified?" Postgraduate Medical Journal **75**(883): 269-274.
- Cacho, D. T., A. A. Pique, et al. (2005). "Living donor renal transplantation: prognostic factors on graft survival." Transplant Proc **37**(9): 3679-3681.
- Colvin, R. B. (2007). "Antibody-mediated renal allograft rejection: diagnosis and pathogenesis." J Am Soc Nephrol **18**(4): 1046-1056.
- Colvin, R. B. and R. N. Smith (2005). "Antibody-mediated organ-allograft rejection." Nat Rev Immunol **5**(10): 807-817.
- Cornell, L. D., R. N. Smith, et al. (2008). "Kidney transplantation: mechanisms of rejection and acceptance." Annu Rev Pathol **3**: 189-220.

- Damoiseaux, J. G., E. A. Dopp, et al. (1994). "Rat macrophage lysosomal membrane antigen recognized by monoclonal antibody ED1." *Immunology* **83**(1): 140-147.
- De Backer, D., P. Biston, et al. (2010). "Comparison of dopamine and norepinephrine in the treatment of shock." *N Engl J Med* **362**(9): 779-789.
- de Groot, H. and U. Rauen (2007). "Ischemia-reperfusion injury: processes in pathogenetic networks: a review." *Transplant Proc* **39**(2): 481-484.
- de Mattos, A. M., A. J. Olyaei, et al. (2000). "Nephrotoxicity of immunosuppressive drugs: long-term consequences and challenges for the future." *Am J Kidney Dis* **35**(2): 333-346.
- Dellinger, R. P., J. M. Carlet, et al. (2004). "Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock." *Intensive Care Med* **30**(4): 536-555.
- Detre, J. A., J. S. Leigh, et al. (1992). "Perfusion Imaging." *Magnetic Resonance in Medicine* **23**(1): 37-45.
- Detre, J. A., J. Wang, et al. (2009). "Arterial spin-labeled perfusion MRI in basic and clinical neuroscience." *Curr Opin Neurol* **22**(4): 348-355.
- Dijkstra, C. D. and J. G. M. C. Damoiseaux (1993). "Macrophage Heterogeneity Established by Immunocytochemistry." *Progress in Histochemistry and Cytochemistry* **27**(2): 1-65.
- Dragun, D., U. Hoff, et al. (2001). "Prolonged cold preservation augments vascular injury independent of renal transplant immunogenicity and function." *Kidney Int* **60**(3): 1173-1181.
- DSO (2013). "Statistik - Organspender Januar bis Juni 2013."
- DSO. (2013). "Transplantierte Organe in Deutschland." from www.dso.de.
- Eltzschig, H. K. and T. Eckle (2011). "Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation." *Nat Med* **17**(11): 1391-1401.
- Eurotransplant. (2013). "Yearly Statistics 2012 - Donors, Transplants, Waiting list." from www.eurotransplant.org.
- Felten, H., M. K. Kuhlmann, et al. (1999). "[Adequate dialysis treatment in hemodialysis and peritoneal dialysis patients]." *Internist (Berl)* **40**(1): 22-36.
- Feng, N. H., H. H. Lee, et al. (2008). "Transient receptor potential vanilloid type 1 channels act as mechanoreceptors and cause substance P release and sensory activation in rat kidneys." *Am J Physiol Renal Physiol* **294**(2): F316-325.
- Feucht, H. E., E. Felber, et al. (1991). "Vascular deposition of complement-split products in kidney allografts with cell-mediated rejection." *Clin Exp Immunol* **86**(3): 464-470.
- Friese, M. A., E. Y. Jones, et al. (2005). "MHC II molecules in inflammatory diseases: interplay of qualities and quantities." *Trends in Immunology* **26**(11): 559-561.

