

Aus dem Institut für Veterinär-Anatomie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Untersuchung zur Retentions- und Perfusionszeit der Niere nach
Applikation von Röntgenkontrastmitteln

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

vorgelegt von
Janine Sommer
Tierärztin aus Frankfurt am Main

Berlin 2010
Journal-Nr.: 3446

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. J. Plendl
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Matthias Bräutigam
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. H. Hartmann

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

contrast media, kidneys, diagnostic techniques, perfusion, retention,
rats, rabbits

Tag der Promotion: 02.03.2011

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: 978-3-86664-949-1

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2010

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.

Coverbild © krishnacreations - Fotolia.com

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2011

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1.	Ziel der Arbeit	7
2.	Literaturübersicht	8
2.1.	Röntgenkontrastmittel	8
2.2.	Nebenwirkungen von Röntgenkontrastmitteln / Contrast Induced Nephropathy	10
2.2.1.	Pathogenese	12
2.2.2.	Differentialdiagnose	15
2.2.3.	Therapie	15
2.2.4.	Prävention	15
2.3.	Anatomie und Physiologie der Niere	18
2.3.1.	Anatomie der Rattenniere	18
2.3.2.	Anatomische Besonderheiten der Kaninchen-Niere	20
2.3.3.	Hämodynamik und Sauerstoffverbrauch	20
2.3.4.	Physiologie der Niere	22
2.4.	Spezifische Untersuchungen zur CIN	23
2.4.1.	Genexpressionsanalyse	23
2.4.2.	Kontrastmittel gestützte Sonographie	25
3.	Material und Methoden	30
3.1.	Untersuchte Tiere	30
3.2.	Anästhesie und Euthanasie der Versuchstiere	30
3.3.	Kontrastmittel	31
3.4.	Retention	32
3.5.	Genexpressionsanalyse / Proteinbestimmung	36
3.6.	Zytotoxizität	39
3.6.1.	Mitochondriale Aktivität	40
3.6.2.	Adenosintriphosphat (ATP) –Bestimmung	40
3.7.	Perfusion / Sonographie	41
4.	Ergebnisse	46
4.1.	Retention der Kontrastmittel in der Niere	46
4.2.	Genexpressionsanalyse / Proteinbestimmung	59
4.3.	Zytotoxizität	63
4.3.1.	Mitochondriale Aktivität	63
4.3.2.	Adenosintriphosphat (ATP) –Bestimmung	65
4.4.	Perfusion	66
5.	Diskussion	67
5.1.	Retention	67
5.2.	Genexpressionsanalyse	70
5.3.	Zytotoxizität	71
5.4.	Perfusion	72
6.	Zusammenfassung	74
7.	Abbildungsverzeichnis	78
8.	Tabellenverzeichnis	79
9.	Abkürzungsverzeichnis	80
10.	Literaturverzeichnis	82
11.	Danksagung	93
12.	Publikationsverzeichnis	95
13.	Selbstständigkeitserklärung	96

1. Ziel der Arbeit

Es ist davon auszugehen, dass die Inzidenz von Contrast Induced Nephropathy (CIN) in den kommenden Jahren zunehmen wird, da einerseits die Anzahl an Nieren-insuffizienten Patienten als auch die Anzahl Kontrastmittel-verstärkter CT Untersuchungen ansteigen wird. Ziel dieser Arbeit ist es, mögliche Unterschiede der Wirkung auf die Niere nach Applikation von nicht-ionischen monomeren Kontrastmitteln bzw. nicht-ionischen dimeren Kontrastmitteln zu untersuchen. Insbesondere soll dabei die Bedeutung der Viskosität und Osmolarität aufgeklärt werden.

In einem ersten Schritt wird dazu die Exposition der Niere durch Röntgenkontrastmittel untersucht. Dafür wird die Retentionszeit von nicht-ionischen monomeren Kontrastmitteln bzw. nicht-ionischen dimeren verglichen. Um die Retention von Kontrastmitteln zu verifizieren, werden computertomographische Bilder im Stunden- und Tagesverlauf erstellt. Das Maß der Iodexposition wird anschließend mit Hilfe der Hounsfield-Einheit errechnet. Um den Gesamt-Iodgehalt der Nieren nach Applikation von Röntgenkontrastmitteln zu ermitteln, wird die Iodkonzentration mittels Röntgenfluoreszenzanalyse gemessen.

In einem weiteren Schritt wird mittels Biomarker-Expression der direkte Einfluss von Kontrastmitteln auf Nierenzellen *in vivo* untersucht. Dazu wird die Expression von verschiedenen Biomarkern auf RNA- und Protein-Ebene bestimmt, um einen Rückschluss auf eine eventuelle Schädigung ziehen zu können.

Des Weiteren werden *in vitro* mögliche Unterschiede bezüglich des zytotoxischen Potentials von nicht-ionischen monomeren Kontrastmitteln bzw. nicht-ionischen dimeren Röntgenkontrastmitteln auf die Nierentubuluszellen untersucht.

Mit Hilfe der Kontrastmittel-gestützten Sonographie werden physiologische Veränderungen der Nierenperfusion nach Gabe von Röntgen-Kontrastmitteln evaluiert.

In den letzten Jahren wurde ein signifikanter Anstieg der an Diabetes mellitus und damit einhergehendem Nierenversagen erkrankten Personen um 4 –bis 6 % pro Jahr beobachtet (Bartorelli and Marenzi, 2008). Diabetisch bedingte Nephropathie-Patienten weisen ein erhöhtes Risiko auf, CIN zu entwickeln. In diesem Zusammenhang werden neben gesunden Tieren auch ZSF1-Ratten als gut evaluiertes Rattenmodell mit Nephropathie und Diabetes mellitus untersucht (Tofovic *et al.*, 2000; Tofovic and Jackson, 2003).

2. Literaturübersicht

2.1. Röntgenkontrastmittel

Kontrastmittel sind Arzneimittel, mit deren Hilfe die Auswertung des Ergebnisses verschiedener bildgebender Verfahren verfeinert werden kann. Strukturen und Funktionen des Patientenkörpers können auf diese Art und Weise besser dargestellt werden. Kontrastmittel werden unter anderem als Hilfsmittel der Röntgendiagnostik, Computertomographie, Ultraschall Diagnostik und Magnetresonanztomographie eingesetzt. In Röntgendiagnostik und Computertomographie werden im Wesentlichen iodhaltige Kontrastmittel eingesetzt. Das Element Iod besitzt durch seine hohe Ordnungszahl im Energiebereich der verwendeten Röntgenstrahlung einen hohen Masseabsorptionskoeffizienten. Zusätzlich hängt die Absorptionskapazität von der Anzahl der Iodatome im jeweiligen Molekül ab. Drei Iodatome sind dabei im organischen Molekül des Kontrastmittels jeweils mit einem Benzolring kovalent verbunden.

Die Röntgenkontrastmittel können aufgrund ihrer Ladung der Seitenketten in ionische und nicht-ionische Kontrastmittel sowie aufgrund der Anzahl der Triiodbenzoesäure in monomere und dimere Kontrastmittel unterteilt werden (siehe Abbildung 1).

Diese strukturellen Unterschiede verursachen unterschiedliche physikochemische Eigenschaften (Bartorelli, 2006). Die wichtigsten Unterschiede sind dabei die Viskosität und die Osmolarität. Im Allgemeinen zeichnen sich nicht-ionische monomere Kontrastmittel durch eine sehr geringe Viskosität und eine höhere Osmolarität in Relation zu Säugetierblut aus. Nicht-ionische dimere Kontrastmittel weisen dagegen eine hohe Viskosität auf und sind Blut-isoton (Solomon *et al.*, 2006). Für die Viskosität eines Kontrastmittels sind neben der Form, der Größe des Moleküls, der Anzahl der substituierten Hydroxylgruppen insbesondere Temperatur und Konzentration des Kontrastmittels entscheidend.

Weitere Unterschiede zwischen den Kontrastmitteln ergeben sich hinsichtlich ihrer Molekültoxizität, Hydrophilie, Plasmaproteinbindung und der damit verbundenen biologischen Verfügbarkeit.

Die Molekültoxizität ergibt sich aus dem Aufbau und der Bindungskapazität des Moleküls und ist bei Kontrastmitteln allgemein sehr gering. Nicht-ionische Kontrastmittel zeigen ein Höchstmaß an Hydrophilie. Die Anzahl und Anordnung der Hydroxyl- und Methylsubstituenten ist für die hydrophilen Eigenschaften des Kontrastmittels verantwortlich. Kontrastmittel der ersten Generation - die ionischen Kontrastmittel - sind elektrisch geladen. Diese Ladungen verursachen häufig unerwünschte Interaktionen mit dem Organismus. Auch

kann die Anwendung stark hypertoner Präparate Störungen des Wasser- und Elektrolythaushaltes (Hypovolämie, Vasodilatation, Blutdruckabfall), aber auch lokalen Schmerz an der Applikationsstelle zur Folge haben. Aus diesem Grund sind bis heute fast ausschließlich nichtionische Kontrastmittel im Einsatz (Wolf *et al.*, 1989; Almen, 1990; Katayama *et al.*, 1990; Andersen *et al.*, 1994).

Zu den am häufigsten verwendeten nicht-ionischen monomeren Kontrastmitteln zählen z.B. Iopromid (Ultravist[®], Bayer Schering Pharma, Berlin, Deutschland), Iohexol (z.B. Omnipaque[®], Bayer Schering Pharma, Berlin, Deutschland), Iopamidol (Iopamiron[®], Bayer Schering Pharma, Berlin, Deutschland), Iomeprol (Imeron[®], Bracco Altana Pharma, Konstanz, Deutschland). Zu den nicht-ionischen dimeren Kontrastmitteln werden u.a. Iodixanol (Visipaque[®], GE-Healthcare, München, Deutschland) und Iotrolan (Isovist[®], Bayer Schering Pharma, Berlin, Deutschland) gerechnet.

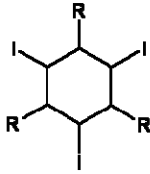
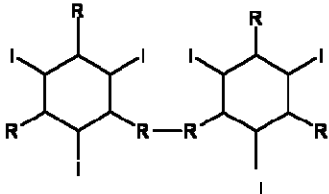
		Wirkstoff	Produkt
Monomere Kontrastmittel		Iopromid	Ultravist [®]
Dimere Kontrastmittel		Iodixanol	Visipaque [®]

Abbildung 1: Chemische Struktur monomerer und dimerer nicht-ionischer Röntgenkontrastmittel.

Die Ausscheidung der intravasal applizierten Röntgenkontrastmittel erfolgt zu 95 % renal über glomeruläre Filtration und ohne nennenswerte tubuläre Exkretion oder Reabsorption. Minimale Mengen der Kontrastmittel werden zudem über Tränen-, Schweiß- und Speicheldrüsen eliminiert. Diese Substanzen sind im Allgemeinen nicht in der Lage, Zellmembranen zu passieren.

2.2. Nebenwirkungen von Röntgenkontrastmitteln / Contrast Induced Nephropathy

Moderne Röntgenkontrastmittel zeichnen sich durch eine exzellente Verträglichkeit aus. Jedoch können bei Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion nach Applikation erhebliche Nebenwirkungen, CIN auftreten (Ideo *et al.*, 1994; Persson *et al.*, 2005). Bei diesen Patienten kann eine Verschlechterung der Nierenfunktion bis hin zum plötzlichen akuten Nierenversagen auftreten. Der Begriff CIN definiert sich als eine akute Beeinträchtigung der Nierenfunktion nach Applikation von Kontrastmitteln und ist eine der häufigsten Ursachen für ein erworbenes akutes Nierenversagen (Hou *et al.*, 1983; Nash *et al.*, 2002; Pannu *et al.*, 2006).

Verschiedene Krankheitsbilder und Umstände erhöhen die Inzidenz CIN zu entwickeln. Dazu können eine bereits vorbestehende Niereninsuffizienz, wie sie auch altersbedingt auftritt, Diabetes mellitus, Herzinsuffizienz, Dehydratation, Leberzirrhose, Multiples Myelom, Aszites und die Einnahme von nephrotoxischen Medikamenten gezählt werden (Berns, 1989; Lautin *et al.*, 1991; Katzberg, 1997). Des Weiteren spielen die Menge, die Konzentration und die Art der verwendeten Kontrastmittel eine nicht zu vernachlässigende Rolle (Persson, 2006). Mit Zunahme der applizierten Menge und der wiederholten Anwendung steigt das Risiko für vorbelastete Patienten deutlich an (Cigarroa *et al.*, 1989).

Die Pathogenese von CIN ist nicht vollständig geklärt; es wird vermutet, dass es sich um ein multifaktorielles Geschehen handelt (Barrett, 1994; Möckel, 2002; Persson *et al.*, 2005). Man geht davon aus, dass eine Kombination aus direkten toxischen Effekten auf die epithelialen Tubuluszellen und eine renale Ischämie ausschlaggebend für das Entstehen der CIN sind (Persson and Tepel, 2006; Bartorelli and Marenzi, 2008). Als klinischer Parameter der CIN gilt nach der zumeist in der Literatur vertretenen Ansicht der Anstieg des Serumkreatininspiegels um 25 % (0,5 mg/dL) vom Basiswert bzw. der Abfall der glomerulären Filtrationsrate (GFR) um 25 % bei einem Ausschluss einer Nephropathie anderer Genese innerhalb von 48 Stunden nach Injektion des Kontrastmittels (Weisberg *et al.*, 1992; Solomon *et al.*, 1994; Kurnik *et al.*, 1998; McCullough *et al.*, 2006; Persson, 2006). Ein weiterer Indikator mit geringerer Relevanz ist die vermehrte Ausscheidung von Enzymen im Urin (Hunter and Kind, 1992; Morcos *et al.*, 1999). Aufgrund der Heterogenität der Studien, der unterschiedlichen Definitionen der CIN, dem uneinheitlichen Patientengut und der Menge und Art des Kontrastmittels variieren die Angaben zur Inzidenz der CIN in der Literatur deutlich (Lautin *et al.*, 1991; Barrett, 1994; Morcos *et al.*, 1999; McCullough *et al.*, 2006). McCullough *et al.* (2006) sprechen von einer Größenordnung zwischen 1 bis 45 %.

Der Serumkreatininspiegel ist ein unzuverlässiger klinischer Parameter, da der Anstieg um 25 % erst bei einer 50-prozentigen Nierenschädigung zu beobachten ist und er von Parametern wie Muskelmasse und -metabolismus, Alter, Geschlecht und Hydratationsgrad abhängt. Ein Vergleich des unterschiedlichen nephrotoxischen Potentials der verschiedenen Kontrastmittel *in vivo* wird durch das Fehlen geeigneter Parameter und durch die Patientensabhängige unter Umständen geringe Inzidenz der CIN erschwert (Star, 1998; Bellomo *et al.*, 2004; Nguyen and Devarajan, 2007).

Die Prognose einer Kontrastmittel-induzierten Nephropathie ist im Allgemeinen als gut einzustufen. Diese Form der Nephropathie ist in der Regel reversibel. Eine Dialysebehandlung ist bei leichten renalen Insulten nur selten notwendig. Schwere klinisch manifeste Formen dieser Nephropathie sind jedoch mit einer hohen Mortalität verbunden (Bartorelli, 2006; McCullough *et al.*, 2006).

Es ist zu erwarten, dass die Inzidenz von CIN in den nächsten Jahren ansteigen wird, da sich Patienten mit Nephropathie - entsprechend der gestiegenen Lebenserwartung - immer häufiger einer Kontrastmittel-gestützten Röntgen- oder CT-Untersuchung unterziehen werden. Zudem wird prognostiziert, dass die Häufigkeit der an Nierenversagen leidenden Patienten im nächsten Jahrzehnt um etwa 77 % zunimmt. Die Anzahl der Diabetes mellitus-Patienten steigt pro Jahr um 4 –bis 5 % an (Bartorelli, 2006).

Insbesondere Patienten, welche sich einer perkutanen transluminalen koronaren Angioplastie unterziehen müssen, sind durch die häufige Kontrastmittelgabe während verschiedener krankheitsbegleitender Untersuchungen gefährdet, eine CIN zu entwickeln. Für diese Patientengruppe gilt im Allgemeinen eine schlechte klinische Prognose.

Menschen mit chronischer Niereninsuffizienz bergen ein hohes Risiko kardiovaskulärer Krankheiten (Bartorelli, 2006). In einer Studie des Washington Hospital Center benötigten 0,7 % der Patienten, welche eine perkutane transluminale koronare Angioplastie erhielten, anschließend eine Dialyse (Gruberg *et al.*, 2001). Die Prognose *quo ad vitam* dieser Patientengruppe ist als infaust zu bewerten: sechs von zehn Patienten sterben (McCullough *et al.*, 1997). Die Patienten waren zumeist in höheren Altersgruppen angesiedelt, weiblich, an Diabetes mellitus erkrankt oder litten an einer chronischen Niereninsuffizienz anderer Genese (Gruberg *et al.*, 2001).

2.2.1. Pathogenese

Obwohl die Pathogenese der CIN nicht vollständig geklärt ist, wird vermutet, dass es sich um ein multifaktorielles Geschehen handelt (Byrd and Sherman, 1979; Liss *et al.*, 1998a; Liss *et al.*, 1999; Möckel, 2002; Persson *et al.*, 2005). Es wird davon ausgegangen, dass Veränderungen der renalen Hämodynamik, der Mikrozirkulation, lokale Hypoxien, verändertes Ansprechen auf den tubuloglomerulären Feedback, direkte tubuläre Toxizität, Bildung von Radikalen, immunologische Prozesse und schließlich der Abfall der Adenosin- und Endothelinsynthese ausschlaggebend für das Entstehen der CIN sind (Bartorelli, 2006). Durch Injektion der Kontrastmittel kommt es mit einer initialen kurzen Durchblutungssteigerung und darauffolgender Vasokonstriktion zu einer Änderung im Blutfluss, welche zu einer Abnahme der renalen Durchblutung und der glomerulären Filtrationsrate führt (Bakris and Burnett, 1985; Solomon, 1998). Gleichzeitig sinkt der Sauerstoff-Partialdruck nach Kontrastmittelinjektion deutlich (Liss *et al.*, 1998a). Dies hat eine klinisch manifeste renale Hypoxie zur Folge (Heyman *et al.*, 1991; Liss *et al.*, 1998a; Liss *et al.*, 1999). Vor allem äußere Bezirke des Nierenmarks zeichnen sich durch eine besonders hohe Sauerstoffumsatzrate aus, da hier die aktive Resorption von Natrium, Kalium und Chloridionen erfolgen muss. Dieser Abschnitt befindet sich im Bereich des dicken, aufsteigenden Teiles der HENLE-Schleife, wo sich ein hypoxischer Schaden nach Röntgenkontrastmitteleingabe aufzeigen lässt (Bakris and Burnett, 1985; Persson, 2005; Persson *et al.*, 2005; Persson and Patzak, 2005; Persson and Tepel, 2006).

Die verminderte Produktion von vasodilatatorischen Substanzen, wie verschiedene Prostaglandin-Generationen und Stickstoffmonoxid, scheinen ebenfalls eine bedeutsame Rolle zu spielen. Noch nicht geklärt ist, welche Mediatoren für den vasoaktiven Effekt der Kontrastmittel verantwortlich sind, jedoch geht man davon aus, dass Endothelin, Adenosin und Angiotensin 2 mit beteiligt sind (Cantley *et al.*, 1993; Oldroyd *et al.*, 1994; Newaz and Oyekan, 2001).

Adenosin scheint bei der hämodynamischen Reaktion der Kontrastmittel von besonderer Bedeutung zu sein. In den meisten Organen führt Adenosin zu einer Vasodilatation, in der Niere aber resultiert eine Vasokonstriktion. Adenosin ist für den tubuloglomerulären Feedbackmechanismus verantwortlich. Das durch den Adenosintriphosphat (ATP)-Verbrauch freiwerdende Adenosin führt durch seine vasokonstriktorische Wirkung zum Abfall der glomerulären Filtrationsrate (GFR). Die Reduktion der GFR hat einen klinisch verfolgbaren Kreatininanstieg zur Folge. Durch die verminderte GFR ist zudem die Filtration an

Elektrolyten reduziert. Folge dessen ist ein erhöhter Natriumchloridgehalt im Primärharn. Dieser Wert wird an der Macula densa gemessen und es folgt eine Aktivierung des tubuloglomerulären Feedbacks was zu einer Freisetzung der Protease Renin führt. Renin katalysiert im Blut des Patienten die Aktivierung der proteinogenen hepatischen Vorstufe Angiotensinogen zu Angiotensin I. Das pulmonale Angiotensin Converting Enzyme (ACE) beschneidet das Decapeptid Angiotensin I in der Folge zum aktiven Octapeptid Angiotensin II, das über effektive vasokonstriktorische Eigenschaften verfügt. Das Gleichgewicht zwischen vasokonstriktorischen und vasodilatatorischen Substanzen scheint insbesondere bei nierenvorgeschädigten Patienten ausschlaggebend zu sein.

Ein weiterer pathophysiologischer Effekt lässt sich am Tubulussystem feststellen. Entlang des renalen Tubulussystems werden Substanzen, die nicht reabsorbiert werden, wie etwa verschiedene Kontrastmittel-Gruppen zunehmend konzentriert. Kontrastmittel können bis zu einem Faktor von 100 konzentriert werden. Dadurch nimmt ihre Viskosität unter Umständen sehr deutlich zu. Es besteht die Möglichkeit, dass es in diesem Zusammenhang zu Obturationen peritubulärer Gefäße kommen kann (Ruehm *et al.*, 2000; Persson and Tepel, 2006). Da das Ultrafiltrat nur eine geringe Anzahl Proteine enthält, ist die Viskosität der Tubulusflüssigkeit für gewöhnlich niedriger als die des Blutes. Bei der Verwendung höher visköser, dimerer Kontrastmittel steigt die Viskosität der Tubulusflüssigkeit, wodurch der Blutabfluss verlangsamt wird. Viskosität steht im exponentiellen Zusammenhang zu der Konzentration, was dazu führt, dass bei höherer Konzentration der Kontrastmittel und geringer Hydratation dieser Effekt noch verstärkt wird (Bartorelli, 2006). Nach Injektion dieser Kontrastmittel konnte ein von 20mmHg auf 40mmHg erhöhter tubulärer Druck festgestellt werden (Ruehm *et al.*, 2000; Bartorelli, 2006). Zwangsläufig steigt auf diese Art und Weise der intrarenale Druck ebenfalls deutlich an, da die Nierenkapsel durch den hohen Kollagenfaseranteil nur zu unwesentlicher Erweiterung befähigt ist. Als Konsequenz reicht der renale Perfusionsdruck nicht aus, um Gebiete mit hohem Sauerstoffverbrauch weiterhin ausreichend zu versorgen. In Abbildung 2 wird der Mechanismus der renalen Schädigung schematisch dargestellt.

Systemische Wirkungen von Kontrastmitteln, wie ein verminderter kardialer Auswurf und ein vermindertes Perfusions-/Ventilationsverhältnis der Lungen, können zur Minderperfusion der Niere beitragen (Wacker *et al.*, 2003; Bilecen *et al.*, 2005).

Es wird berichtet, dass isoosmolare Kontrastmittel, wie z. B. Iodixanol, den Blutfluss in allen Bereichen der Niere vermindern. Dieser Effekt ist bei höher osmolaren Kontrastmitteln nicht

so ausgeprägt (Runge, 2000; Bartels and Bakker, 2003; Bartorelli, 2006) und konnte durch eine Studie an Hunden nachgewiesen werden (Runge and Knopp, 1999).

Ferner verursachen isoosmolare Kontrastmittel Mikrozirkulationsstörungen mit Verlangsamung des Blutflusses und Tendenz zur Erythrozytenaggregation (Liss *et al.*, 1996). Bei Ischämie entstehen freie Sauerstoffradikale in der Niere, die zu Gewebsschädigungen führen können (Baliga *et al.*, 1997; Tepel *et al.*, 2000). Unter hypoxischen Bedingungen kommt es in der Niere zur Bildung des Enzyms Xanthinoxidase. Im hypoxischen Gewebe wird nach Reperfusion Sauerstoff bereitgestellt. Das enzymatisch aktive Protein Xanthinoxidase fungiert als Elektronenakzeptor, welcher auf diese Art und Weise frei werdende Sauerstoffatome bindet und so zur Bildung freier Sauerstoffradikale führt. Entstehende und frei werdende Sauerstoffradikale stellen eine erneute Gefahr für das umliegende Gewebe dar (Yoshioka *et al.*, 1992; Bartorelli, 2006).

Endotheliale Funktionsstörungen in renalen Gefäßen sind eine häufige Komplikation bei Diabetes mellitus-Patienten und gleichzeitig einer der größten Risikofaktoren für die Entwicklung von CIN (Bartorelli, 2006).

In vitro führt die Anwendung von Kontrastmitteln der isoosmolaren Gruppe zu einer Abnahme der intrazellulären Kaliumionen- und Adeninnukleotidkonzentration sowie zu einer Zunahme der intrazellulären Kalziumkonzentration, was auf eine Störung des transmembranären Ionentransportes hinweist. Es kommt zu einer Freisetzung intrazellulärer Enzyme in das Kulturmedium. Stunden oder sogar Tage nach Kontrastmittelgabe kann festgestellt werden, dass die Proliferation der Zellen abnimmt (Persson and Tepel, 2006). Eine erhöhte Apoptose-Rate konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (Bartorelli, 2006). Eine reduzierte Proliferationsrate der Tubuluszellen beeinflusst die Niere erst Stunden bis Tage nach Kontrastmittelinjektion, was das verspätete klinische Auftreten der CIN erklären könnte. Die mitochondriale Aktivität ist ein guter Parameter zur Bestimmung der tubulären Funktion. Sie zeigt sich unter Kontrastmitteleinfluss gesenkt (Bartorelli, 2006). Die tubuläre Wirkung der Kontrastmittel beinhaltet Reabsorptionsstörungen. Daraus resultiert beim menschlichen Patienten eine Proteinurie als Folge der akuten Zellschädigung. Tubuläre Enzyme wie Alanin-Amino-Peptidase, Gamma-Glutamyl-Transpeptidase und weitere finden sich vermehrt im Harn. Mit steigender Kontrastmittelkonzentration zeigt sich analog und proportional ein höheres zytotoxisches Potential (Andersen *et al.*, 1995).

Histologisch ist eine temporäre tubuläre Vakuolisierung das mikroskopisch sichtbare Zeichen der renalen Parenchym-Veränderungen (Harkonen and Kjellstrand, 1977).

2.2.2. Differentialdiagnose

Differentialdiagnostisch sind embolisch bedingte Nephropathien, die Einnahme von nephrotoxischen Medikamenten (z.B. Aminoglycosid-Antibiotika, Cephalosporine, alle nicht-steroidalen Antiphlogistika/NSAIDs u.a.) und alle anderen Ursachen für akutes Nierenversagen (ANV) zu erwähnen (Möckel, 2002). Bei Patienten mit arteriosklerotisch veränderter Aorta kann es durch eine Kathetermanipulation zu einer Mikroembolisation von Atherom-Bestandteilen kommen. Dabei können die entstandenen Emboli möglicherweise periphere Gefäße verstopfen. Das Gefäßsystem der Niere ist durch seine Mikrovaskularisation besonders gefährdet. Falls ein Embolus die Gefäßstrombahn der Niere erreicht, kann es zu einem akuten Nierenversagen kommen. Die Cholesterin-induzierte Embolie ist selten reversibel (zu 25 %). Um die Cholesterin-Embolie von der CIN zu unterscheiden, kann ein Nachweis von Cholesterin-Kristallen in der Niere erfolgen (Hess, 2003; Chatterjee, 2004).

2.2.3. Therapie

Für die CIN besteht keine kausale Therapie, weshalb eine gute Prophylaxe die zentrale Bedeutung einnimmt (Barrett, 1994). Möckel et al. schlagen eine optimale Hydrierung sowie Vermeidung weiterer Ursachen des akuten Nierenversagens vor (Möckel, 2002).

2.2.4. Prävention

Bei Risikopatienten sollte die Indikation zur Kontrastmittel-Anwendung sehr gut bedacht werden, eine möglichst geringe Kontrastmitteldosis ist anzustreben (Cigarroa *et al.*, 1989). Insbesondere bei Risikopatienten sollten vor der Kontrastmittelgabe prophylaktische Maßnahmen getroffen werden. Grundsätzlich sollten alle Patienten vor der Injektion ausreichend hydratisiert werden (Solomon *et al.*, 1994; Katzberg, 1997; Morcos *et al.*, 1999; Trivedi *et al.*, 2003). Diese Hydrierung kann oral oder intravenös erfolgen, wobei sich die intravenöse Injektion in experimentellen Studien als vorteilhaft erwies (Persson *et al.*, 2005; Pannu *et al.*, 2006). Zur Infusion kann eine Halbelektrolytlösung (NaCl 0,45 %) verwendet werden (ca. 1ml/kg/h) (Katzberg, 1997; Persson *et al.*, 2005; Pannu *et al.*, 2006; Persson and Tepel, 2006). Die Infusion sollte zwölf Stunden vor der Kontrastmittel-Injektion eingeleitet und bis vierundzwanzig Stunden nach der Injektion fortgesetzt werden (Bartorelli, 2006). Grund für diese präventive Wirkung ist einerseits die positive Beeinflussung der Perfusion

und andererseits die Reduktion der Kontrastmittel-Menge im Tubuluslumen. Volumenexpansion und Abfall der Plasma-Osmolarität verhindern die Wasserresorption in den Sammelrohren. Dieser Effekt wird ebenfalls durch die Inhibition von Arginin und Vasopressin unterstützt. In der Konsequenz werden weniger Aquaporinkanäle in die Zellmembranen der Sammelrohre eingefügt. So verbleibt mehr Wasser in den Sammelrohren, wodurch die Kontrastmittel hier weniger konzentriert vorliegen (Persson and Tepel, 2006).

Als eine weitere Art der Prävention wurde in Kombination mit Hydratation die *Acetylcystein*-Gabe beschrieben (Tepel *et al.*, 2000; Diaz-Sandoval *et al.*, 2002). *Acetylcystein* ist ein potentes Antioxidantium, das zur Bindung freier Radikale befähigt ist (Bartorelli, 2006). Tepel *et al.* beschrieben 2000 als erste, dass 600 mg *Acetylcystein* oral verabreicht, zweimal täglich - kombiniert mit einer Hydratation vor und nach Kontrastmittel-Injektion - effektiver sei als Hydratation alleine. In weiteren Studien von Diaz-Sandoval *et al.* (2002) und Shyu *et al.* (2002) konnte der positive Effekt einerseits bestätigt, in Studien von Allaqaband *et al.* (2002) und Briguori *et al.* (2002) aber auch widerlegt werden (Allaqaband *et al.*, 2002; Briguori *et al.*, 2002). Klinisch wird die Anwendung von *Acetylcystein* bei Risikopatienten empfohlen, da diese Substanz kostengünstig ist und keine negative Auswirkung bezüglich Entwicklung einer CIN gezeigt hat (Tepel *et al.*, 2000; Diaz-Sandoval *et al.*, 2002).

Viele vasodilatatorische Substanzen wurden zur Prävention von CIN getestet.

Eine dieser Substanzen ist der Adenosin antagonist *Theophyllin* (Katholi *et al.*, 1995; Brooks and DePalma, 1996; Kolonko *et al.*, 1998; Erley *et al.*, 1999). Nach Kontrastmittelgabe kommt es zu einer erhöhten Adenosinausschüttung durch den Anstieg der tubulären Aktivität nach erhöhter osmotischer Belastung. Deshalb wird vermutet, dass durch Gabe von Adenosin antagonist eine nephroprotektive Wirkung hervorgerufen werden kann. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass die Abnahme der GFR durch *Theophyllin*-Einnahme verhindert werden kann (Erley *et al.*, 1999). Wird *Theophyllin* jedoch in Kombination mit einer Volumensubstitution verwendet, führt dies zu keiner weiteren Verbesserung (Erley *et al.*, 1994; Katholi *et al.*, 1995; Brooks and DePalma, 1996; Erley *et al.*, 1999; Shammass *et al.*, 2001).. In anderen Forschungsarbeiten konnte keine Wirkung des *Theophyllins* zur Prävention der CIN gezeigt werden (Shammass *et al.*, 2001). Bei dieser Datenlage kann allgemein keine Empfehlung zur präventiven Gabe von *Theophyllin* gegeben werden (Möckel, 2002).

Atriales Natriuretisches Peptid (ANP) wurde ebenfalls in mehreren Studien als Prophylaktikum getestet (Margulies *et al.*, 1990; Kurnik *et al.*, 1998). ANP ist ein Peptidhormon, das von Vorhofzellen des rechten Herzens synthetisiert und in die Blutbahn freigesetzt wird. ANP wirkt als aktiver Aldosteron-Antagonist und ist an der Regulation der

Mineral- und Wasser-Homöostase beteiligt. ANP fördert die Diurese und Natriurese. Des Weiteren kann ANP über Inhibition des neurohypophysären Vasopressin eine Vasodilatation induzieren. Durch diese vasodilatative Wirkung und die positive Beeinflussung der intrazellulären ATP-Konzentration wirkt ANP protektiv bei akutem Nierenversagen. In größer angelegten Studien konnte das Auftreten der CIN durch prophylaktische ANP-Einnahme nicht minimiert werden (Kurnik et al., 1998).

Diuretika haben aufgrund des verminderten Sauerstoffverbrauchs durch Reduktion des Natrium-Transportes in der HENLE-Schleife theoretisch eine nephroprotektive Wirkung. Diese These konnte an Ratten, nicht jedoch am Menschen bestätigt werden (Kerns and Hawkins, 1995). *Furosemid*, *Mannitol* und andere Diuretika der gleichen Klassen der Schleifen- und osmotischen Diuretika zeigen keinen positiven Effekt gegenüber alleiniger Hydratation des Patienten durch Infusion (Solomon et al., 1994; Stevens et al., 1999) und gelten durch die vermeintliche Volumendepletion sogar als kontraindiziert (Kurnik et al., 1990; Weinstein et al., 1992; Solomon et al., 1994; Kapoor et al., 1996; Pannu et al., 2006).

Als eine Möglichkeit der Prävention der CIN wurde die prophylaktische Dialyse getestet (Teschan et al., 1960; Berger et al., 2001). Es konnte jedoch keine Verbesserung der renalen Funktion nachgewiesen werden. Bei einigen Patienten schien die prophylaktische Hämodialyse sogar einen negativen Effekt im Hinblick auf den klinischen Verlauf der CIN zu zeigen (Lehnert et al., 1998; Berger et al., 2001). Die Dialyse sollte erst bei deutlich eingeschränkter Nierenfunktion und Gefahr der Überwässerung stattfinden.

Kausal steht die Art der verwendeten Kontrastmittel für die Prävention von CIN im Vordergrund. Ionische Kontrastmittel zeigen eine höhere Toxizität als nicht-ionische Kontrastmittel (Wolf et al., 1989; Almen, 1990; Katayama et al., 1990; Andersen et al., 1994). Neben der Ladung des Kontrastmittelmoleküles sind die physikochemischen Eigenschaften der Kontrastmittelformulierung von großer Bedeutung, da große Substanzmengen bzw. Volumina für eine diagnostische oder interventionelle Röntgen- bzw. CT-Untersuchung appliziert werden. Die wichtigsten physikochemischen Eigenschaften von wasserlöslichen iodierten Kontrastmitteln sind deren Löslichkeit in Wasser, die Viskosität und Osmolalität der Lösungen, Lipophilie bzw. Hydrophilie und die elektrische Ladung.

Der mögliche Einfluss der Viskosität des Kontrastmittels auf die renale Verträglichkeit wird in letzter Zeit kontrovers diskutiert. Den rheologischen Eigenschaften der Kontrastmittelflüssigkeit ist bisher ungenügend Beachtung geschenkt worden. Der Flusswiderstand ist nach dem HAGEN-POISEUILLE-Gesetz von der Viskosität, nicht jedoch von der Osmolarität einer Flüssigkeit abhängig (Persson et al., 2005).

So konnten in einer klinischen Vergleichsstudie an 45000 Patienten in Schweden gezeigt werden, dass die Häufigkeit von CIN bei Patienten, die ein hoch visköses Kontrastmittel injiziert bekamen, doppelt so hoch war wie bei Patienten mit einem niedrig viskösen Kontrastmittel (Liss *et al.*, 2006). Dimere Kontrastmittel unterscheiden sich aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften von anderen Kontrastmitteln. Ihre Viskosität ist erheblich höher als die des Blutes (Dyvik *et al.*, 1995). Darüber hinaus beeinflusst die Osmolarität die tubuloglomeruläre Filtrationsrate nicht, wie von Schnermann *et al.* und Briggs *et al.* nachgewiesen (Schnermann *et al.*, 1976; Briggs *et al.*, 1980; Bartorelli, 2006). Seelinger *et al.* (2007) ermittelten, wie Kontrastmittel mit unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften sich auch im Grad der hervorgerufenen Nierenschädigungen bei Ratten unterschieden. Dabei zeigte sich, dass das höher osmolare Kontrastmittel Iopromid die Urinproduktion erhöhte, wohingegen das isoosmolare, hoch visköse Kontrastmittel Iodixanol die Urinmenge weniger beeinflusste, hingegen die Viskosität des Urins stark erhöhte. Das hoch visköse Iodixanol verminderte außerdem den Blutfluss und Blutdruck, die Erythrozytenkonzentration und den Sauerstoffpartialdruck im Nierenmark (Idee *et al.*, 2000). Ferner verlängert Iodixanol das Ansprechen auf den tubuloglomerulären Feedback und verursacht einen höheren Plasma-Kreatinin Anstieg im Vergleich zu Iopromid (Seelinger and Erdmann, 2007). Überdies wurde mehrfach beschrieben, dass dimere Kontrastmittel die Perfusion in der renalen Medulla von Ratten dramatisch reduzieren (Liss *et al.*, 1996; Liss *et al.*, 1998b; Lancelot *et al.*, 1999).