- Golay, X., J. Hendrikse, et al. (2004). "Perfusion imaging using arterial spin labeling." Top Magn Reson Imaging **15**(1): 10-27.
- Gottmann, U., P. T. Brinkkoetter, et al. (2006). "Effect of pre-treatment with catecholamines on cold preservation and ischemia/reperfusion-injury in rats." Kidney Int **70**(2): 321-328.
- Gottmann, U., A. Notheisen, et al. (2005). "Influence of donor pretreatment with dopamine on allogeneic kidney transplantation after prolonged cold storage in rats." Transplantation **79**(10): 1344-1350.
- Gueler, F., W. Gwinner, et al. (2004). "Long-term effects of acute ischemia and reperfusion injury." Kidney Int **66**(2): 523-527.
- Haller, H. (2007). "Langzeitprobleme in der Nierentransplantation." Der Nephrologe **2**(3): 175-181.
- Haller, H., N. Richter, et al. (2009). "[Current problems of kidney transplantation]." Internist (Berl) **50**(5): 523-535.
- Halloran, P. F., J. Homik, et al. (1997). "The "injury response": a concept linking nonspecific injury, acute rejection, and long-term transplant outcomes." Transplant Proc **29**(1-2): 79-81.
- Harada, N., K. Okajima, et al. (2002). "Ischemia/reperfusion-induced increase in the hepatic level of prostacyclin is mainly mediated by activation of capsaicin-sensitive sensory neurons in rats." J Lab Clin Med **139**(4): 218-226.
- Harrison, S. and P. Geppetti (2001). "Substance p." Int J Biochem Cell Biol **33**(6): 555-576.
- Hoeger, S., U. Gottmann, et al. (2007). "Dopamine treatment in brain-dead rats mediates anti-inflammatory effects: the role of hemodynamic stabilization and D-receptor stimulation." Transpl Int **20**(9): 790-799.
- Hoeger, S., G. Lueg, et al. (2011). "UW is superior compared with HTK after prolonged preservation of renal grafts." J Surg Res **170**(1): e149-157.
- Hoeger, S., A. Reisenbuechler, et al. (2008). "Donor dopamine treatment in brain dead rats is associated with an improvement in renal function early after transplantation and a reduction in renal inflammation." Transpl Int **21**(11): 1072-1080.
- Hollenberg, S. M., T. S. Ahrens, et al. (2004). "Practice parameters for hemodynamic support of sepsis in adult patients: 2004 update." Crit Care Med **32**(9): 1928-1948.
- Holmes, C. L. (2005). "Vasoactive drugs in the intensive care unit." Curr Opin Crit Care **11**(5): 413-417.
- Horbelt, M., S. Y. Lee, et al. (2007). "Acute and chronic microvascular alterations in a mouse model of ischemic acute kidney injury." Am J Physiol Renal Physiol **293**(3): F688-695.
- Hostetter, T. H. (1995). "Progression of renal disease and renal hypertrophy." Annu Rev Physiol **57**: 263-278.

- Hugo, C., G. Schott, et al. (2008). "[ABO-incompatible renal transplantation--why and how?]." Urologe A **47**(9): 1074, 1076-1078.
- Inaba, K. and M. Inaba (2005). "Antigen recognition and presentation by dendritic cells." International Journal of Hematology **81**(3): 181-187.
- Jacquet, A., H. Francois, et al. (2008). "Prevention of calcineurin inhibitor nephrotoxicity in renal transplantation." Transpl Immunol **20**(1-2): 29-31.
- Jang, H. R. and H. Rabb (2009). "The innate immune response in ischemic acute kidney injury." Clinical Immunology **130**(1): 41-50.
- Jin, H., P. Sun, et al. (2012). "Involvement of perivascular nerves and transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) in vascular responses to histamine in rat mesenteric resistance arteries." Eur J Pharmacol **680**(1-3): 73-80.
- Jones, E. Y., L. Fugger, et al. (2006). "MHC class II proteins and disease: a structural perspective." Nat Rev Immunol **6**(4): 271-282.
- Kadieva, V. S., L. Friedman, et al. (1993). "The effect of dopamine on graft function in patients undergoing renal transplantation." Anesth Analg **76**(2): 362-365.
- Kapper, S., G. Beck, et al. (2002). "Modulation of chemokine production and expression of adhesion molecules in renal tubular epithelial and endothelial cells by catecholamines." Transplantation **74**(2): 253-260.
- Kim, J., K. J. Jung, et al. (2010). "Reactive oxygen species differently regulate renal tubular epithelial and interstitial cell proliferation after ischemia and reperfusion injury." American Journal of Physiology-Renal Physiology **298**(5): F1118-F1129.
- Kim, S. G. (1995). "Quantification of relative cerebral blood flow change by flow-sensitive alternating inversion recovery (FAIR) technique: application to functional mapping." Magn Reson Med **34**(3): 293-301.
- Kindgen-Milles, D. and J. Tarnow (1997). "[Low dosage dopamine improves kidney function: current status of knowledge and evaluation of a controversial topic]." Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther **32**(6): 333-342.
- Kinsey, G. R., L. Li, et al. (2008). "Inflammation in acute kidney injury." Nephron Exp Nephrol **109**(4): e102-107.
- Kircher, T., S. Gauggel, et al. (2008). *Methodik der funktionellen Magnetresonanztomographie-Neuropsychologie der Schizophrenie*, Springer Berlin Heidelberg: 19-35.
- Koo, D. D., K. I. Welsh, et al. (1998). "Ischemia/reperfusion injury in human kidney transplantation: an immunohistochemical analysis of changes after reperfusion." Am J Pathol **153**(2): 557-566.