2.3. Anatomie und Physiologie der Niere

2.3.1. Anatomie der Rattenniere

Die rot-braune, bohnenförmige, paarig angelegte Niere der Ratte liegt retroperitonäal im vorderen Abschnitt des Abdomens. Die rechte Niere befindet sich zwischen dem ersten und dritten Lendenwirbel. Die linke Niere liegt etwas weiter kaudal. Bei adulten Tieren wiegt eine Niere durchschnittlich 0,8 –bis 1,4 g, was in etwa 0,7 % des Körpergewichtes entspricht. Die Abmessungen der Nieren betragen durchschnittlich 15 x 10 x 8 mm. Die Nieren sind von einer straffen fibrösen Nierenkapsel, Capsula fibrosa renalis, umgeben. Diese wird wiederum abhängig vom Ernährungszustand von Fettgewebe umringt. Das Nierenparenchym kann in zwei bereits makroskopisch voneinander zu differenzierende Zonen untergliedert werden: die

hellrot bis beige gefärbte, außen liegende Rinde, Cortex renalis, und das dunkelrote, innen liegende Mark, Medulla renalis. Der Cortex renalis ist weiter untergliederbar in die subkapsulären Markstrahlen, Radii medullares, und die zwischen den Pyramiden liegenden säulenförmigen Abschnitte, Columnae renales. Die Rindenzone der Rattenniere erstreckt sich im arithmetischen Mittel über ca. 1,3 –bis 1,7 mm. Die etwa 5 bis 6 mm dicke Medulla renalis besitzt die Form von nebeneinander aufgereihten Pyramiden. Sie kann in weitere drei Zonen unterteilt werden: Aussenstreifen der Aussenzone, Innenstreifen der Aussenzone und Innenzone. Der äußere Bereich, Aussenstreifen der Aussenzone des Mark ist ca. 0,5 –bis 0,7 mm, der innere, Innenstreifen der Aussenzone ca. 1 bis 1,4 mm dick. Die innere Schicht, Innenzone, hat eine Dicke von ca. 3,5 bis 4 mm. Der inneren Medulla liegt eine Nierenpapille, Papilla renalis, an. Da die Rattenniere nur eine Nierenpapille aufweist, wird sie als unipapillar charakterisiert. An der konkaven Seite der Niere liegt das Nierenbecken, Pelvis renalis. Das Nierenbecken mündet in den Hilus renalis. Durch den Hilus renalis passieren die Arteria und Vena renalis und ein Lymphgefäß in den Sinus renalis. Im Pelvis renalis sammelt sich der Endharn, der von dort weiter durch den Harnleiter, Ureter, in die Harnblase, Vesica urinaria, geleitet wird. Die funktionelle Einheit der Niere ist das Nephron. In jeder Rattenniere befinden sich ca. 30.000 bis 40.000 Nephrone. Das Nephron besteht aus einem Nierenkörperchen, Corpusculum renale, und einem Tubulusapparat, Apparatus tubularis seu Tubuli renales. Das Nierenkörperchen wird von einem Gefäßknäuel der Arteria glomerularis gebildet, das bei der Ratte einen durchschnittlichen Durchmesser von 120 µm und eine Filtrationsfläche von 0,169 mm² aufweist. Das Glomerulum stellt ein arterielles Wundernetz der Arteriola glomerularis, Rete mirabile arteriosum, dar und ist von einer Kapsel, Capsula glomeruli oder BOWMAN-Kapsel, umgeben. Die Arteriola glomerularis verfügt über gefensterte Kapillarwände, welche das Blut ultrafiltrieren und dabei den Primärharn abscheiden. Dieser Primärharn wird in das Tubulussystem weitergeleitet, welches die Aufgabe hat, durch Resorption, Sekretion und Konzentration den Endharn zu bilden. Das Tubulussystem besteht aus einem proximalen Tubulus, der HENLE-Schleife und dem distalen Tubulus. Die verschiedenen Segmente des proximalen Tubulus - Tubulus contortus und Tubulus rectus proximalis - bestehen aus durchlässigen Epithelien und werden deshalb als „leck“ bezeichnet. Hier werden große Mengen Kochsalz, NaCl, und Wasser gegen einen kleinen Konzentrationsgradienten transportiert. Die Segmente des distalen Tubulus und der Sammelrohre bestehen aus dichten Epithelien und sind weniger durchlässig, weshalb man sie als „dicht“ bezeichnen kann. Hier werden nur kleine Mengen gegen einen großen Konzentrationsgradienten transportiert. Topographisch-anatomisch sind der proximale und

distale Tubulus-Abschnitt in der Rindenzone des Nierenparenchyms lokalisiert. Die HENLE-Schleife reicht von der Nierenrinde in das Nierenmark, wobei sich der dünne absteigende und der dicke aufsteigende Teil im Nierenmark befinden. Die Länge der HENLE-Schleife ist sowohl nach topographischer Lage in der Niere als auch bei den verschiedenen Säugetieren unterschiedlich. Je länger die HENLE-Schleife, umso besser die Urinkonzentrierung. Die Menge des Endharns beträgt schließlich nur noch ca. 1 % des Primärharns. Versorgt werden die Tubuli durch die peritubulären Kapillaren. Das Tubulussystem mündet in die Sammelrohre, welche wiederum in die Nierenpapillen münden. Der Nierenpapille ist das Nierenbecken, Pelvis renalis, angefügt. Das Pelvis renalis bildet zwei dorsale und zwei ventrale sackähnliche Divertikel, die Recessus renales. Das Blutgefäßsystem der Niere ist bogenförmig aufgebaut. Die Arteria renalis, die in den Nierenhilus mündet, zweigt sich direkt von der Aorta abdominalis ab. Die A. renalis verzweigt sich in die Aa. interlobares, welche sich wiederum in die Aa. arcuatae aufzweigen. Die Aa. Arcuate münden in die Aa. Interlobulares. Afferente Arteriolen, Vasa afferentia, leiten das Blut in die glomerulären Kapillaren, welche im Cortex lokalisiert sind. Das Blut gelangt anschließend weiter in efferenten Arteriolen und im weiteren Verlauf in die peritubulären Kapillaren oder die Vasa recta. Durch diese Reihenfolge ist der Blutdruck in den glomerulären Kapillaren höher als in den peritubulären Kapillaren. Das Blut sammelt sich schlussendlich in den renalen Venen und verlässt so die Niere, um in die V. cava caudalis zu münden (Hebel, 1986; von Engelhardt, 2004; Krinke, 2000).

2.3.2. Anatomische Besonderheiten der Kaninchen-Niere

Die bohnenförmigen Nieren der Kaninchen sind glatt und einwarzig. Die linke Niere liegt mit ihrem kaudalen Pol in Höhe des vierten Lendenwirbels. Die fast vollständig im intrathorakalen Bereich der Peritonäalhöhle liegende rechte Niere liegt der V. cava caudalis unmittelbar an (Salomon, 2005).

2.3.3. Hämodynamik und Sauerstoffverbrauch

Der renale Blutfluss der Ratte beträgt 5 ml/min. Der renale Plasmafluss liegt bei etwa 3 ml/min. Die glomeruläre Filtrationsrate liegt bei 1 ml/min. In 24 Stunden setzen Ratten durchschnittlich 15 bis 30 ml Urin ab (Hebel, 1986; von Engelhardt, 2004). Die Durchblutung der Niere unterscheidet sich in den verschiedenen Zonen. Über 90 % des renalen

Blutvolumens durchfließen die Nierenrinde, 7 % das äußere Mark und 1 % das innere Mark. Es resultiert ein starker Abfall des hydrostatischen Druckes im Vas afferens und Vas efferens auf Werte von bis zu 60 mmHg. Die hohen Mengen an Sauerstoff werden vor allem für die tubuläre Natrium-Resorption benötigt. In der äußeren Zone des Nierenmarks kann auf diese Art und Weise die glomeruläre Filtration des Blutes aufrecht erhalten werden. Dieser Mechanismus wird als renale Autoregulation bezeichnet. Die Autoregulation des renalen Blutdruckes wird durch den BAYLISS-Effekt und den tubuloglomerulären Feedback (TGF) aufrecht erhalten. Die Nierendurchblutung wird in einem Bereich von 80 bis 180 mmHg konstant erhalten. Der BAYLISS-Effekt ist ein myogener Mechanismus, durch den innerhalb von 1 bis 2 Sekunden nach Dehnung der glatten Muskulatur (Blutdruckabfall) eine Tonuserhöhung eintritt. Der tubuloglomeruläre Feedback beruht auf dem Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) (von Engelhardt, 2004). Dieses hat zudem einen wirkungsvollen Einfluss auf die Vasa afferentia und damit auf die GFR. Das RAAS ist in der Macula densa des juxtaglomerulären Apparates lokalisiert. Dieser besteht aus dem Kontakt des distalen gewundenen Tubulus, Tubulus contortus distalis, mit der Arteriola glomerularis. Die Tubuluszellen sind an dieser Stelle zu den sogenannten Polkissenzellen modifiziert und besitzen die Fähigkeit, die Natrium-Ionen-Konzentration im Blut und dem Primärharn zu messen. Die beiden Konzentrationen werden zu einem Zeitpunkt t_0 direkt und zeitnah miteinander verglichen. Fällt die Natrium-Ionen-Konzentration im Blut geringer aus als die des Primärharns, setzen die Polkissenzellen und das Parenchymgewebe der Macula densa die Protease Renin ins Blut frei. Im Blut trifft Renin auf das in der Leber produzierte inaktive Blutplasma protein Angiotensinogen und spaltet es zu Angiotensin 1. Angiotensin 1 ist immer noch inaktiv und trifft im Blut auf das von Pneumozyten des Types II der Lunge synthetisierte Angiotensin Converting Enzyme (ACE) und wird so zum aktiven Octapeptid Angiotensin 2 hydrolysiert. Angiotensin 2 bewirkt als vasoaktives Peptid eine potente Vasokonstriktion aller Gefäße und stimuliert schließlich an der Zona arcuata der Nebennierenrinde die Freisetzung von Aldosteron. Das Mineralocorticoid Aldosteron ist ein Steroidhormon, welches wiederum im Bereich der Sammelrohre des Nephrons Natrium-Kanalsysteme exprimieren lässt. Diese resorbieren primär aktiv Natrium gegen ATP aus dem Primärharn und fördern gleichzeitig die Kalium-Sekretion. In der hypertensiven Krise wird von Vorhofzellen des rechten Herzens Atriales Natriuretisches Peptid (ANP) synthetisiert und umgehend frei gesetzt. Die verantwortlichen Zellen detektieren den Druck des venösen Blutes. ANP sorgt nun für den Verschluss der unter Aldosteron-Wirkung produzierten Natrium-Kanäle. Ein weiterer Faktor der Blutdruckregulation ist das neurohypophysäre Antidiuretische Hormon (ADH,

Vasopressin, Adiuretin), welches im Nucleus supraopticus und Nucleus paraventricularis des Hypothalamus gebildet wird. ADH wird vom Hypothalamus ausgehend in HERRING-Transport-Vesikeln verpackt, in die Neurohypophyse (Hypophysen-Hinterlappen, HHL) transportiert und dort gespeichert. Bei Dehydratation kommt es zu einer Elektrolytkonzentrationszunahme im Blut und damit zur ADH-Freisetzung. ADH führt an den Sammelrohren zur Ausbildung von Aquaporin 2-Kanälen, die Wasser resorbieren können. Des Weiteren verursacht ADH im Limbischen System Durstgefühl. Alle vorherig genannten Hormone sind gemeinschaftlich wichtige Regulatoren der Nierenfunktion und des Wasser- und Blutdruckhaushaltes (von Engelhardt, 2004).

2.3.4. Physiologie der Niere

Die Niere hat die Aufgabe der Filtration und Reinigung des zirkulierenden Blutes in Bezug auf harnpflichtige Substanzen. Schlackenstoffe sollen den Körper verlassen können, während wichtige Substanzen für den Körper erhalten bleiben. Durch Ausscheidung eines konzentrierten oder verdünnten Urins reguliert die Niere den Elektrolyt- und Wasserhaushalt. Die Säure-Basen-Homöostase wird durch Ausscheidung eines sauren oder alkalischen Urins reguliert. Ferner besitzt die Niere noch endokrine Funktionen wie die Synthese von Erythropoetin und metabolisiert Corticosteroide, Testosteron und andere Hormone.

Um die harnpflichtigen Substanzen aus dem Blut zu entfernen, werden zunächst alle niedermolekularen Substanzen sowie das Lösungsmittel Wasser von den Glomerulumkapillaren in die Tubuli ausgeschieden. Durch die tubuläre Resorption werden alle für den Körper wichtigen Stoffe wieder aufgenommen. Andere Solute werden durch tubuläre Sekretion ins Lumen abgegeben. Die schließlich im Tubulus verbleibende Flüssigkeit wird als Harn ausgeschieden. An der Konzentrierung des Harns sind das Gegenstromsystem im Nierenmark beim Durchfluss durch die HENLE-Schleife, die Sammelrohre und die Vasa recta wesentlich beteiligt. Es beruht auf der NaCl-Resorption bei gleichzeitiger Wasserimpermeabilität. Dadurch steigt die Osmolarität im Interstitium. Sobald Wasser wieder passieren kann, gelangt es in Richtung des Konzentrationsgradienten ins Interstitium. Das dem Harn entzogene Wasser gelangt in die Vasa recta und führt auf der venösen Seite zur Abnahme der Osmolarität (von Engelhardt, 2004). Die Hauptfunktion der Harnkonzentrierung nimmt dabei der intermediäre Tubulus ein, der aus dünnen ab- und aufsteigenden Schenkeln der Henle-Schleife besteht. Das Epithel ist flach und mitochondrienarm und erbringt kaum spezifische Transportleistungen. Allerdings ist es wasserpermeabel, so dass Wasser das

Tubuluslumen verlassen kann, angetrieben durch die viel höhere Osmolalität des umgebenden Interstitiums. Bedeutung gewinnt dieser Vorgang bei den sehr langen intermediären Tubuli, die von den juxtamedullären Glomerula ausgehen und bis tief hinunter in das hyperosmolale Nierenmark vorstoßen. Diese langen intermediären Tubuli werden begleitet von einem peritubulären Netz aus Blutkapillaren, die von den Arteriolen efferentes der Glomerula ausgehen und sich dann erneut zu einem kapillären Wundernetz auffächern. Erst im Wechselspiel mit diesem Kapillargeflecht, dem dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife und den Sammelrohren wird die funktionelle Bedeutung des intermediären Tubulus sichtbar (Beck, 1999). Ein klinisch bedeutsamer Parameter zur Bestimmung der Nierenfunktion des menschlichen und tierischen Patienten ist die renale Clearance als derjenige Zeitraum, in dem eine bestimmte Konzentration einer Substanz X durch renalen wash out vollständig aus dem Blut des Patienten entfernt wird. Die Clearance-Bestimmung erfolgt unter klinischen Bedingungen in der Regel als endogene Clearance mit Hilfe des Muskelstoffwechsel-Metaboliten Kreatinin. Dabei ist zu beachten, dass das renale Tubulus-System eine gewisse Menge Kreatinin selbst in den Primärharn sezerniert. Dieses Phänomen kann unter Anwendung der exogenen Clearance mit Hilfe des Fructosepolymers Inulin aus der Wurzelknolle von Topinambur umgangen werden. Inulin wird weder zellulär metabolisiert noch tubulär rückresorbiert und sezerniert; es kann unter Verwendung dieses Kohlenhydrats klinisch also eine direkte Berechnung der Patienten-Clearance erfolgen. In der vorliegenden Dissertations-Arbeit soll untersucht werden, in welcher Art und Weise verschiedene Kontrastmittel der renalen Clearance unterliegen und welche Wirkungen des jeweils spezifischen renalen washouts des Kontrastmittelmoleküls auf Nierenparenchymzellen beobachtet werden können.

2.4. Spezifische Untersuchungen zur CIN

2.4.1. Genexpressionsanalyse

Biomarker können als Indikatoren für Nierenschädigung dienen. Durch eine Differenzierung der Gene in einzelnen Signalwegen bzw. -funktionen können Rückschlüsse auf die Pathogenese der CIN gezogen werden (z.B. Hypoxie, Apoptose oder Proliferation) (Yoshida *et al.*, 2002; Davis *et al.*, 2004). Dabei kann eine veränderte Genexpression eine potentielle Schädigung von Geweben anzeigen. Prinzipiell können Unterschiede in der Genexpression

auf mRNA- oder Protein-Ebene bestimmt werden (zum Beispiel durch RT-PCR oder Western Blot Analyse).

In Zusammenhang mit unterschiedlichen Untersuchungen wurde in der Literatur eine Reihe solcher Biomarker beschrieben. Das Kidney injury molecule, KIM-1, und die Hämoxigenase, HO-1, gelten in diesem Zusammenhang als bisher wichtigste Parameter für eine potentielle renale Schädigung.

KIM-1 ist ein sensitiver Biomarker zur frühen Erkennung von tubulären Nierenschäden (Ichimura *et al.*, 1998; Vaidya *et al.*, 2006). Es handelt sich hierbei um ein Transmembranprotein mit extrazellulärer Immunglobulin- und Muzin-Domäne aus der Gruppe der Zelladhäsionsmoleküle. KIM-1 wird physiologisch im Nierengewebe in nur sehr geringem Maße exprimiert. Nach ischämischer oder toxischer Schädigung der proximalen Tubuluszellen wird es hochreguliert (Han *et al.*, 2002; Ichimura *et al.*, 2004). 24 bis 48 Stunden nach dem ischämischen Ereignis ist die KIM-1-Expression am stärksten. Es kann jedoch bereits nach 12 Stunden eine Erhöhung festgestellt werden. Dabei kann KIM-1 im Nierengewebe, Plasma oder im Urin nachgewiesen werden (Ichimura *et al.*, 1998; Devarajan, 2008; Dieterle *et al.*, 2008; Han *et al.*, 2008). KIM-1 wird hauptsächlich von Nierenparenchymzellen exprimiert, die für die Regenerationprozesse von Nephronen in ischämischen Nierenbezirken verantwortlich sind (Witzgall *et al.*, 1994; Ichimura *et al.*, 1998; Ichimura *et al.*, 2004). Die Funktion von KIM-1 ist weitgehend unbekannt. Es wird vermutet, dass KIM-1 einen protektiven Effekt auf die Tubulusepithelzellen der Niere hat.

Bei der Hämoxigenase-1 (HO-1) handelt es sich um einen Hypoxie-Marker. HO-1 ist ein protektives Gen mit anti-inflammatorischer, anti-apoptotischer und anti-oxidativer Wirkung (Tenhunen *et al.*, 1968; Takahashi *et al.*, 2004; Goncalves *et al.*, 2006; Olszanecki *et al.*, 2007). Bei der Hämoxigenase handelt es sich um ein mikrosomales Enzym. Die Hämoxigenase katalysiert den initialen Schritt des Häm-Abbaus (Tenhunen *et al.*, 1968; Docherty *et al.*, 1984). Die Aktivität der Hämoxigenase kann in allen Gewebetypen des Körpers nachgewiesen werden (Maines, 1988). Bei der Hämoxigenase kann eine induzierte Form des Moleküls von einer nicht induzierbaren Form unterscheiden werden. Die induzierbare Form ist die Hämoxigenase-1 (HO-1), die nicht induzierbare die Hämoxigenase-2 (HO-2) (Maines, 1988). Beide Isoenzyme sind Produkte zweier unterschiedlicher Gene und variieren in ihrer Gewebsexpression. Besondere Bedeutung für den Aktivitätsanstieg der HO-1 scheint die Generierung von reaktiven Sauerstoffradikalen, wie sie bei oxidativem Stress auf zellulärer Ebene entstehen, zu haben (Lavrovsky *et al.*, 1994).

2.4.2. Kontrastmittel gestützte Sonographie

Um Blutgefäße sonographisch besser darzustellen, können Ultraschallkontrastmittel verwendet werden. Ultraschallkontrastmittel wurden erstmals vor vierzig Jahren vorgestellt (Gramiak and Shah, 1968; Bokor *et al.*, 2001; Ohlerth and O'Brien, 2007). 1991 wurde Echovist[®] (Bayer Vital, Berlin, Deutschland) als erstes Ultraschallkontrastmittel zugelassen (Uhlendorf *et al.*, 2000; Averkiou *et al.*, 2003; Krix and Jenne, 2007).

Die im Ultraschall eingesetzten Kontrastmittel sind gasgefüllte Bläschen in einer Größenordnung von 1 bis 8 μm , die mit einer dünnen Hülle stabilisiert werden. Diese verbleiben nach der intravenösen Injektion im intravaskulären Raum. Sie erfüllen die Aufgabe, das Echo der Blutpartikel zu verstärken (innerhalb der Gefäße werden Werte um ca. 25 dB erreicht) (Delorme *et al.*, 2006). Gase werden als sonographische Kontrastmittel eingesetzt, da sie eine geringe Dichte und somit eine im Vergleich zum umliegenden Gewebe geringere Ausbreitungsgeschwindigkeit der Schallwelle ermöglichen. An der Grenzfläche des Gewebes zum Gas kommt es zu einer verstärkten Reflexion der Schallwellen. Dadurch wird die Flussdetektion verbessert. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass Ultraschallkontrastmittel zu einem verbesserten Signal-Rausch-Verhältnis beitragen (Seidel and Meyer, 2001b).