- Kunzendorf, U., L. Renders, et al. (2007). "[Chronic renal failure and transplantation]." Internist (Berl) **48**(8): 804-812.
- Kwong, K. K., D. A. Chesler, et al. (1994). "Perfusion MR imaging." in: "Proc., Society of Magnetic Resonance, 1994": p. 1005.
- Lanzman, R. S., H. J. Wittsack, et al. (2010). "Quantification of renal allograft perfusion using arterial spin labeling MRI: initial results." European Radiology **20**(6): 1485-1491.
- Lee, S. (1967). "An improved technique of renal transplantation in the rat." Surgery **61**(5): 771-773.
- Levitt, M. H. (2008). Spin dynamics: basics of nuclear magnetic resonance., John Wiley & Sons.
- Li, J. and D. H. Wang (2008). "Increased GFR and renal excretory function by activation of TRPV1 in the isolated perfused kidney." Pharmacol Res **57**(3): 239-246.
- Liptak, P. and B. Ivanyi (2006). "Primer: Histopathology of calcineurin-inhibitor toxicity in renal allografts." Nat Clin Pract Nephrol **2**(7): 398-404; quiz following 404.
- Liss, P., E. F. Cox, et al. (2013). "Imaging of intrarenal haemodynamics and oxygen metabolism." Clin Exp Pharmacol Physiol **40**(2): 158-167.
- Liu, Z., S. Hoeger, et al. (2007). "Donor dopamine pretreatment inhibits tubulitis in renal allografts subjected to prolonged cold preservation." Transplantation **83**(3): 297-303.
- Losel, R. M., U. Schnetzke, et al. (2010). "N-octanoyl dopamine, a non-hemodynamic dopamine derivative, for cell protection during hypothermic organ preservation." PLoS One **5**(3): e9713.
- Marik, P. E. (2002). "Low-dose dopamine: a systematic review." Intensive Care Med **28**(7): 877-883.
- Marshall, R., N. Ahsan, et al. (1996). "Adverse effect of donor vasopressor support on immediate and one-year kidney allograft function." Surgery **120**(4): 663-665; discussion 666.
- Martirosian, P., A. Boss, et al. (2010). "Magnetic resonance perfusion imaging without contrast media." European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging **37**: S52-S64.
- Mengel, M., B. Sis, et al. (2012). "Banff 2011 Meeting report: new concepts in antibody-mediated rejection." Am J Transplant **12**(3): 563-570.
- Michaely, H. J., S. O. Schoenberg, et al. (2004). "Renal disease: value of functional magnetic resonance imaging with flow and perfusion measurements." Invest Radiol **39**(11): 698-705.
- Michaely, H. J., S. O. Schoenberg, et al. (2006). "Renal artery stenosis: functional assessment with dynamic MR perfusion measurements--feasibility study." Radiology **238**(2): 586-596.
- Mizutani, A., K. Okajima, et al. (2009). "Activation of sensory neurons reduces ischemia/reperfusion-induced acute renal injury in rats." Anesthesiology **110**(2): 361-369.
- Mutschler, E., G. Geisslinger, et al., Eds. (2013). Mutschler Arzneimittelwirkungen - Pharmakologie, klinische Pharmakologie, Toxikologie, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart.