Die verschiedenen Ultraschallkontrastmittel unterscheiden sich in ihrer Oberflächenstruktur zum Teil stark voneinander. Die Mikrobläschen (MB) sind mit u.a. Galaktose, Palmitinsäure, Phospholipiden, Cyanacrylat oder Albumin ummantelt. Durch die unterschiedlichen Umhüllungen und die verschiedenen Gase besitzen die verschiedenen Ultraschallkontrastmittel differenzierte akustische Eigenschaften und Verwendungsmöglichkeiten. Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal ist ihre Größe. Ultraschallkontrastmittel können je nach physikochemischen Eigenschaften entweder lungengängig oder nicht-lungengängig sein (Krix and Jenne, 2007). Die kontrastgebenden Eigenschaften von gasgefüllten MB unterscheiden sich je nach Frequenz und Schallintensität der Ultraschallwelle.

Ultraschallkontrastmittel werden im Allgemeinen als gut verträgliche Arzneimittel eingeschätzt. Nur selten werden Nebenwirkungen beobachtet. Die auftretenden Nebenwirkungen sind normalerweise nur vorübergehend und leicht (Packungsbeilage Sonovue[®], Bracco, 04/2006). Es gibt keinen Hinweis auf Nephrotoxizität, sodass der kontrastmittelverstärkte Ultraschall für Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion als wichtige, bildgebende Alternative herangezogen werden kann (Krix and Jenne, 2007).

Funktionsweise von Ultraschallkontrastmitteln

Bei Verwendung niedriger Schallintensitäten wird das Sendesignal unter anderem gestreut bzw. reflektiert und vom Schallkopf empfangen, wobei die Frequenz des Echos unverändert bleibt. Dieses Phänomen wird als lineares Echo bezeichnet. Erhöht man die Stärke des Sendesignals, was am Gerät durch einen steigenden Mechanical Index (MI) angezeigt wird, geraten die MB in eine resonante Schwingung und emittieren dabei nicht nur die Sendefrequenz, sondern zusätzlich harmonische, d.h. doppelte, dreifache.. sowie subharmonische, d.h. halbe, viertel... Frequenzsignale. Erhöht man die Sendeleistung weiter, so werden die MB im Schallfeld zerstört. Im Moment der Zerstörung wird ein starkes, breitbandiges, d.h. aus vielen unterschiedlichen Frequenzen bestehendes Signal zurück gesandt. Dieses Signal, das aufgrund der abweichenden Frequenz (nicht linear) im Farb-Doppler-Mode und im Harmonic-Mode detektiert werden kann, nennt man „Stimulated Acoustic Emission“ (SAE). Die Signalstärke des SAE-Signals ist so hoch, dass selbst einzelne MBs detektiert werden können (Uhlendorf *et al.*, 2000; Reinhardt *et al.*, 2005). In Abhängigkeit von den MB-Eigenschaften (Stabilität, Größe, Gas) liegen die zur MB-Zerstörung nötigen Schalldrucke unterschiedlich hoch. Man kann aber allgemein sagen, dass unterhalb eines MI von 0,1 keine MB zerstört werden (Ohlerth and O'Brien, 2007).

Ultraschallkontrastmittel können mit dem konventionellen B-Mode (Grauwert-Darstellung) und der DOPPLER-Sonographie dargestellt werden. Beim DOPPLER-Effekt bewegen sich Sender und Empfänger einer Welle relativ zueinander. Kontrastmittel verstärken das Doppler-Signal signifikant und können so verbesserte Aussagen über die Durchblutung in der detektierten Region treffen. Große Gefäße können teilweise auch ohne Kontrastmittel mit Doppler-Verfahren dargestellt werden, wobei die im Blut befindlichen Erythrozyten als Streuer dienen. In schwer zugänglichen Bereichen wie dem Hirn oder in kleineren Gefäßen benötigt man jedoch ein Kontrastmittel, um den Signal-Rausch-Abstand zu erhöhen. Auch muss die Blutfluss-Geschwindigkeit hoch genug sein, um ein detektierbares Doppler-Signal zu erzeugen. Im Fall von Arteriolen oder Kapillaren ist die Flussgeschwindigkeit jedoch zu gering. Gleichzeitig liegt die Größe dieser Gefäße weit unterhalb des räumlichen Auflösungsvermögens klinischer Ultraschallgeräte. Um dennoch ein Signal aus diesen Gefäßen zu erhalten, wird bei der Doppler-Kontrast-Echografie meist mit hohem MI untersucht. Die so erzeugten SAE-Signale ermöglichen die Darstellung von Kapillaren im Farbdoppler-Mode, obwohl kein „echtes“, auf Bewegung beruhendes Doppler-Signal vorhanden ist (Blomley *et al.*, 1998; Seidel and Meyer, 2001a). Die für SAE-Signale erforderliche MB-Zerstörung ist bei der Untersuchung von Mikrozirkulationsgebieten aber

immer dann limitierend, wenn der Schallkopf bzw. das Schallfeld während der Untersuchung nicht bewegt wird. In diesem Fall reicht nämlich die Blutfluss-Geschwindigkeit bei kleinen Gefäßen nicht aus, um das ca. 1 bis 3 mm dicke Schallfeld in der Zeit bis zum nächsten Bild wieder zu füllen (z.B. 40 ms bei 25 Bildern/s). Dies ist auch der Grund, warum im herkömmlichen FarbdopplerMode trotz hohen Schalldruckes im Echtzeit-Bild kein Kontrast dargestellt werden kann (Correas *et al.*, 2003). Nimmt man dagegen ein getriggertes Bild auf (ca. 1 Bild/s), so kann man eine lückenlose Kontrastierung erreichen.

Der für die Kontrastmitteldarstellung im Gewebe am besten geeignete Mode ist der Harmonic Mode (Uhlendorf *et al.*, 2000; Krix *et al.*, 2003b). Beim Harmonic Mode wird die Frequenz des Schallkopfes zwischen Senden und Empfangen jeweils so verändert, dass vor allem die harmonischen Wellen, die von resonant schwingenden MBs stammen, empfangen werden. Die Sendefrequenz, die aus dem Gewebe kommt, wird gleichzeitig empfangsseitig unterdrückt. Dadurch erreicht man eine Trennung von Kontrastmittel- und Gewebesignal und kann MBs auch in Kapillarbereichen darstellen. Da Harmonic Imaging nicht die Zerstörung der MBs erfordert, funktioniert dies auch in Echtzeit und ohne den Schallkopf dabei durch das Gewebe zu bewegen (Delorme, 1998; Delorme and Knopp, 1998). „Puls Inversion Harmonic Imaging“, das Pulsinversionsverfahren, ist eine weitere Darstellungsmöglichkeit der harmonischen Eigenschaften von Ultraschallkontrastmitteln. Hierbei ist das Signal-Rausch-Verhältnis von harmonischen Schwingungen drastisch erhöht (Seidel and Meyer, 2001b). Bei diesem Verfahren werden zwei Ultraschallpulse mit einem zeitlichen Verzug und 180° Phasenverschiebung ausgesendet. Bei linearen Signalen werden die Wellen voneinander subtrahiert und summieren sich damit zum Wert Null. Bei harmonischen Schwingungen, bei denen die Phasenverschiebung nicht exakt 180° beträgt, kommt es nicht zu einer Auflösung der Welle. Dadurch wird vorrangig das Ultraschallkontrastmittel sichtbar (Albrecht *et al.*, 2000a; Albrecht *et al.*, 2000b; Burns *et al.*, 2000); das „Tissue Harmonic Imaging“ (THI) basiert auf dieser Methode.

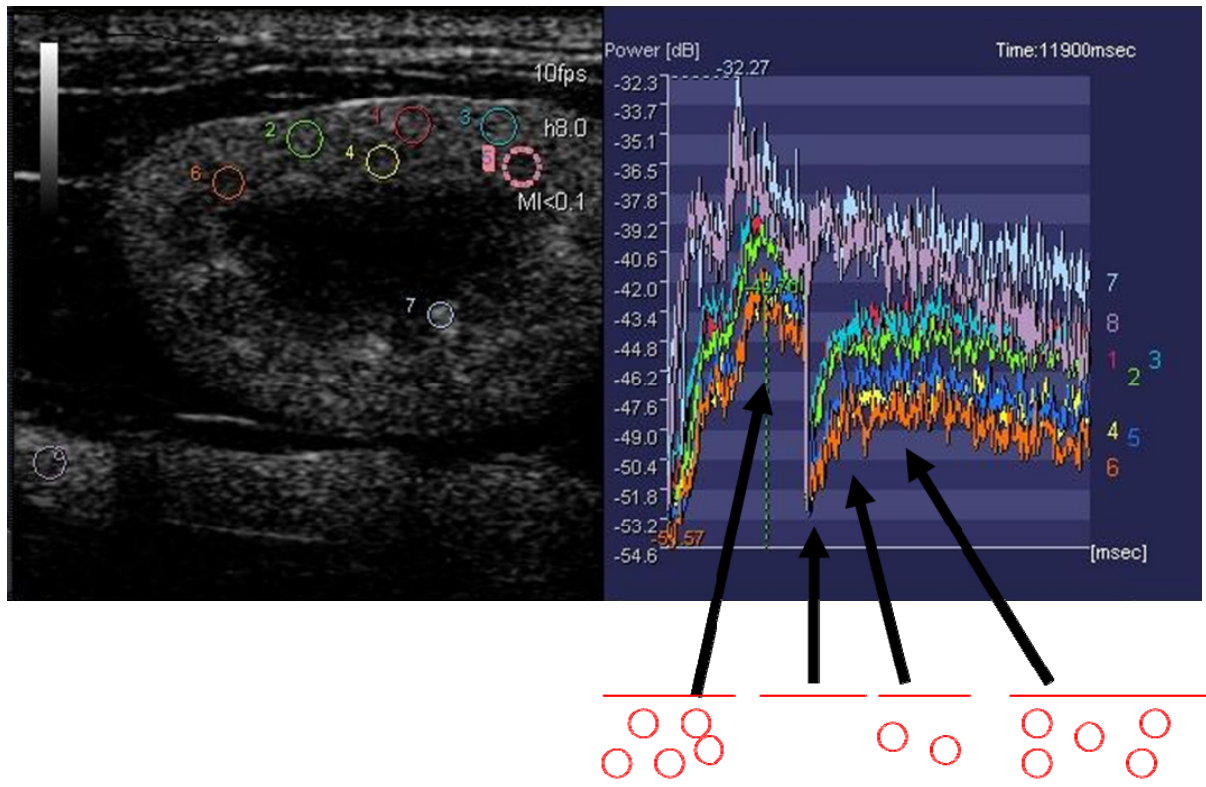
Ebenfalls gute Ergebnisse in der Ultraschallkontrastmittel-Diagnostik werden mit dem „Power Modulation Imaging“ erzielt. Bei diesem Verfahren wird das Gewebesignal unterdrückt, indem mit niedrigen Beschallungsenergien gearbeitet wird. Die harmonischen Schwingungen des Ultraschallkontrastmittels können dabei gut dargestellt werden. Bei diesem Verfahren werden ebenfalls zwei Ultraschallimpulse ausgesendet, wobei der zweite die Hälfte der Amplitude des ersten besitzt. In der Bildverarbeitung wird der zweite Impuls mit dem Faktor zwei verstärkt und von dem ersten Puls abgezogen. Lineare Streuung, wie sie in verschiedenen Geweben vorkommt, wird somit komplett ausgelöscht. Für die klinische

Echtzeit-Darstellung der arteriellen Perfusion im Harmonic-Verfahren muss auf einen niedrigen MI geachtet werden, weil sonst die MBs zerstört werden und man dann in Kapillargebieten keinen Kontrast mehr sieht (s.o.: wie bereits für SAE/Farbdoppler beschrieben) (Ohlerth and O'Brien, 2007).

Perfusionsquantifizierung mit Ultraschall-Kontrastmitteln

Zur Beurteilung der Vitalität eines Gewebes ist die Perfusion ein entscheidender funktioneller Parameter. Die Perfusion wird durch zwei Faktoren beeinflusst: Zum einen von der Anzahl der Blutgefäße in einem Gewebsareal, zum anderen von der Geschwindigkeit, mit der das Blut durch die Gefäße strömt. Die Flussgeschwindigkeit des Blutes kann wiederum durch Erhöhung der Viskosität verringert werden. Dies könnte eventuell durch die Injektion hoher Mengen eines Röntgenkontrastmittels im Rahmen einer Angiografie passieren.

Für die sonografische Perfusions-Quantifizierung hat sich eine Kombination zweier Verfahren inzwischen gut bewährt. Zunächst wird im Ultraschall-Feld, welches ca. 1 bis 3 mm dick sein kann, das Kontrastmittel im Harmonic Mode mit einem hohen Schalldruck vollständig zerstört. Unmittelbar danach schaltet das Gerät auf einen niedrigen Schalldruck ($MI < 0.1$) zurück, wodurch die Wiederanflutung des Kontrastmittels im Schallfeld über die Zeit beobachtet und gemessen werden kann. Die Geschwindigkeit, mit der dieser Prozess abläuft, ist allein von der Perfusion abhängig (Averkiou *et al.*, 2003; Lucidarme *et al.*, 2003). In Abbildung 3 ist solch eine Wiederanflutung graphisch dargestellt.



Ultraschall Kontrastmittel (Sonovue) Im Gefäß

Abbildung 2: Sonographische Darstellung einer Kaninchenniere. Die Kurve stellt die Wiederanflutungskinetik nach Zerstörung der MB in die Nierenrinde und das Nierenmark dar. Die Kurvendiagramme 1, 2 und 3 entsprechen Regions of Interest (ROIs) in der Nierenrinde, die Kurvendiagramme 4,5 und 6 den ROIs im Nierenmark. Die Kurve 7 entspricht der A. renalis, die Kurve 8 der Aorta. Die injizierten MB werden nach der Applikation kurzfristig durch einen hohen MI zerstört. Die darauffolgende Wiederanflutung entspricht der Perfusion im detektierten Bereich.

3. Material und Methoden

3.1. Untersuchte Tiere

Als Versuchstiere wurden Han-Wistar-Ratten (CrI:WI) (männlich; 230-300 g) und Kaninchen der Rasse Weisser Neuseeländer (weiblich; 3-4,5 kg) verwendet. Des Weiteren wurden Ratten der Rasse ZSF1 (ZDFxSHHF-fa/fa(cp)) (männlich 500-900 g) experimentell untersucht. Alle Tiere wurden von Charles River (Sulzfeld, Deutschland) bezogen. Die Tiere wurden bei einer Temperatur von 22°C und einem Tag-/Nacht-Rhythmus von 12 Stunden unter standardisierten Laborbedingungen gehalten. Die Han-Wistar-Ratten und die Weißen Neuseeländer-Kaninchen erhielten Standardfutter, die ZSF1-Ratten spezielles Diätfutter (PMI-2008, Ssniff Spezialdiät GmbH, Soest, Deutschland) sowie Wasser ad libitum. Die Tiere wurden hinsichtlich ihrer Haltung und Tötung gemäß der §§ 1, 2, 5 und 6 des Deutschen Tierschutzgesetzes gehalten und behandelt.

3.2. Anästhesie und Euthanasie der Versuchstiere

Versuchstiere	Narkotikum	Dosierung
Han-Wistar-Ratten	Isofluran-Sauerstoff/Lachgas Gasgemisch	Isofluran: zur Einleitung 4 Vol %, zum Erhalt 1,5 Vol % Sauerstoff: 0,5 Vol % Lachgas: 1 Vol%
ZSF1-Ratten	Isofluran-Sauerstoff/Lachgas Gasgemisch	Isofluran: zur Einleitung 4 Vol %, zum Erhalt 1,5 Vol % Sauerstoff: 0,5 Vol % Lachgas: 1 Vol%
Weißer Neuseeländer-Kaninchen	Xylazin Ketamin	1ml/kg (Xylazin 1 Teil, Ketamin 2 Teile) s.c., i.p. oder i.m.
Weißer Neuseeländer-Kaninchen	Buprenorphin Propofol 1 %	0,01-0,02 mg/kg i.m. 0,2-0,3 ml/kg i.v.

Tabelle 1: Narkoseprotokoll der Versuchstiere.

Versuchstiere	Narkotikum	Dosierung
Han-Wistar-Ratten	Isofluran	Isoflurangelocke
ZSF1-Ratten	Isofluran	Isoflurangelocke
Weißer Neuseeländer-Kaninchen	Xylazin, Ketamin	2ml/kg i.v.

Tabelle 2: Euthanasie der Versuchstiere.

3.3. Kontrastmittel

Handels- Name	Präparat	Konzentration mg Iod/ml	Osmolarität mOsm/kg bei 37°C*	Viskosität mPa/s bei 37°C*	Viskosität in iso-osmolarer Lösung **
Ultravist 300	Iopromid	300	610	4.6	1
Visipaque 320	Iodixanol	320	290	11.8	12

Tabelle 3: Viskosität und Osmolarität der verwendeten Kontrastmittel.

*Vom Hersteller angegebene Daten.

**Aus den vom Hersteller angegebenen Daten errechnet.

In den im Rahmen dieser Dissertationsarbeit durchgeführten Untersuchungen wurden als Vertreter der nicht-ionischen monomeren Kontrastmittel Iopromid 300 mg (Ultravist[®], Bayer Schering Pharma, Berlin, Deutschland) und das nicht-ionische dimere Kontrastmittel Iodixanol 320 mg (Visipaque, GE-Healthcare, München, Deutschland) eingesetzt. Die Kontrastmittel wurden vor Beginn des Versuches in einem Wärmeschrank auf 37°C erwärmt. Im Anschluss erfolgte die Applikation der Kontrastmittel stets innerhalb von 5 Sekunden i.v. bei den Ratten in die Schwanzvene (V. coccygica) und bei den Kaninchen in die Ohrvene (V. auricularis marginalis).

3.4. Retention

Experimenteller Verlauf:

Die Tiere wurden mit einem 64-Zeiler Computertomographen (Somatom Sensation 64, Siemens Medical Solution, Erlangen, Deutschland) untersucht. Zuerst wurde eine Baseline-Aufnahme des gesamten Tieres vor Kontrastmittel-Injektion generiert. Die Injektion des Röntgenkontrastmittels erfolgte bei den Ratten in einer Dosis von 0,3 g, 1 g und 2 g Iod pro kg Körpergewicht intravenös (i.v.) in die Schwanzvene. Die applizierten Dosierungen orientierten sich an den für den Menschen klinisch zugelassenen Mengenangaben.

Die Röntgenkontrastmittel wurden manuell innerhalb von 5 Sekunden injiziert. Anschließend erfolgte eine isotonische 0,9 % Kochsalzinjektion von ca. 0,5 ml. Die Tiere wurden zu verschiedenen Zeitpunkten p.i. (1 Stunde bis Tag 17) computertomographisch untersucht. Um einen Vergleich des Zeitverlaufes der Retention der beiden Kontrastmittel bei einer Konzentration von 1g Iod/kg KM an Han-Wistar-Ratten zu ermitteln, wurden die Tiere anschließend 1, 2, 3, 4, 6 und 24 Stunden p.i. untersucht. Die Retention in Abhängigkeit von der Dosis wurde 3 Stunden p.i. mit den Konzentrationen 0,3, 1, und 2 g Iod/kg KM verifiziert. Bei der ZSF1-Ratte wurde eine Dosis von 1 g Iod/kg KM injiziert. Die Tiere wurden 1, 2, 3 und 24 Stunden p.i. untersucht. Die Untersuchung wurde am Tag 2, 3, 7 und 17 p.i. fortgesetzt.