8. Literaturverzeichnis

- Naesens, M., D. R. Kuypers, et al. (2009). "Calcineurin inhibitor nephrotoxicity." Clin J Am Soc Nephrol **4**(2): 481-508.
- Nankivell, B. J. and S. I. Alexander (2010). "Rejection of the kidney allograft." N Engl J Med **363**(15): 1451-1462.
- Nankivell, B. J. and D. R. Kuypers (2011). "Diagnosis and prevention of chronic kidney allograft loss." Lancet **378**(9800): 1428-1437.
- Nitz, W. R., V. M. Runge, et al. (2007). Praxiskurs MRT - Anleitung zur MRT-Physik über klinische Bildbeispiele, Thieme Verlag KG.
- Notohamiprodjo, M., M. F. Reiser, et al. (2010). "Diffusion and perfusion of the kidney." Eur J Radiol **76**(3): 337-347.
- Odudu, A., S. T. Francis, et al. (2012). "MRI for the assessment of organ perfusion in patients with chronic kidney disease." Curr Opin Nephrol Hypertens **21**(6): 647-654.
- ONT (2013). "Organización Nacional de Trasplantes - Datos de Donación y Trasplante."
- Overbeck, I., M. Bartels, et al. (2005). "Changes in quality of life after renal transplantation." Transplant Proc **37**(3): 1618-1621.
- Paller, M. S. (1992). "Free Radical-Mediated Postischemic Injury in Renal-Transplantation." Renal Failure **14**(3): 257-260.
- Paller, M. S., J. R. Hoidal, et al. (1984). "Oxygen free radicals in ischemic acute renal failure in the rat." J Clin Invest **74**(4): 1156-1164.
- Pascual, M., T. Theruvath, et al. (2002). "Strategies to improve long-term outcomes after renal transplantation." N Engl J Med **346**(8): 580-590.
- Perazella, M. A. (2009). "Current status of gadolinium toxicity in patients with kidney disease." Clin J Am Soc Nephrol **4**(2): 461-469.
- Perico, N., D. Cattaneo, et al. (2004). "Delayed graft function in kidney transplantation." Lancet **364**(9447): 1814-1827.
- Petersen, E. T., I. Zimine, et al. (2006). "Non-invasive measurement of perfusion: a critical review of arterial spin labelling techniques." Br J Radiol **79**(944): 688-701.
- Pienaar, H., I. Schwartz, et al. (1990). "Function of kidney grafts from brain-dead donor pigs. The influence of dopamine and triiodothyronine." Transplantation **50**(4): 580-582.
- Pierce, J. D., D. A. Morris, et al. (2002). "Understanding renal dose dopamine." J Infus Nurs **25**(6): 365-371.
- Pratschke, J., S. Weiss, et al. (2008). "Review of nonimmunological causes for deteriorated graft function and graft loss after transplantation." Transpl Int **21**(6): 512-522.

- Quiroga, I., P. McShane, et al. (2006). "Major effects of delayed graft function and cold ischaemia time on renal allograft survival." Nephrol Dial Transplant **21**(6): 1689-1696.
- Racusen, L. C., P. F. Halloran, et al. (2004). "Banff 2003 meeting report: new diagnostic insights and standards." Am J Transplant **4**(10): 1562-1566.
- Racusen, L. C., K. Solez, et al. (1999). "The Banff 97 working classification of renal allograft pathology." Kidney Int **55**(2): 713-723.
- Regele, H. (2008). "[The role of endothelial cells in allograft rejection]." Pathologie **29 Suppl 2**: 141-144.
- Renders, L. and U. Kunzendorf (2007). "Immunsuppressive Medikamente in der Therapie nach Nierentransplantation." Der Nephrologe **2**(3): 157-166.
- Rezzani, R. (2006). "Exploring cyclosporine A-side effects and the protective role-played by antioxidants: the morphological and immunohistochemical studies." Histol Histopathol **21**(3): 301-316.
- Salahudeen, A. K. (1999). "Free radicals in kidney disease and transplantation." Saudi J Kidney Dis Transpl **10**(2): 137-143.
- Salahudeen, A. K. (2004). "Cold ischemic injury of transplanted kidneys: new insights from experimental studies." Am J Physiol Renal Physiol **287**(2): F181-187.
- Salahudeen, A. K., N. Haider, et al. (2004). "Cold ischemia and the reduced long-term survival of cadaveric renal allografts." Kidney Int **65**(2): 713-718.
- Salahudeen, A. K., M. Joshi, et al. (2001). "Apoptosis versus necrosis during cold storage and rewarming of human renal proximal tubular cells." Transplantation **72**(5): 798-804.
- Schick, F. (2007). "[The bases of magnetic resonance tomography]." Radiologe **47 Suppl 1**: S7-23; quiz S24-25.
- Schnuelle, P., S. Berger, et al. (2001). "Effects of catecholamine application to brain-dead donors on graft survival in solid organ transplantation." Transplantation **72**(3): 455-463.
- Schnuelle, P., U. Gottmann, et al. (2009). "Effects of donor pretreatment with dopamine on graft function after kidney transplantation: a randomized controlled trial." JAMA **302**(10): 1067-1075.
- Schnuelle, P., D. Lorenz, et al. (1999). "Donor catecholamine use reduces acute allograft rejection and improves graft survival after cadaveric renal transplantation." Kidney Int **56**(2): 738-746.
- Schnuelle, P., D. Lorenz, et al. (1998). "Impact of renal cadaveric transplantation on survival in end-stage renal failure: evidence for reduced mortality risk compared with hemodialysis during long-term follow-up." J Am Soc Nephrol **9**(11): 2135-2141.

- Schnuelle, P., B. A. Yard, et al. (2004). "Impact of donor dopamine on immediate graft function after kidney transplantation." Am J Transplant **4**(3): 419-426.
- Shimizu, T., T. Tanabe, et al. (2012). "Acute vascular rejection after renal transplantation and isolated v-lesion." Clinical Transplantation **26**: 2-8.
- Shin, J.-S., M. Ebersold, et al. (2006). "Surface expression of MHC class II in dendritic cells is controlled by regulated ubiquitination." Nature **444**(7115): 115-118.
- Sieber, M. A., H. Pietsch, et al. (2008). "A preclinical study to investigate the development of nephrogenic systemic fibrosis: a possible role for gadolinium-based contrast media." Invest Radiol **43**(1): 65-75.
- Sis, B., M. Mengel, et al. (2010). "Banff '09 meeting report: antibody mediated graft deterioration and implementation of Banff working groups." Am J Transplant **10**(3): 464-471.
- Snoeijs, M. G., L. W. van Heurn, et al. (2010). "Biological modulation of renal ischemia-reperfusion injury." Curr Opin Organ Transplant **15**(2): 190-199.
- Solez, K. (2010). "History of the Banff classification of allograft pathology as it approaches its 20th year." Curr Opin Organ Transplant **15**(1): 49-51.
- Solez, K., R. A. Axelsen, et al. (1993). "International Standardization of Criteria for the Histologic Diagnosis of Renal-Allograft Rejection - the Banff Working Classification of Kidney-Transplant Pathology." Kidney International **44**(2): 411-422.
- Solez, K., R. B. Colvin, et al. (2008). "Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions." Am J Transplant **8**(4): 753-760.
- Solez, K., R. B. Colvin, et al. (2007). "Banff '05 Meeting Report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ('CAN')." Am J Transplant **7**(3): 518-526.
- Stöcker, T. and N. J. Shah (2007). *Grundlagen der MR-Bildgebung - Funktionelle MRT in Psychiatrie und Neurologie*. F. Schneider and G. R. Fink, Springer Berlin Heidelberg: 61-78.
- Sutton, T. A., C. J. Fisher, et al. (2002). "Microvascular endothelial injury and dysfunction during ischemic acute renal failure." Kidney Int **62**(5): 1539-1549.
- Terasaki, P. I. and J. Cai (2005). "Humoral theory of transplantation: further evidence." Curr Opin Immunol **17**(5): 541-545.
- Tsagogiorgas, C., J. Wedel, et al. (2012). "N-octanoyl-Dopamine Is an Agonist at the Capsaicin Receptor TRPV1 and Mitigates Is Chemia-Induced Acute Kidney Injury in Rat." PLoS One **7**(8): e43525.
- Tyden, G. (2007). "The European experience." Transplantation **84**(12): S2-S3.