Versuchsgruppe	Substanz	Dosis (g) (Iod/kg KM bzw. NaCl/kg KM)	Tieranzahl	Zeitpunkt der CT- Aufnahme (h)
1	NaCl	0,3	6	3
2	Iopromid	0,3	6	3
3	Iodixanol	0,3	6	3
4	NaCl	1	12	1, 2, 3, 4, 6, 24
5	Iopromid	1	12	1, 2, 3, 4, 6, 24
6	Iodixanol	1	12	1, 2, 3, 4, 6, 24
7	NaCl	2	6	3
8	Iopromid	2	6	3
9	Iodixanol	2	6	3

Tabelle 4: Übersicht über Versuchsgruppen, Substanzen und Tierzahlen für die CT Untersuchung (Han-Wistar-Ratten).

Versuchsgruppe	Substanz	Dosis (Iod/kg KM bzw. NaCl/kg KM)	Tieranzahl	Zeitpunkt der CT-Aufnahme
1	NaCl	1	6	1h, 2h, 3h, 24h, 2d, 3d, 7d, 17d
2	Iopromid	1	6	1h, 2h, 3h, 24h, 2d, 3d, 7d, 17d
3	Iodixanol	1	6	1h, 2h, 3h, 24h, 2d, 3d, 7d, 17d

Tabelle 5: Übersicht über Versuchsgruppen, Substanzen und Tierzahlen für die CT Untersuchung (ZSF1;Ratten).

CT- Aufnahme und Analyse

Der Scanner war bei allen Untersuchungen auf 80 kv, 120 mAs eff, Vorschub pro Rotation = 1 eingestellt. Der Versuch wurde mit einem Gesichtsfeld von 70 mm, bei einer Schichtdicke von 1 mm und einem B30- und B50-Rekonstruktionskern durchgeführt. Während der Injektion und der CT-Aufnahme waren die Tiere Isofluran-narkotisiert.

Im Anschluss an die Untersuchung wurde der Absorptionskoeffizient der Nierenrinde mit Hilfe der Hounsfield-Units bestimmt. Dafür wurden drei getrennte Regionen (ROI, Region Of Interest) jeweils in beiden Nierenrinden platziert. Eine weitere ROI wurde zum Vergleich in der inneren Lendenmuskulatur platziert. Diese Auswertungsmethode wird in Abbildung 4 veranschaulicht.

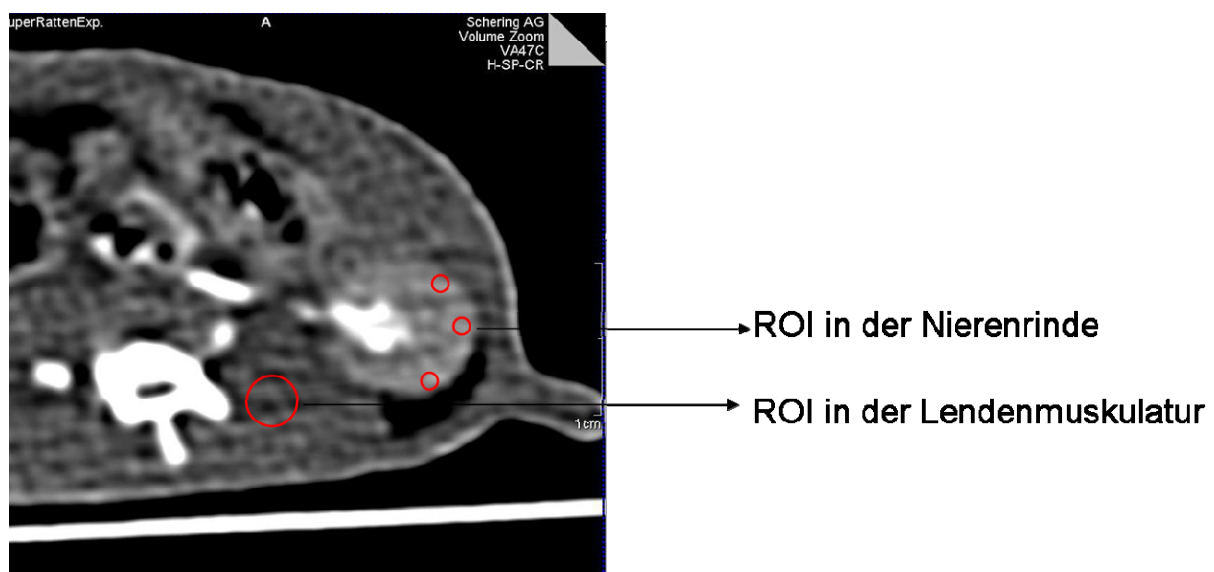


Abbildung 3: Beispiel der CT Schnittbild-Analyse. In der linken Niere der Han-Wista-Ratte wurden in der Nierenrinde drei Regionen (ROI) platziert, welche zur Auswertung herangezogen wurden. Eine weitere Region wurde in der inneren Lendenmuskulatur platziert und zur vergleichenden Auswertung verwendet.

Röntgenfluoreszenzanalyse (RFA)

Nach Abschluss der computertomographischen Untersuchung wurden die Nieren entnommen und die Iodkonzentration mittels Röntgenfluoreszenzanalyse bestimmt. Dafür wurden die Ratten zunächst getötet und die Bauchwand mit Hilfe einer *Mayo-Schere* durch einen Schnitt in der Medianen eröffnet. Dann wurde die A. renalis durch eine Arterienklemme nach *Peen* abgeklemmt und beide Nieren vollständig reseziert. Nach der Entnahme wurden die Nieren zunächst gewogen. Das Nierengewebe wurde anschließend durch Scherenschlag grob zerkleinert und schließlich in 10 % KOH mazeriert. Anschließend wurde die Iodkonzentration des Homogenisats gemessen.

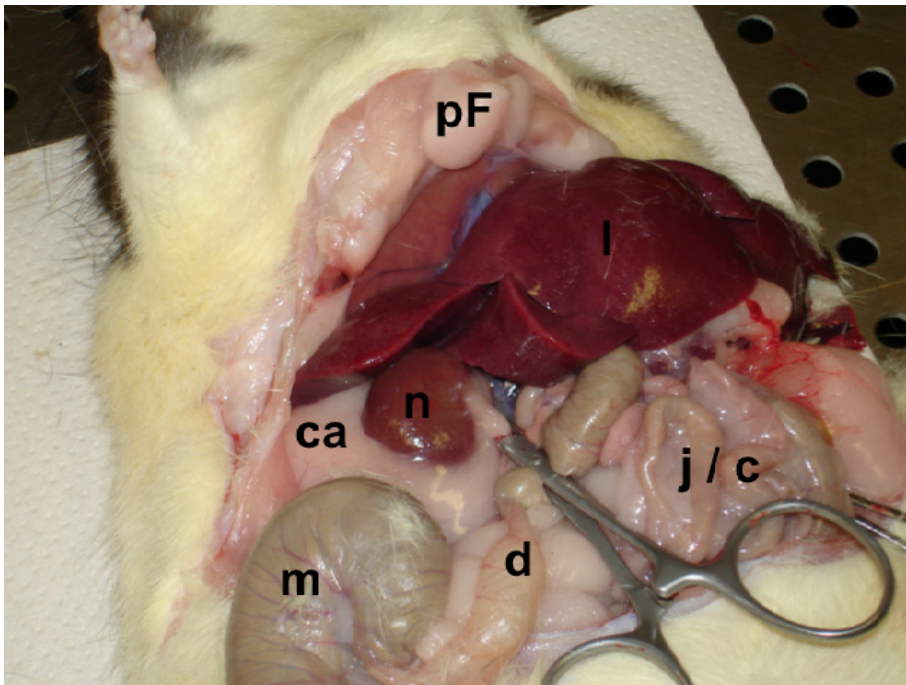


Abbildung 4: Resektion der Niere einer ZSF1-Ratte. n = Niere, m = Magen, ca = capsula adiposa, pF = praeumbilicaler Fettkörper, l = Leber, d = Duodenum, j/c = Jejunalschlingen / Colon (Intestinum crassum)

Versuchsgruppe	Substanz	Dosis (Iod/kg KM bzw. NaCl/kg KM)	Anzahl Tiere	Zeitpunkt der Nierenentnahme (h) p.i.
1	NaCl	0,3	6	3
2	Iopromid	0,3	6	3
3	Iodixanol	0,3	6	3
4	NaCl	1	6	3
5	Iopromid	1	6	3
6	Iodixanol	1	6	3
7	NaCl	2	6	3
8	Iopromid	2	6	3
9	Iodixanol	2	6	3

Tabelle 6: Übersicht über Versuchsgruppen, Substanzen und Tierzahlen für die RFA (Han-Wistar-Ratten).

Statistik zur Retentionszeit der Röntgenkontrastmittel

Um den Absorptionskoeffizienten von Röntgenkontrastmitteln in der Nierenrinde zu bestimmen, wurden ROIs jeweils in beiden Nierenrinden platziert. Diese ROIs wurde vor Kontrastmittelgabe errechnet und ergaben die Baseline-Werte. Um die Heterogenität der Baseline auszugleichen, wurden zunächst die Baseline-Werte einander angenähert. Anschließend wurde die Fläche unter der Kurve (AUC) mit der einfachen Trapez-Regel ausgerechnet. Da der Level der CT-Werte am Ende des Beobachtungszeitraums nicht auf den Baseline-Wert abfällt, führt die AUC unter Umständen dazu, die wahre Exposition der mit Iodixanol behandelten Tiere mit dieser Substanz zu unterschätzen.

Iopromide und Iodixanol wurden durch zwei unterschiedliche Analysen der Varianz verglichen (ANOVA). Die AUC war die abhängige Variable und die beiden Faktoren „Substanz“ (2 Level: Iodixanol und Iopromid) und „Tiermodell“ (2 Level: Han-Wistar-Ratten und ZSF1-Ratten) ermöglichen eine Schätzung der unterschiedlichen Varianzen in den zwei Tiergruppen. Das Modell wurde mit der Interaktion von Substanz und Modell erweitert, um zu testen, ob der Effekt der Substanz in den einzelnen Tiermodellen Unterschiede aufweist. Lineare Kontrasttests wurden von dem ANOVA Modell abgeleitet, um den Effekt der Substanz für jedes Tiermodell separat zu testen. Die Berechnung wurde mit Hilfe der SAS Software, Version 9.1.3. (SAS Institute, Cary, NC, USA) durchgeführt.

Blutentnahme der Ratten

Den ZSF1-Ratten und den Kontrolltieren (Han-Wista-Ratten) wurde Blut aus der V. jugularis für die Laborparameterbestimmung abgenommen. Dafür erhielten die Tiere eine Isofluran-Kurzarkose. Sie wurden für die Blutentnahme in Rückenlage platziert. Das Blut wurde mit einer 26mm langen Kanüle und einer 2ml Spritze entnommen. Die Tiere, welche zur Blutentnahme herangezogen wurden, entsprachen denen der CT-Untersuchung.

3.5. Genexpressionsanalyse / Proteinbestimmung

Die Genexpressionsanalyse bzw. Proteinbestimmung wurde an männlichen Han-Wistar-Ratten durchgeführt. Die Ratten wurden in drei Gruppen mit jeweils 6 Tieren aufgeteilt. Alle Gruppen erhielten 24 Stunden vor Versuchsbeginn kein Wasser, um eine Dehydrierung und somit eine Vorbelastung der Niere zu erreichen. Gruppe 1 wurde NaCl, Gruppe 2 Iopromid und Gruppe 3 Iodixanol über die Schwanzvene appliziert. Alle Tiere erhielten die gleiche Dosis von 4 g Iod/kg Körpergewicht (etwa die doppelte beim Menschen zugelassene Dosis) des jeweiligen Kontrastmittels bzw. das gleiche Injektionsvolumen des NaCl-Injektats. Anschließend durften die Tiere wieder Wasser aufnehmen. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Ratten in einer Isofluran-Glocke euthanasiert und die Nieren der Tiere wie oben beschrieben entnommen. Das Gewicht der Nieren wurde ermittelt.

Versuchsgruppe	Substanz	Dosis	Anzahl Tiere
1	NaCl	4 g NaCl/kg KM	6
2	Iopromid	4 g Iod/kg KM	6
3	Iodixanol	4 g Iod/kg KM	6

Tabelle 7: Übersicht über die Versuchsgruppen, Substanzen und Tierzahlen für die Genexpressionsanalyse und Proteinbestimmung (Han-Wistar-Ratten).

Genexpressionsanalyse des Kidney injury molecule (Kim-1) und der Hämoxxygenase (HO-1) in der Niere durch RNA-Aufreinigung

Jeweils ein Viertel der rechten Niere wurde anschließend in flüssigen Stickstoff verbracht. Um das Gewebe zu homogenisieren und die RNA zu isolieren, wurden 1 ml Triazol-Reagent (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) (4°C) pro 50 mg Gewebe auf Eis gekühlt in ein 15 ml Falcon-Röhrchen verbracht und mittels UltraThorax® gründlich homogenisiert. Die homogenisierte Probe wurde für 5 Minuten auf Eis inkubiert. 200 µl Chloroform pro 1 ml Triazol-Reagent wurden hinzugefügt. Das Falcon-Röhrchen wurde geschwenkt und wiederum fünf Minuten auf Eis inkubiert. Dann wurden die Proben für 20 Minuten bei 4200 rpm und 4°C zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde daraufhin in ein neues Falcon-Röhrchen überführt und der Rest verworfen. Anschließend wurden 200 µl Chloroform pro 1 ml Triazol-Reagent substituiert. Nach dem Schwenken wurden die Proben für 15 Minuten bei 4200 rpm und 4°C abzentrifugiert und in die wässrige Phase überführt. Danach wurden 5 ml Isopropanol hinzugegeben, vermischt und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die Proben wurden dann für 10 Minuten bei 13000 rpm und 4° C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Präzipitat mit zweimal 600 µl 75 %igem, 4° C kaltem, RNase-freiem-Äthanol gewaschen. Die Proben wurden anschließend bei 10000 rpm und 4° ultrazentrifugiert. Das verbleibende Äthanol wurde abpipettiert und die Probe wurden 30 Minuten Luft getrocknet. Die Probe wurde nun in 100 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert und in Chloroform verbracht. Die RNA wurde wie folgt chromatographisch aufgereinigt (RNAeasy Säulen, Quiagen, Hilden, Deutschland): Dafür wurden erst 350 µl RLT-Puffer und dann 250 µl Äthanol hinzugegeben und mit der Probe gemischt. 700 µl der Probe wurden auf die RNAeasy-Säule gegeben und für 15 Sekunden mit 10000 Umdrehungen ultrazentrifugiert. Die mRNA-Expressions-Bestimmung erfolgte semiquantitativ. Die Echtzeit RT-PCR (TaqMan-PCR) mit dem ABI Prism 7700 Sequenz Ermittlungsgerät (Applied Biosystem, Inc., FosterCity, CA, USA) wurde in Zusammenarbeit mit der Gruppe GTR-CMR der Bayer Schering Pharma AG (Berlin, Deutschland) durchgeführt. 1 µg der aufgereinigten RNA wurde durch Transkription mit Superscript 2 RT-cDNA Synthesekit (Gibco Inc., Paisley, UK) in cDNA umgewandelt. Die Sequenz der Primer und der Fluorogenic Probe sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

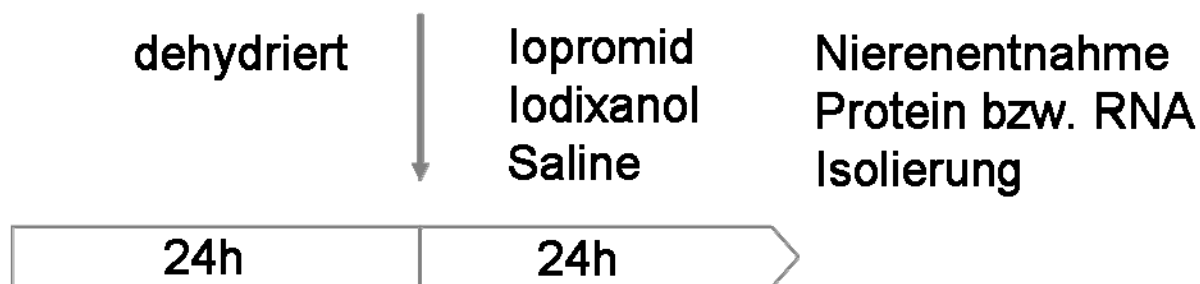


Abbildung 5: Schematische Darstellung des experimentellen Ablaufes der Genexpressionsanalyse und Proteinbestimmung.

Genequenz		Primersequenz
Kim-1 /Havr1	NM_173149	Forward Primer: 5-GACTGGAATGGCACTGTGACA
		Reverse Primer: 5'-TCTCTGCGGCTTCCTCAAAG
		Fluorogenic Probe: 5'-CTCAGAGGAGGCCTGGAATAATCACACTGTAA
HO-1/HMOX1	NM_012580	Forward Primer: 5'-TATCGTGCTCGCATGAACACT
		Reverse-Primer: 5'-GGCGGTCTTAGCCTCTTCTGT
		Fluorogenic Probe: 5'-TGGAGATGACCCCCGAGGTCAAGC

Tabelle 8: Sequenz der Primer und der Fluorogenic Probe.

Statistik

Die Statistik für die semiquantitative KIM-1- und HO-1-mRNA-Level-Bestimmung wurde mittels des one-way ANOVA-Tests gefolgt von dem Tuckey's multi comparison-Test durchgeführt. Für eine Verifizierung der Ergebnisse wurde aus Biopsien der linken Nieren proteinhaltiges Material für die Western-Blot Analyse aufgereinigt.

Proteinbestimmung

Ein weiteres Viertel der rechten Niere wurde direkt nach der Entnahme in Lyse-Puffer verbracht. Die Proben wurden während des gesamten Versuchs auf 4°C herabgekühlt. Der Lyse-Puffer bestand aus 50 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-(Tris-)Salzsäure (HCL) mit 2 mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA) und wies einen pH von 7,4 auf. Nach Einstellung des pH-Wertes wurden 2 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) und eine Protease-Inhibitor-Tablette (Complete, Mini, EDTA-free, Roche, Mannheim, Deutschland) hinzugefügt. Die Proben wurden mit einem Homogenisator (UltraThorax® T25, Janke & Kunkel IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland) auf Eis homogenisiert. Nach dem

Homogenisierungsprozess wurden die Proben bei 4000 Umdrehungen 10 Minuten lang zentrifugiert. Anschließend wurden 2 ml des Überstandes erneut bei 13000 Umdrehungen für zwei Minuten zentrifugiert. 250 µl Überstand wurden anschließend auf Trockeneis verbracht. Die Bestimmung der Konzentrationen von Clustertin, Cystatin-C, KIM-1 und Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin (NGAL), Calbindin, Epidermal Growth Factor (EGF), Glutathione S-Transferase-alpha (GST-alpha), Glutathione S-Transferase Yb1 (GST Yb1), Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL), Osteopontin und Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 (TIMP-1) Proteinanalyse wurde durch die Firma Rules-Based Medicine (Austin, Texas, USA) durchgeführt.

3.6. Zytotoxizität

In-vitro-Zytotoxizitätstests können einen ersten Hinweis auf das toxische Potential von verschiedenen Substanzen geben. Dabei ist es wichtig, geeignete Assays und für die jeweilige Untersuchung geeignete Zell-Linien zu verwenden. Als eine representative renale Tubuluszell-Linie haben sich die LLC-PK1 Tubulus Zellen vom Schwein erwiesen. Mit ihrer Hilfe können Informationen über pathophysiologische Prozesse im proximalen Tubulus der Niere gewonnen werden. LLC-PK1-Zellen wachsen in Zellkulturflaschen zu konfluenten Monolayern. Die Zellen besitzen eine apikal (luminal, mukosal) zum Überstand des Zellkulturmediums gerichtete Ausrichtung und eine basolaterale (antiluminal, serosal) Ausrichtung in Richtung des Gefäßbodens (Hull, 1976).