- Tyden, G., G. Kumlien, et al. (2003). "Successful ABO-incompatible kidney transplantations without splenectomy using antigen-specific immunoadsorption and rituximab." Transplantation **76**(4): 730-731.
- Ueda, K., F. Tsuji, et al. (2009). "Preventive effect of SA13353 [1-[2-(1-adamantyl)ethyl]-1-pentyl-3-[3-(4-pyridyl)propyl]urea], a novel transient receptor potential vanilloid 1 agonist, on ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats." J Pharmacol Exp Ther **329**(1): 202-209.
- Ueda, K., F. Tsuji, et al. (2008). "Preventive effect of TRPV1 agonists capsaicin and resiniferatoxin on ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats." J Cardiovasc Pharmacol **51**(5): 513-520.
- Uusaro, A. and J. A. Russell (2000). "Could anti-inflammatory actions of catecholamines explain the possible beneficial effects of supranormal oxygen delivery in critically ill surgical patients?" Intensive Care Med **26**(3): 299-304.
- Valujskikh, A. and P. S. Heeger (2003). "Emerging roles of endothelial cells in transplant rejection." Curr Opin Immunol **15**(5): 493-498.
- van den Berg, T. K., E. A. Dopp, et al. (2001). "Rat macrophages: membrane glycoproteins in differentiation and function." Immunol Rev **184**: 45-57.
- van der Vliet, J. A. and M. C. Warle (2013). "The need to reduce cold ischemia time in kidney transplantation." Curr Opin Organ Transplant **18**(2): 174-178.
- Vasu, T. S., R. Cavallazzi, et al. (2012). "Norepinephrine or dopamine for septic shock: systematic review of randomized clinical trials." J Intensive Care Med **27**(3): 172-178.
- Vathsala, A. (2005). "Preventing renal transplant failure." Ann Acad Med Singapore **34**(1): 36-43.
- Waaga, A. M., M. Gasser, et al. (2000). "Mechanisms of chronic rejection." Curr Opin Immunol **12**(5): 517-521.
- Wang, J. J., K. S. Hendrich, et al. (1998). "Perfusion quantitation in transplanted rat kidney by MRI with arterial spin labeling." Kidney Int **53**(6): 1783-1791.
- Wang, L. and D. H. Wang (2005). "TRPV1 gene knockout impairs postischemic recovery in isolated perfused heart in mice." Circulation **112**(23): 3617-3623.
- Wang, M., P. Ji, et al. (2012). "TRPV1 agonist capsaicin attenuates lung ischemia-reperfusion injury in rabbits." J Surg Res **173**(1): 153-160.
- Weishaupt, D., V. D. Köchli, et al. (2009). *Wie funktioniert MRI? Eine Einführung in Physik und Funktionsweise der Magnetresonanztomographie*, Springer Berlin Heidelberg.
- White, E., W. H. Hildemann, et al. (1969). "Chronic kidney allograft reactions in rats." Transplantation **8**(5): 602-617.
- White, J. P., L. Urban, et al. (2011). "TRPV1 function in health and disease." Curr Pharm Biotechnol **12**(1): 130-144.

8. Literaturverzeichnis

- Winter, J. D., K. S. St Lawrence, et al. (2011). "Quantification of Renal Perfusion: Comparison of Arterial Spin Labeling and Dynamic Contrast-Enhanced MRI." Journal of Magnetic Resonance Imaging **34**(3): 608-615.
- Wolfe, R. A., V. B. Ashby, et al. (1999). "Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant." N Engl J Med **341**(23): 1725-1730.
- Wu, H., G. Chen, et al. (2007). "TLR4 activation mediates kidney ischemia/reperfusion injury." J Clin Invest **117**(10): 2847-2859.
- Yard, B., G. Beck, et al. (2004). "Prevention of cold-preservation injury of cultured endothelial cells by catecholamines and related compounds." Am J Transplant **4**(1): 22-30.
- Zhong, B. and D. H. Wang (2008). "N-oleoyldopamine, a novel endogenous capsaicin-like lipid, protects the heart against ischemia-reperfusion injury via activation of TRPV1." Am J Physiol Heart Circ Physiol **295**(2): H728-735.
- Zimmer, F., F. G. Zollner, et al. (2013). "Quantitative renal perfusion measurements in a rat model of acute kidney injury at 3T: testing inter- and intramethodical significance of ASL and DCE-MRI." PLoS One **8**(1): e53849.
- Zweier, J. L. and M. A. Talukder (2006). "The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury." Cardiovasc Res **70**(2): 181-190.

9. Im Rahmen der Dissertation veröffentlichte Arbeiten

9.1. Kongressabstracts

Sarah Klotz, Fabian Zimmer, Frank G. Zöllner, Charalambos Tsagogiorgas, Bernhard K. Krämer, Benito A. Yard, Lothar R. Schad, Simone Hoeger:

Arterial Spin Labeling: A noninvasive method to assess renal perfusion after ischemia-reperfusion injury.