Für die folgenden Untersuchungen wurden LLC-PK1-Zellen der 3. Passage verwendet. Die Anzucht und Kultivierung der LLC-PK1-Zellen erfolgte gemäß einem standardisierten Protokoll bei 37° C, 5% CO₂, 92 % Luft, 90 % Luftfeuchtigkeit.

Die adhärenz konfluent mit LLC-PK1 bewachsenen Petrischalen wurden nach Entfernung des Kulturmediums 199 (+ Earle's, + GlutamaxTM I) + 10 % FBS (Fetales Bovines Serum) und 1 % Penicillin, Steptomycin mit 10 ml PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung) gewaschen. Um die Zellverankerung am Gefäß zu lösen und die Zellen zu vereinzeln, wurde nun 3 ml 5% Trypsin/EDTA zugegeben. Nach 15 minütiger Inkubationszeit und mikroskopischer Kontrolle lagen die Zellen schließlich vereinzelt vor. Anschließend wurde mit 10 ml Kulturmedium substituiert und bei 1000 Umdrehungen pro min für 5 min zentrifugiert. Das überstehende Medium-Trypsin/EDTA-Gemisch wurde abpipettiert und die Zellen wurden zusammen mit dem Medium in Zellkulturflaschen verbracht. Nach 2 –bis 3-tägiger Inkubationszeit erreichten

die Zellen wiederum eine Konfluenz und konnten zu Versuchen oder erneuter Zellpassage verwendet werden.

Die allgemeine Zellvitalität lässt sich durch Messung des ATP-Spiegels und Messung der mitochondrialen Aktivität untersuchen. Eine Abnahme beider Parameter deutet auf eine Zellschädigung hin.

3.6.1. Mitochondriale Aktivität

Lebende Zellen nehmen das gelbe Tetrazoliumsalz MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromid) auf und setzen es mit Hilfe mitochondrialer Dehydrogenasen zu einem stark blauen, wasserunlöslichen Formazanfarbstoff um. Die Zunahme des blauen Formazans korreliert mit der Aktivität der Zelle (Mosmann, 1983; Hardiek *et al.*, 2001).

Die LLC-PK1 Zellen wurden in Medium 199 (+ Earle's, + GlutamaxTM I) + 10 % FBS (Fetales Bovines Serum) und 1 % Penicillin, Steptomycin in 75 cm² Zellkulturflaschen kultiviert. Es wurden stets ca. $2,5 \times 10^6$ Zellen pro 96-Well-Platte ausgesät, d.h. pro Well wurden ca. 25000 Zellen eingesät.

Am Folgetag wurden die 96-Well-Platten für den MTT-Test verwendet. Zwei Platten wurden vier Stunden mit einer Konzentration von 50 mg Iod/ml Kontrastmittel beimpft, zwei weitere mit derselben Konzentration für 24 Stunden. Wiederum zwei Platten wurden mit einer steigenden Konzentration von 5-100 mg Iod/ml beimpft (5, 10, 50, 100 mg Iod/ml) und 4 Stunden lang inkubiert. Am Ende der Inkubation nach 4 und 24 Stunden einer gesamten 96-Well-Platte mit der Prüfsubstanz wurden zu 100 µl Zellen in Medium 20 µl MTT-Reagenz (5 mg/ml PBS) gegeben und für 2 h bei 37°C inkubiert. Medium und MTT wurden dekantiert und je 100 µl Lysepuffer hinzugefügt. Im Anschluss erfolgt eine lichtgeschützte Inkubation der Platte für 5 min bei 37°C. Anschließend wurde die Platte für 10 min bei ca. 300 Mot/min ebenfalls lichtgeschützt geschüttelt. Zuletzt folgte die photometrische Messung bei 595/635 nm.

3.6.2. Adenosintriphosphat (ATP) –Bestimmung

Die Bestimmung des ATP-Gehaltes der Zelle findet mit Hilfe einer Luziferase-Reaktion statt. ATP wird für die Spaltung eines Substrates in ein leuchtendes Produkt benötigt. Die im Luminometer gemessene Helligkeit korreliert mit dem ATP-Spiegel der Zellen und ist damit ein Maß für die Zahl der lebenden Zellen. CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay (Promega, Mannheim, Deutschland) wurde zur Bestimmung des ATP-Gehaltes verwendet.

Die LLC-PK1 Zellen wurden in Medium 199 (+ Earle's, + Glutamax™ I) + 10% FBS und 1% Penicillin, Streptomycin in 75 cm² Zellkulturflaschen kultiviert. Es wurden stets ca. $2,5 \times 10^6$ Zellen pro 96-Well-Platte angezchtet, d.h. pro Well wurden ca. 25000 Zellen eingesät. Am Folgetag wurde die 96-Well-Platte für den ATP-Test verwendet. Zwei Platten wurden eine halbe Stunde mit einer Konzentration von 75 mg Iod/ml Kontrastmittel beimpft. Am Ende der Inkubation der 96-Well-Platte mit der Prüfsubstanz (30 Minuten) wurden zu 100 µl Zellen in Medium 100 µl Reagenz gegeben. Die Platte wurde für 2 min geschüttelt und bei Raumtemperatur für 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Lumineszenz bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen.

3.7. Perfusion / Sonographie

Die Versuche wurden zuerst an Han-Wistar-, anschließend an ZSF1-Ratten und Kaninchen durchgeführt. Die Ratten waren während der Untersuchung in einer Isofluran/Lachgas-Inhalationsnarkose. Den Kaninchen wurde zur Sedation und Analgesie Xylazin/Ketamin verabreicht. Die Tiere wurden mit einem Premium High-End-Ultraschallsystem (Aplio XP SSA-790A, Toshiba Medical System GmbH, Berlin, Deutschland) untersucht. Nachdem die Tiere ruhig gestellt waren, wurde jeweils die linke Niere der Tiere mit dem Schallkopf im B-Bild von mediolateral dargestellt. Bei abdominaler Untersuchungstechnik findet man bei der Ratte die linke Niere kaudal des Rippenbogens und die rechte Niere weiter kranial im rippengestützten Teil der Bauchhöhle. Beim Kaninchen liegen die Nieren meist etwas weiter kaudal, es bestehen jedoch große individuelle Unterschiede. Es ist von Vorteil, die Niere an der lateralen Bauchwand aufzusuchen, da so Überlagerungen mit dem Darm vermieden werden können. Bei der Rattenniere lassen sich Nierenrinde und Nierenmark nicht eindeutig darstellen. Im Kaninchen lassen sich die Pseudopapillen des Nierenmarks und die Nierenrinde gut voneinander abgrenzen. Die Ausbuchtung des Nierenbeckens ist bei beiden Tierarten gut sichtbar zu machen und erscheint durch das vorhandene Binde- und Fettgewebe echoreicher. Im Querschnitt lässt sich der Sinus renalis ebenfalls echoreich darstellen. Das Organ kann im Quer- und Längsschnitt vollständig dargestellt werden. Nachdem die Niere gut sichtbar war, wurde der Schallkopf, wie in Abbildung 8 zu sehen, in einer Halterung fixiert. Dadurch konnte während der gesamten Untersuchung ein konstanter Bereich untersucht werden, welcher nur durch Atemartefakte gestört wurde. Nun wurde das B-Bild in den Tissue Harmonic-Mode umgestellt. Daraufhin wurde den Han-Wistar-Ratten 0,025 ml, den ZSF1 Ratten 0,05 ml und den Kaninchen 0,2 ml Ultraschallkontrastmittel Sonovue[®] (Bracco Altana

Pharma, Konstanz, Deutschland) verabreicht. Unmittelbar vor Injektionsbeginn wurde eine 50 Sekunden lange Messung gestartet, um den Verlauf des Kontrastmitteleinstromes über die Zeit darzustellen. Ca. 10 Sekunden nach der Injektion wurde der MI von ≤ 0.1 einen kurzen Moment lang auf 100 % verstellt, um anschließend wieder mit ≤ 0.1 einzuwirken. In diesem Moment (100% Energie) wurden die MB des Kontrastmittels zerstört, sodass die Wiederanflutungs-Kinetik des Kontrastmittels detektiert und quantifiziert werden konnte (Flash-Replenishment-Technik). Die Dokumentation der arteriellen Anflutungsphase der MB verlief automatisch im digitalen Bildspeicher. Zur Quantifizierung verfügte das verwendete Ultraschallgerät über ein Quantifizierungsmodul. Das CHI-Quantifizierungsmodul ermöglicht die Darstellung einer Time-Intensity-Kurve direkt nach der Ultraschallaufnahme. Die Time-Intensity-Kurven ermöglichten wiederum eine Aussage über das Einströmen und Ausströmen der MB in einer oder mehreren Regionen (ROI). Nach der ersten Messung erhielten die Tiere der Kontroll-Gruppe (Gr. 1) eine 0,9 %ige NaCl-Lösung, die der Gruppe 2 Iodixanol 320 mg/ml (Visipaque[®], GE-Healthcare, München, Deutschland) und die der Gruppe 3 Iopromid 300 mg/ml (Ultravist[®], Bayer Schering Pharma, Berlin Deutschland). Die Gruppen bestanden aus jeweils 6 Tieren (n = 6). Die Röntgenkontrastmittel wurden in einer Dosis von 1 g/kg intravenös (i.v.) in die Schwanzvene mit gleicher Geschwindigkeit manuell injiziert. Anschließend folgte eine Kochsalzinjektion von ca. 0,5 ml. Fünf Minuten und zwanzig Minuten nach Röntgenkontrastmittelinjektion wurde die Messung wiederholt. Alle Versuchstiere wurden unter Einsatz der kontrastmittelspezifischen Technik des THI nach dem Ultraschallprotokoll (Tabelle 9) untersucht. Die ROIs wurden bei den Ratten im Nierenmark, bei den Kaninchen im Nierenmark und der Nierenrinde platziert. Ziel der Auswertung war die Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Anflutung der MB im Endstromgebiet (insbesondere den Kapillaren) der Nierenarterien. Anschließend erfolgte die Auswertung der Anflutungskurve. Dafür wurde die aus den Ultraschallmessungen für Regionen in der Nierenrinde bzw. Nierenmark ermittelten Signalamplituden zunächst bzgl. des abfallenden Signallevels aufgrund der Bolusinjektion des Ultraschallkontrastmittels korrigiert. Hierzu wurde eine Exponentialfunktion an die abfallende Signalkurve angepasst - ausgenommen des Bereiches der Wiederanflutung, welcher durch die ultraschallbasierte Kontrastmittelzerstörung hervorgerufen wurde. Das korrigierte Signal wurde dann logarithmisch über der Zeit aufgetragen. In den Messkurven zeigten sich damit mehrere Bereiche mit unterschiedlicher Steigung. Die Steigungen wurden unter Zuhilfenahme des CHI-Quantifizierungsmodul-Programmes vom Beginn der Wiederanflutung an ausgemessen und in den Ergebnissen als Steigung 1, 2 und 3 angegeben.

Schallkopf	12,0 MHz Lineare Sonde
Geräteparameter	0,1-0,3 % Acoustic Power, MI von ≤ 0.1
Analyse	CHI-Quantifizierungsmodul USCQ-790A (Toshiba Medical System GMBH Deutschland)
Technik	THI (Toshiba Medical System GMBH Deutschland)
Ultraschallkontrastmittel	Sonovue [®] (Bracco Altana Pharma, Konstanz, Deutschland)

Tabelle 9: Protokoll der verwendeten Sonographietechnik.

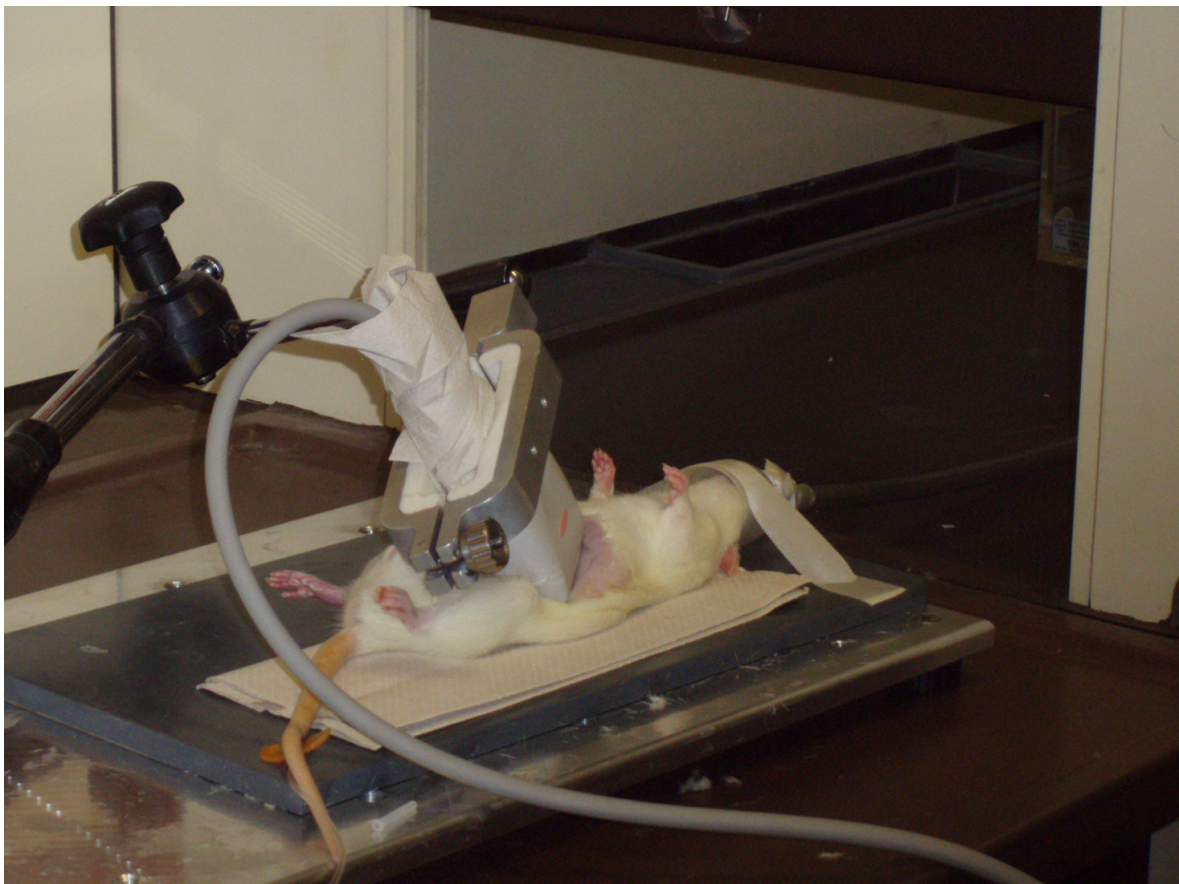


Abbildung 6: Untersuchung einer Han-Wistar-Ratte mit dem Ultraschallgerät.

Versuchsgruppe	Substanz	Dosis (Iod/kg KM bzw. NaCl/kg KM)	Anzahl Tiere
1	NaCl	1	6 Han-Wistar-Ratten
2	Iopromid	1	6 Han-Wistar-Ratten
3	Iodixanol	1	6 Han-Wistar-Ratten
4	NaCl	1	6 ZSF1-Ratten
5	Iopromid	1	6 ZSF1-Ratten
6	Iodixanol	1	6 ZSF1-Ratten
7	NaCl	1	6 Kaninchen
8	Iopromid	1	6 Kaninchen
9	Iodixanol	1	6 Kaninchen

Tabelle 10: Übersicht über die Versuchsgruppen, Substanzen und Tierzahlen für die Untersuchung der Nierenperfusion.

Abbinden der A. renalis

Um die Methode zu evaluieren, wurde an zwei Kaninchen in einer finalen Untersuchung die A. renalis partiell ligiert. Hierfür wurde den Tieren zusätzlich zu Xylazin/Ketamin, Buprenorphin und Propofol verabreicht (siehe Tabelle 1). Anschließend wurden die Tiere in Rückenlage positioniert. Um den Gefäßdurchmesser zu ermitteln, wurden die Tiere zunächst mit dem sonographischen Doppler-Verfahren untersucht. Im Anschluss wurde die Bauchwand mit einem 10 cm langen Schnitt in der Medianen eröffnet. Mit einem Entlastungsschnitt entlang der lateralen Bauchwand wurde das Sichtfeld erweitert.

Der Zugang zur Niere erfolgte manuell durch Verlagerung der benachbarten Organe. Das subkapsuläre Nierenfett wurde behutsam entfernt und die A. renalis aufgesucht. Um die Teilstenose entsprechend dem gewollten Durchmesser zu erreichen, wurde der Ligaturfaden (Silkam[®] 2/0, Braun Aesculap AG & Co, Tuttlingen, Deutschland) um einen Polyethylen-Schlauch (Intamedic[®], Clay Adams, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ USA 07417) mit entsprechendem Durchmesser an das Gefäß angelegt.

Anschließend wurden die Hautschichten wieder über das Operationsfeld gelegt. Auf dem Hautlappen wurde der Ultraschallkopf in Höhe der Niere platziert und diese scharf eingestellt. Nun kam der Tissue Harmonic-Mode zum Einsatz. Es folgte eine Sonovue-Injektion unter Zuhilfenahme der oben beschriebenen Ultraschallmessung. Durch Abschnüren des Ligaturfadens kam es nun zu einer ca. 50 %igen Reduktion des Durchmessers der A. renalis. Es erfolgte eine weitere Messung, um die Reperfusion beobachten zu können.

Dazu wurden die Ligaturen nach der Messung geöffnet und danach erneut ohne Volumeneinschränkung gemessen. Nach Beendigung dieser Messungen wurden die Tiere euthanasiert.

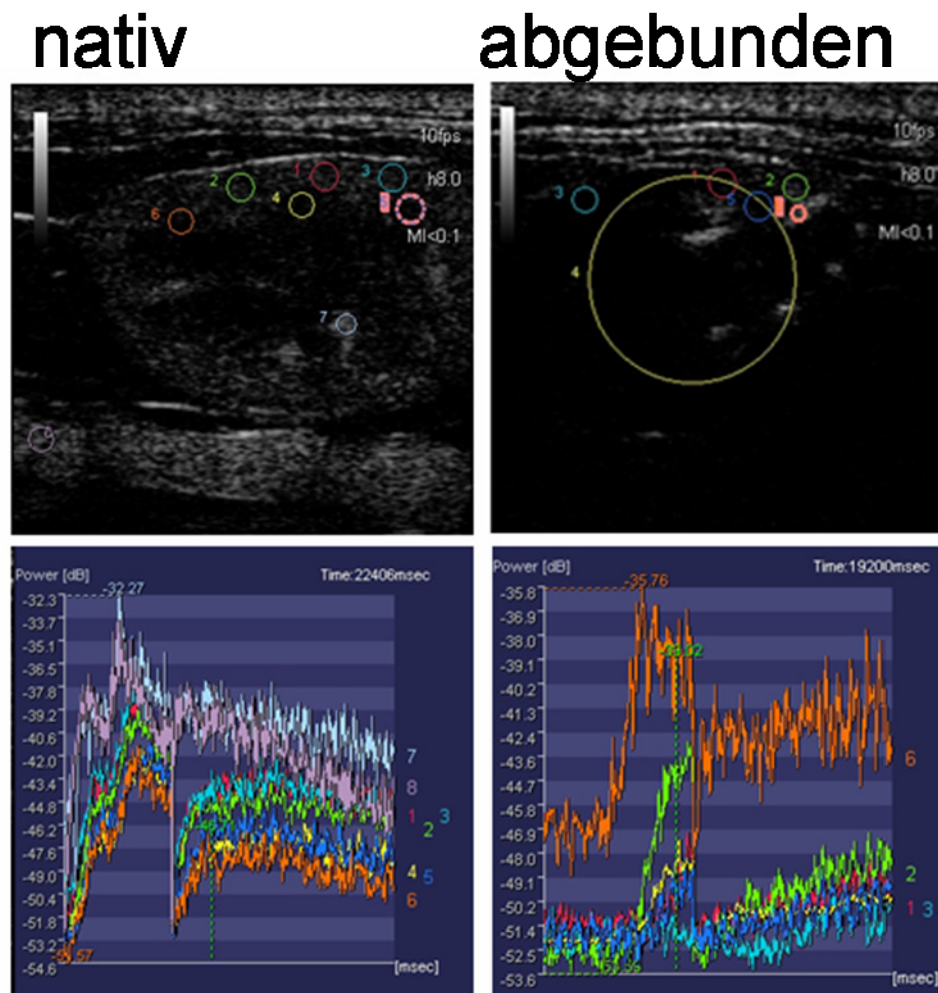


Abbildung 7: Ultraschallbild und dazugehörige Time-Intensity-Kurve des CHI-Quantifizierungsmoduls. Die farbig eingekreisten Regionen in den oberen Bildern entsprechen den farbigen Kurven der unteren Bilder und stellen die Anflutungskinetik der MB dar. Vor der Teilstenose entsteht eine übliche Einflutungskurve der MB im Quantifizierungsmodul des Ultraschallgerätes (linke Reihe). Nach der Teilstenose sind nur noch wenige MB am Ultraschallmonitor zu detektieren (rechte Reihe). Dies spiegelt sich deutlich in der Time-Intensity-Kurve wieder.

4. Ergebnisse

4.1. Retention der Kontrastmittel in der Niere

Um die Retention von Kontrastmitteln zu verifizieren, wurden zwei Methoden verwendet. Zum einen wurden computertomographische Bilder im Stunden- und Tagesverlauf erstellt und das Maß der Iodexposition mit Hilfe der Hounsfield-Einheit errechnet. Zum anderen wurde der Gesamt-Iodgehalt der Nieren nach Applikation von Röntgenkontrastmittel mittels Röntgenfluoreszenzanalyse gemessen.

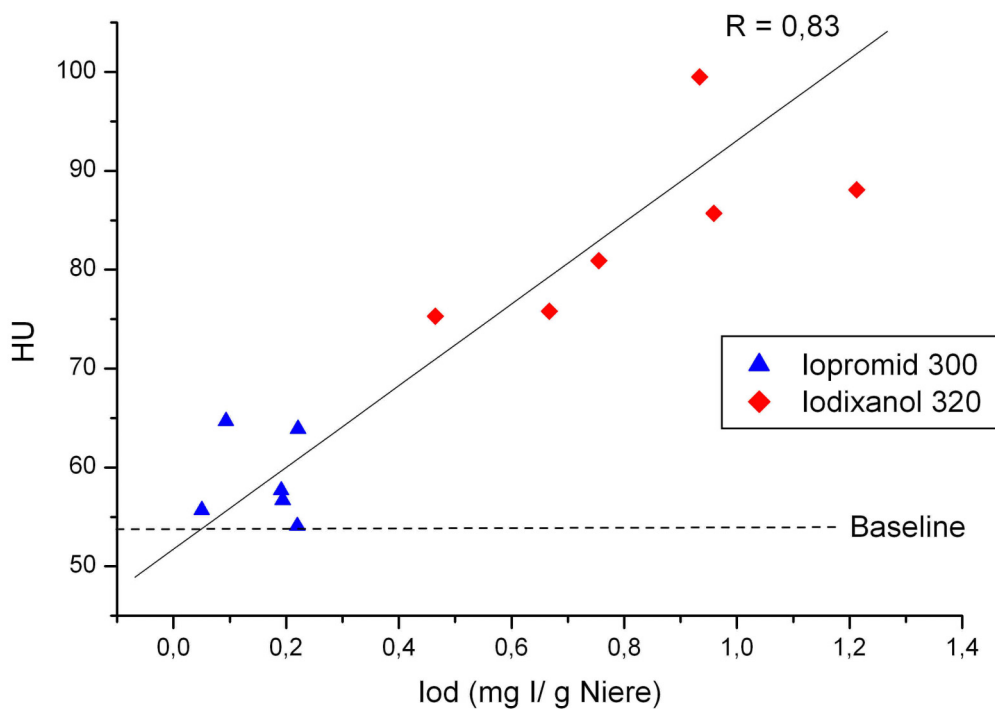


Abbildung 8: Absorptionskoeffizient (HU) der Nierenrinde (x-Achse) verglichen mit der Iodkonzentration in der Niere (Y-Achse) drei Stunden nach Applikation von Iopromid 300 (blaue Dreiecke) und Iodixanol 320 (rote Rauten) in einer Konzentration von 1g Iod/kg KM. Jedes Dreieck bzw. jede Raute entspricht einem Versuchstier.

Die Nieren der Tiere, welchen Iodixanol injiziert wurde, enthielten im Vergleich zu den Tieren, die Iopromid erhielten, eine höhere Iodkonzentration. Insbesondere in der Nierenrinde wurden eine erhöhte Absorption und damit eine verminderte Retention beobachtet. Je später der gewählte Zeitpunkt und je höher die Dosis, umso deutlicher waren diese Effekte zu beobachten. Wie in Abbildung 9 dargestellt, konnte eine Korrelation zwischen dem Iodgehalt der ganzen Niere und des Absorptionskoeffizienten der Nierenrinde festgestellt werden.

Retentionszeit

Um den Absorptionskoeffizienten der Nierenrinde nach Applikation verschiedener Kontrastmittel miteinander zu vergleichen, wurden vor der Injektion der Kontrastmittel CT-Bilder aufgenommen und die dazu passenden Baseline-Werte ermittelt. Die Baseline-Werte lagen bei allen mit Iopromid behandelten Tieren bei $53,6 \pm 1,4$ HU; bei allen mit Iodixanol behandelten Tieren bei $54,4 \pm 2,2$ HU. Der durchschnittliche Baseline-Wert für alle Ratten lag bei 54 HU, weshalb dieser als Baseline-Wert in den Berechnungen herangezogen wurde.

Nach der Iopromid Injektion konnte eine kontinuierliche Abnahme der Iodkonzentration und des Absorptionskoeffizienten der Nierenrinde festgestellt werden. Bei der injizierten Menge von 1g Iod/kg KM Iopromid 300 wurde die höchste Konzentration eine Stunde p.i. ermittelt. Die zugehörige Iodkonzentration entsprach zu diesem Zeitpunkt 0,8 mg Iod/g Niere bei einem Absorptionskoeffizient von $70,8 \pm 2,0$ HU.

Nach Iodixanol-Injektion (1g Iod/kg KM Iodixanol 320 mg) wurde die höchste Konzentration erst nach zwei Stunden erreicht (1,3 mg Iod/g Niere). Die Iodabsorption nach einer Stunde entsprach $100,1 \pm 3,7$ HU.

Wie in Abbildung 10c zu sehen, konnte drei Stunden nach der Iopromid-Injektion kein Unterschied mehr zwischen Nierenmark und Nierenrinde festgestellt werden. Der Absorptionskoeffizient dieser Tiere war auf den Baseline-Wert abgesunken. Bei den Tieren, welche mit Iodixanol behandelt wurden, war der Unterschied von Nierenrinde und Nierenmark, wie Abbildung 10 zeigt, deutlich zu sehen. Dies spiegelte sich ebenfalls in dem erhöhten Absorptionskoeffizient wieder. Der Unterschied zum Baseline-Wert entspricht bei diesen Tieren $25,21 \pm 2,34$ HU, was einer Iodkonzentration von 1,64 mg Iod/ml im renalen Cortex gleichkommt.

Diese Unterschiede konnten ebenfalls durch die Berechnung der Fläche unter der Kurve (AUC) beschrieben werden. Die AUC gibt die Exposition der Niere mit dem Kontrastmittel wieder. Die Exposition der Niere nach Iopromid 300 Injektion entsprach $1,49 \pm 1,39$ mg/ml * 24 Stunden. Nach Iodixanol 320 Injektion zeigte sich ein Wert von $12,54 \pm 2,66$ mg Iod/ml * 24 Stunden.

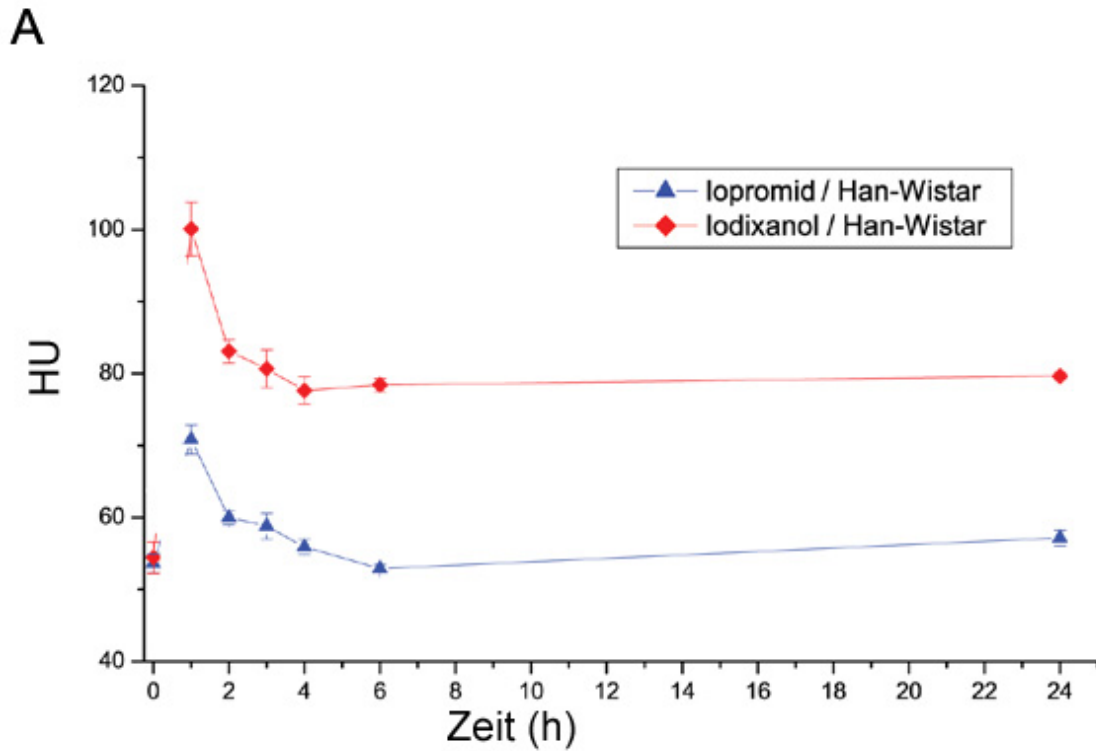
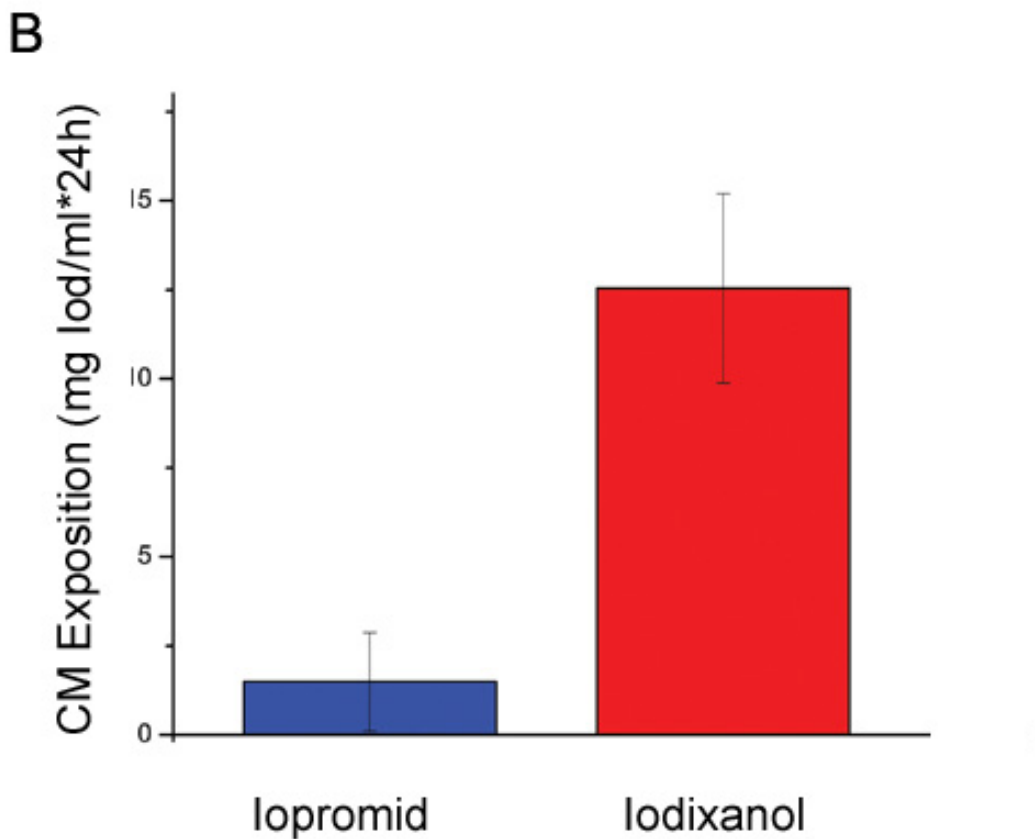
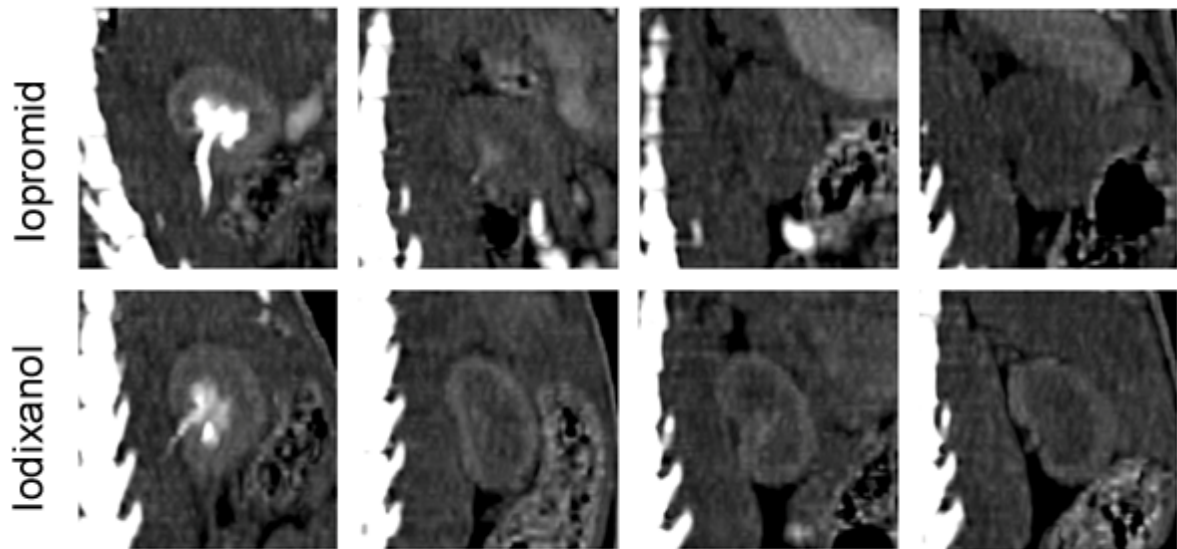


Abbildung 9: Retentionszeit von Kontrastmitteln in der Niere nach Applikation von Iopromid 300 und Iodixanol 320. (A) Absorptionskoeffizient (HU) des Cortex renalis vor und 1, 2, 3, 4, 6 und 24 Stunden nach Iopromid 300 (blaue Linie) oder Iodixanol 320 (rote Linie); i.v. Injektion in einer Dosierung von 1g Iod/kg KM .



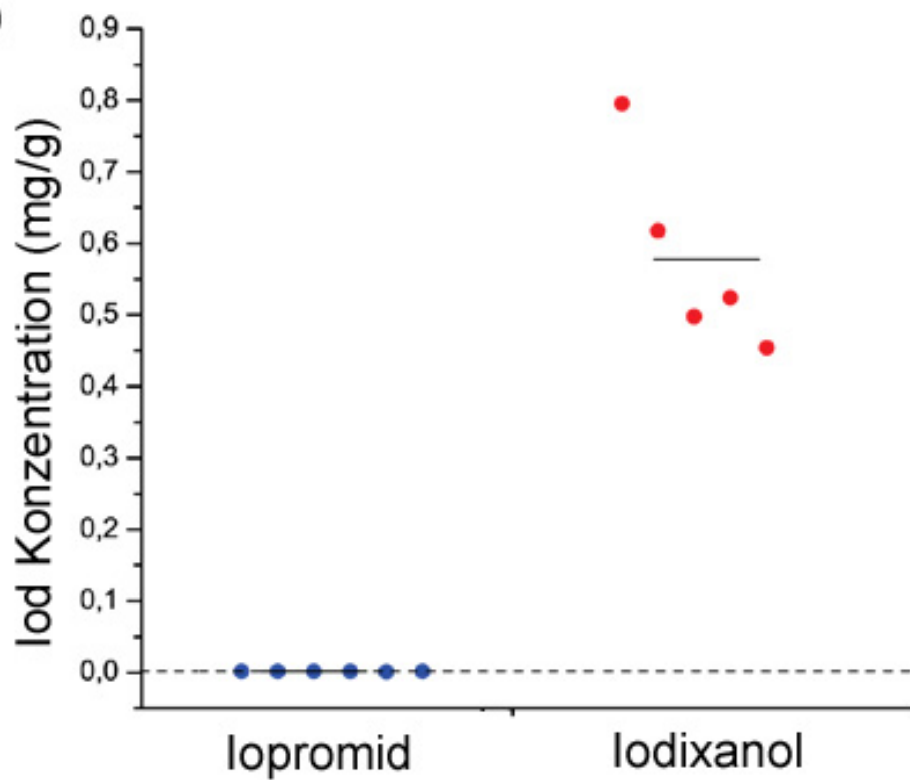
(B) Exposition der Niere mit Kontrastmittel in den ersten 24 Stunden nach Iopromid 300 (linke Säule) oder Iodixanol 320 (rechte Säule) Injektion

C



(C) Repräsentative CT Aufnahmen der Niere 1, 2, 6 und 24 Stunden nach 1g Iod/kg KM i.v. Injektion Iopromid 300 oder Iodixanol 320.

D



(D) Iodkonzentration der Niere 4h nach Injektion von 1g Iod/kg KM Iopromid 300 oder Iodixanol 320.

Iodkonzentration bei der Röntgenfluoreszenzanalyse

24 Stunden p.i. konnte eine 100-fach höhere Iodkonzentration in der Niere nach Iodixanol 320 (0,265 +/- 0,136 mg Iod/g Niere) Gabe im Vergleich zur Iopromid 300 (0,002 +/- 0,001 mg Iod/g Niere) Applikation in der RFA gemessen werden.

Abhängigkeit der Retentionszeit von der applizierten Dosis

Der Absorptionskoeffizient und der Iodgehalt der Niere sind abhängig von der applizierten Dosis. Die höchste Iodkonzentration wurde nach Applikation des höher viskösen Kontrastmittels Iodixanol beobachtet.