24th International Congress of the Transplantation Society 15. - 19.07.2012 Berlin

Simone Hoeger, **Sarah Klotz**, Lukas Nickels, Ruediger Waldherr, Urs Benck, Peter Schnuelle, Bernhard K Krämer, Benito Yard:

Donor management with N-Octanoyl-Dopamine improves renal function and reduces inflammation in an experimental brain death transplantation model.

24th International Congress of the Transplantation Society 15. - 19.07.2012 Berlin

9.2. Kongressvorträge

Rahel Spindler, Jonas Jarczyk, **Sarah Klotz**, Lukas Nickels, Urs Benck, Ruediger Waldherr, Peter Schnuelle, Bernhard K Krämer, Benito Yard, Simone Hoeger:

Donor management with N-Octanoyl-Dopamine improves renal function and reduces inflammation in an experimental brain death transplantation model.

Kongress für Nephrologie 06. - 09.10.12 Hamburg

9.3. Publikationen

Fabian Zimmer, Frank G. Zöllner, Simone Hoeger, **Sarah Klotz**, Charalambos Tsagogiorgas, Bernhard K. Krämer, Lothar R. Schad:

Quantitative renal perfusion measurements in a rat model of acute kidney injury at 3T: Testing inter- and intramethodical significance of ASL and DCE-MRI.

PLoS One. 2013; 8(1)

10. Danksagung

Im Rahmen dieser Arbeit möchte ich nun meinen Dank den Personen widmen, ohne deren Unterstützung und Rat eine Fertigstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ich bedanke mich herzlichst...

...bei Prof. Dr. Bernhard Krämer, Direktor der V. Medizinischen Klinik, für die freundliche Überlassung des Themas und die Möglichkeit für dessen Erarbeitung.

...bei Prof. Dr. Benito Yard und PD Dr. Jakob Walter, meine Doktorväter und Betreuer, die mir stets bei allen aufkommenden Schwierigkeiten beratend und inspirierend zur Seite standen.

...bei PD Dr. Simone Höger, von deren mikrochirurgischen und fachlichen Expertise ich alles lernen konnte und die immer für alle Fragen ein großes offenes Ohr hatte.

...bei Dr. Frank Zöllner und bei Fabian Zimmer aus der Computerunterstützten Klinischen Medizin der Medizinischen Fakultät Mannheim, für die sehr gute Zusammenarbeit und Unterstützung, für ihren unerschrockenen Elan bei den zahlreichen MRT - Messungen und dafür, dass sie immer bereitwillig auf die gleichen Fragen verständliche Antworten für mich hatten.

...bei Susanne Behr, die mir während der praktischen Durchführung zu jeder Zeit zur Seite stand und mir Mut zugesprochen hat, wenn es der Gott der Forschung mal wieder nicht nett mit mir meinte.

...bei Katharina Prem, in Vertretung für alle anderen Mitarbeiter des Labors im Zentrum für Medizinische Forschung, für die tatkräftige Unterstützung und Beratung im Bereich der Histologie und Immunhistologie.

...bei Prof. Rüdiger Waldherr, für die Unterstützung bei der Banff - Klassifikation.

Weiterhin gilt mein Dank im privaten Umfeld...

...meinen Eltern, die mich immer meinen Weg haben gehen lassen und mich dabei stets unterstützt und ermutigt haben.

...meinen Großeltern aus Golm, die immer selbstverständlich geholfen haben, wenn es eng wurde. Opa, ich bedauere zutiefst, dass du diesen wichtigen Abschnitt der letzten Jahre nicht mehr erleben dürftest.

...Sina Wieczorek und Dörte Paschen, die mich durch mein Studium begleitet, mich stets motiviert haben und die Freundinnen sind, die da waren, als man sie gebraucht hat.

...allen anderen Personen, die mich auf meinem Weg bisher begleitet haben.

Zu guter Letzt möchte ich dem wichtigsten Menschen in meinem Leben danken, den ich neben meiner Familie immer an meiner Seite weiß – meinem Mann Robert.

Du warst immer da, hast alles mit mir geteilt – die höchsten Hochs und die tiefsten Tiefs. Auch im fachlichen Bereich warst du stets meine Quelle der Inspiration, die mich zum kritischen Nachdenken animiert hat. Ich danke dir für alles!

11. Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Freien Universität Berlin zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Mannheim, den 11.12.13

Sarah Klotz