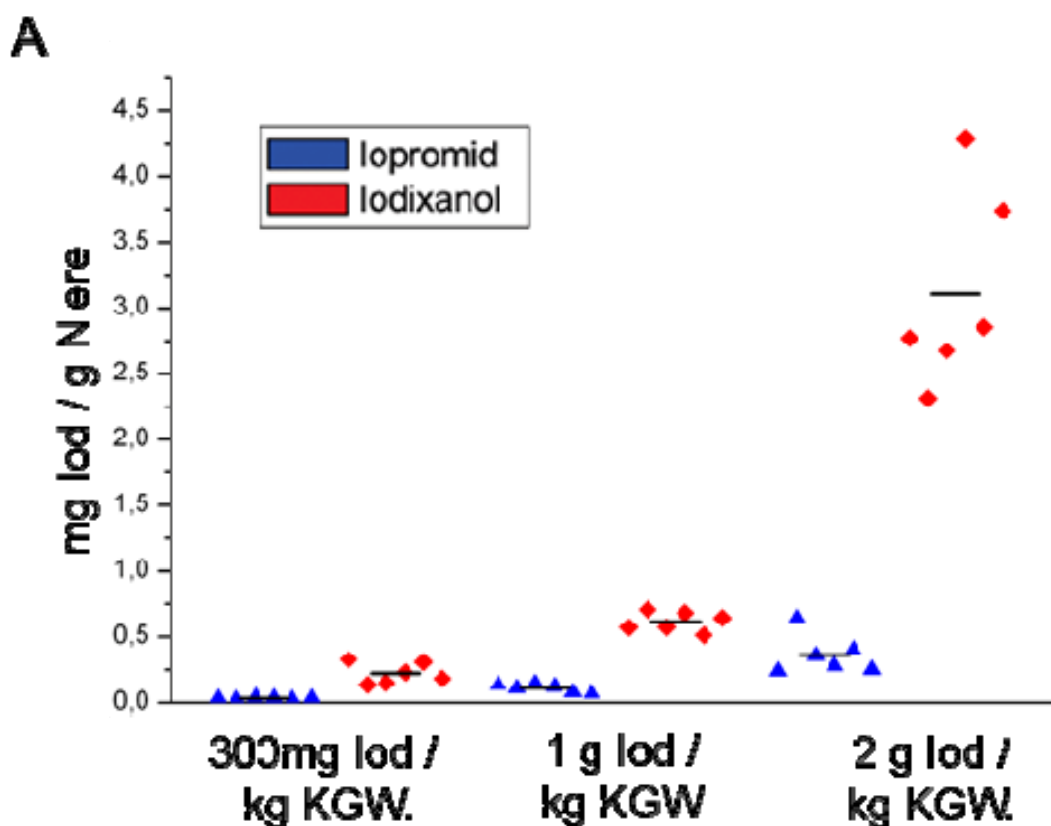
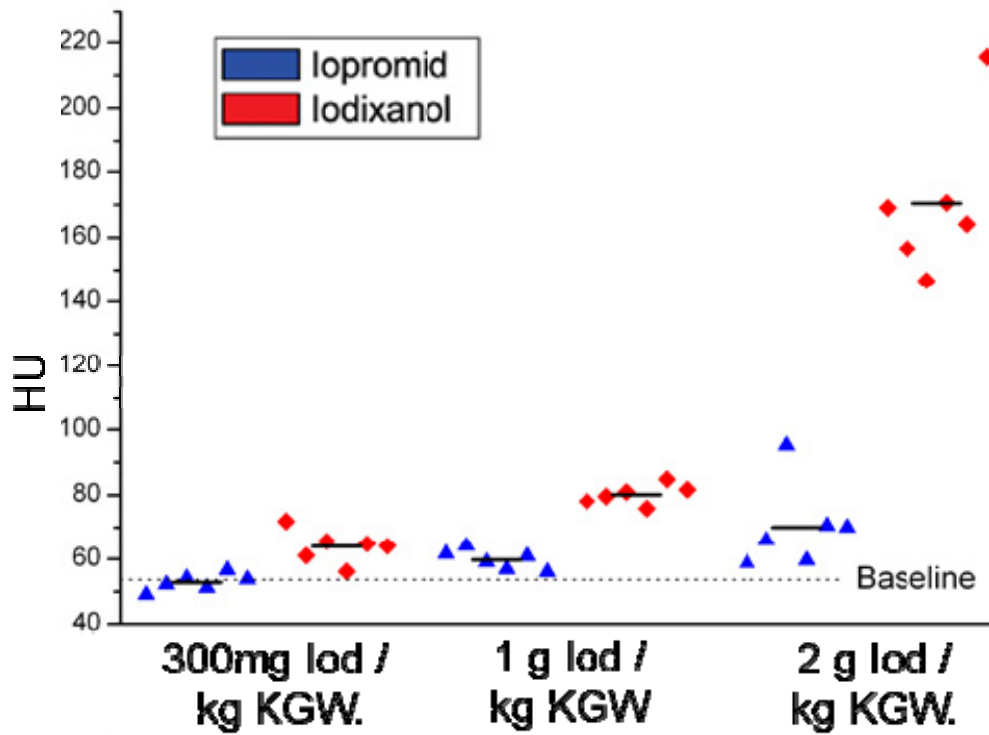
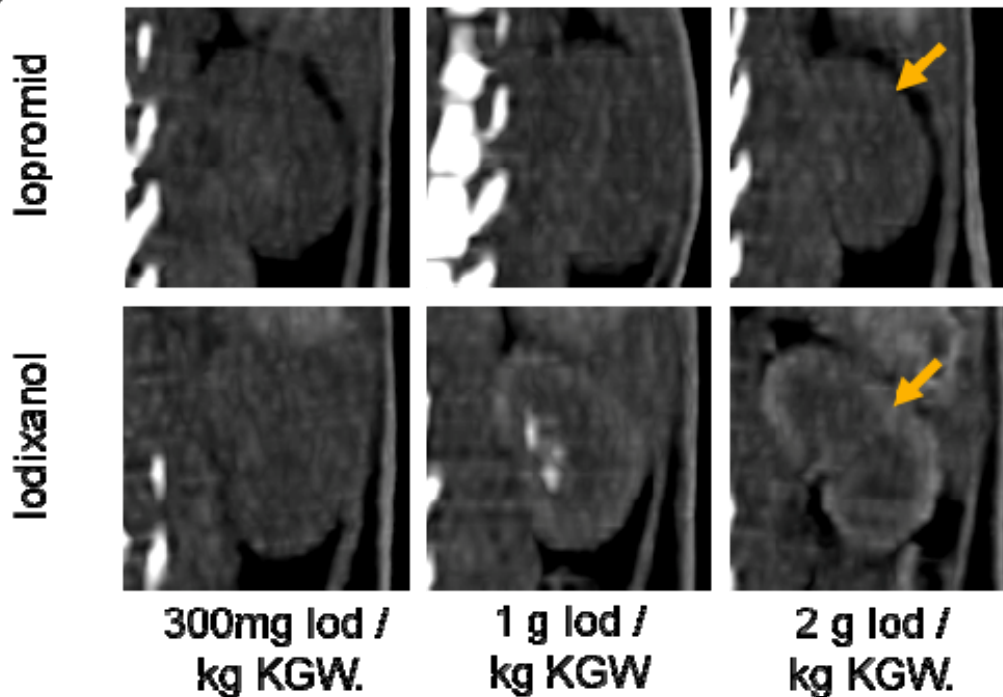


Abbildung 10: Kontrastmittelkonzentration in der Niere 3 Stunden nach Injektion verschiedener Mengen Kontrastmittel bei Han-Wistar-Ratten.

(A) Ermittelte Iodkonzentration in der Niere 3 Stunden nach Applikation verschiedener Kontrastmittel Konzentrationen (300mg, 1g, 2g Iod/kg KM Iopromid 300 und Iodixanol 320) mittels RFA.

B

(B) Iodabsorption (HU) der Nierenrinde 3 Stunden nach Applikation verschiedener Konzentrationen Iopromid 300 (blaue Dreiecke) und Iodixanol 320 (rote Raute) (0,3, 1, 2 g Iod/kg KM)

C

(C) Repräsentative CT Bilder 3 Stunden nach Applikation verschiedener Konzentrationen Iopromid 300 (obere Reihe) und Iodixanol 320 (untere Reihe) (0,3, 1, 2 g Iod/kg KM).

Iodkonzentration

Bei Erhöhung der Iodkonzentration von 0,3 auf 2g Iod/kg KM stieg der Wert nach Iopromid 300 Injektion um 0,33 mg Iod/g Niere, von 0.03 +/- 0,01 auf 0.36 +/- 0,16 mg Iod/g Niere und nach Iodixanol 320 Injektion sogar um 2,89 mg Iod/g Niere, von 0,22 +/- 0,08 auf 3,11 +/- 0,75 mg Iod/g Niere an (siehe Abbildung 11).

Absorptionskoeffizient

Nach der Injektion von Iopromid 300 in einer Dosis von 0,3 g Iod/kg KM konnte lediglich ein geringer Anstieg des Absorptionskoeffizienten verzeichnet werden. Drei Stunden nach Applikation von 0,3 g Iod/kg KM und 2 g Iod/kg KM Iopromid 300 konnten Absorptionskoeffizienten von 52,8 +/- 2,6 und 70,0 +/- 13,3 HU im renalen Cortex verzeichnet werden. Nach Iodixanol 320-Injektion konnte eine Dosis-abhängige Erhöhung des Absorptionskoeffizienten festgestellt werden. Drei Stunden nach der Injektion von 0,3 g Iod/kg KM Iodixanol 320 wurden Werte in Höhe von 64,0 +/- 5,2 HU im Cortex renalis gemessen. Nach Applikation von 2 g Iod/kg KM Iodixanol 320 wurden Werte von 170,4 +/- 23,8 HU gemessen.

Absorptionskoeffizient und Iodgehalt bei nierenvorgeschädigten ZSF1-Ratten

Bei den nierenvorgeschädigten ZSF1-Ratten, welche mit dem dimeren Kontrastmittel behandelt wurden, konnten über die gesamte Messzeit ebenfalls ein erhöhter Absorptionskoeffizient festgestellt werden. Im ersten Versuch wurden ZSF1-Ratten und gesunde Han-Wistar-Ratten verglichen. Die Tiere erhielten 1g Iod/kg KM des jeweiligen Kontrastmittels und wurden in einem Zeitraum von drei Stunden wiederholt untersucht. Obwohl die ZSF1-Ratten dieselben Baseline-Werte wie die Han-Wistar-Ratten zeigten, war der Absorptionskoeffizient zu allen gemessenen Zeitpunkten erhöht. Eine Stunde nach Iopromid 300 Applikation zeigten die Han-Wistar-Ratten Absorptions-Werte von 70,83 +/- 2,03 HU im cortex renalis. Die ZSF1-Ratten zeigten dagegen zu diesem Zeitpunkt Werte von 258,5 +/- 3,0 HU. Eine Stunde nach Iodixanol 320 Injektion zeigte sich bei den Kontrolltieren Absorptionskoeffizienten von 83,1 +/- 1,5 HU im renalen Cortex. Bei den ZSF1-Ratten ergaben sich Werte von 308,6 +/- 18,7 HU im Cortex renalis.

Drei Stunden nach Iopromid 300 Applikation offenbarten sich in der Nierenrinde der Kontrolltiere durchschnittlich Werte von 58,8 +/- 1,8 HU, wohingegen die Nierenrinde der ZSF1-Ratten einen Absorptionskoeffizienten von 156,5 +/- 4,9 HU aufwies. Nach Applikation von Iodixanol 320 waren bei den ZSF1-Ratten Werte von 271,1 +/- 2,4 HU im

Cortex renalis zu verzeichnen und bei den Han-Wistar Werte von $80,6 \pm 2,4$ HU. Diese Unterschiede spiegeln sich ebenfalls bei der AUC wieder. Für die ZSF1-Ratten zeigte sich eine Exposition von $0,54 \pm 0,25$ mg Iod/ml * 3 Stunden nach Iopromid 300 Injektion. Nach Iodixanol 320 Injektion zeigte sich bei diesen Tieren eine Exposition von $1,82 \pm 0,37$ mg Iod/ml * 3 Stunden.

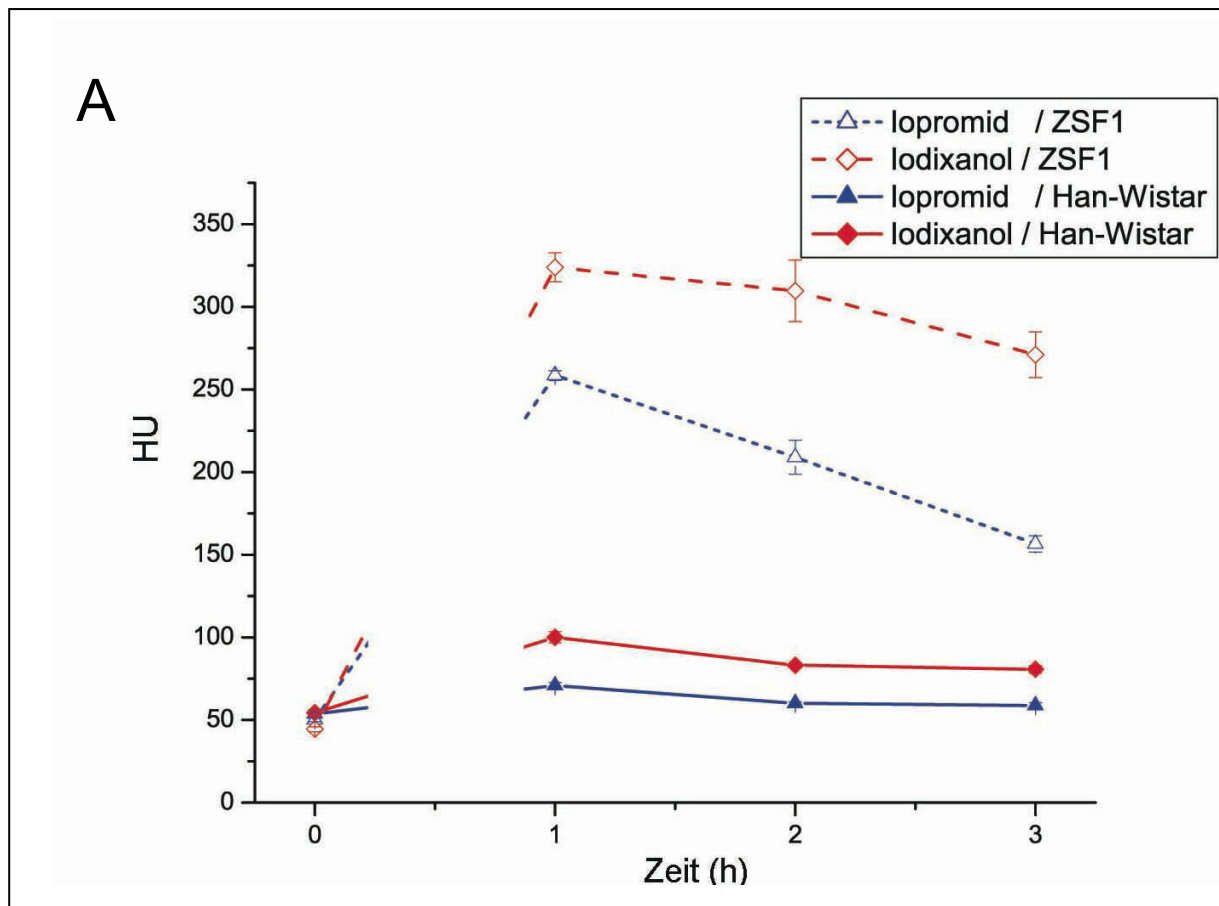
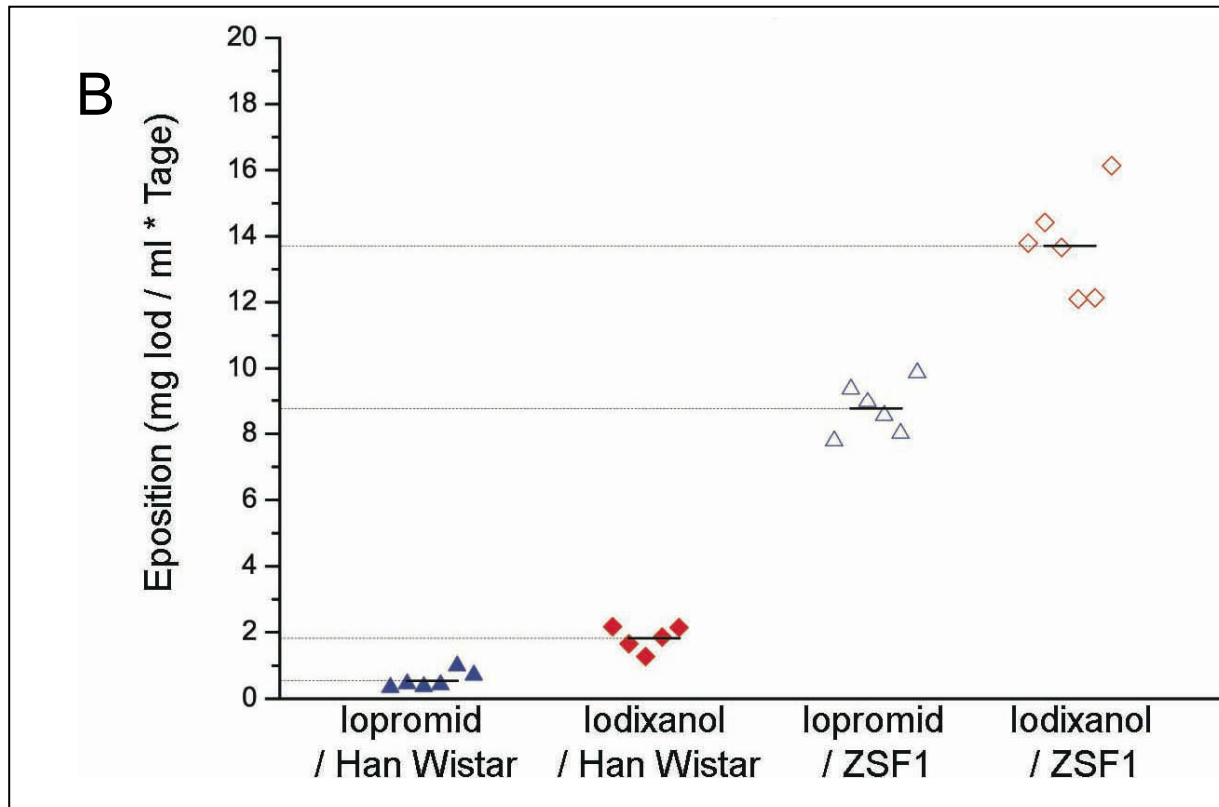


Abbildung 11: Retentionszeit von Kontrastmitteln in der Niere bei niereninsuffizienten ZSF1-Ratten und gesunden Han Wistar Kontrolltieren.

(A) Absorptionskoeffizient (HU) der Nierenrinde nach Applikation von 1g Iod/kg KM Iopromid 300 (durchgezogene blaue Linie) und Iodixanol 320 (durchgezogene rote Linie) an Han-Wistar-Ratten und Iopromid 300 (blaue Punktlinie) und Iodixanol 320 (rote Punktlinie) an ZSF1-Ratten 1, 2, 3 und 4 Stunden p.i.. Es ist zu beachten, dass die Messwerte bei den ZSF1-Ratten grössere Varianz aufweisen als die der Kontrolltiere und dadurch die Standardabweichung der ZSF1-Ratten höher ausfällt.



(B) Exposition der Nieren mit Kontrastmitteln innerhalb der ersten 24 Stunden nach Injektion von Iopromid 300 (ausgefüllte rote Raute) und Iodixanol 320 (ausgefüllte blaue Raute) bei Han-Wistar-Ratten und Iopromid 300 (blaue Raute) und Iodixanol 320 (rote Raute) bei ZSF1-Ratten. Die schwarze Linie entspricht der durchschnittlichen Exposition.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die ZSF1-Tiere bis zum Tag 17 weiter untersucht, wobei festgestellt wurde, dass die mit Iodixanol behandelten Tiere zu jedem Zeitpunkt einen höheren Absorptionskoeffizienten aufwiesen als die Tiere, die mit Iopromid behandelt wurden. In Abbildung 13 wird dies noch einmal verdeutlicht.

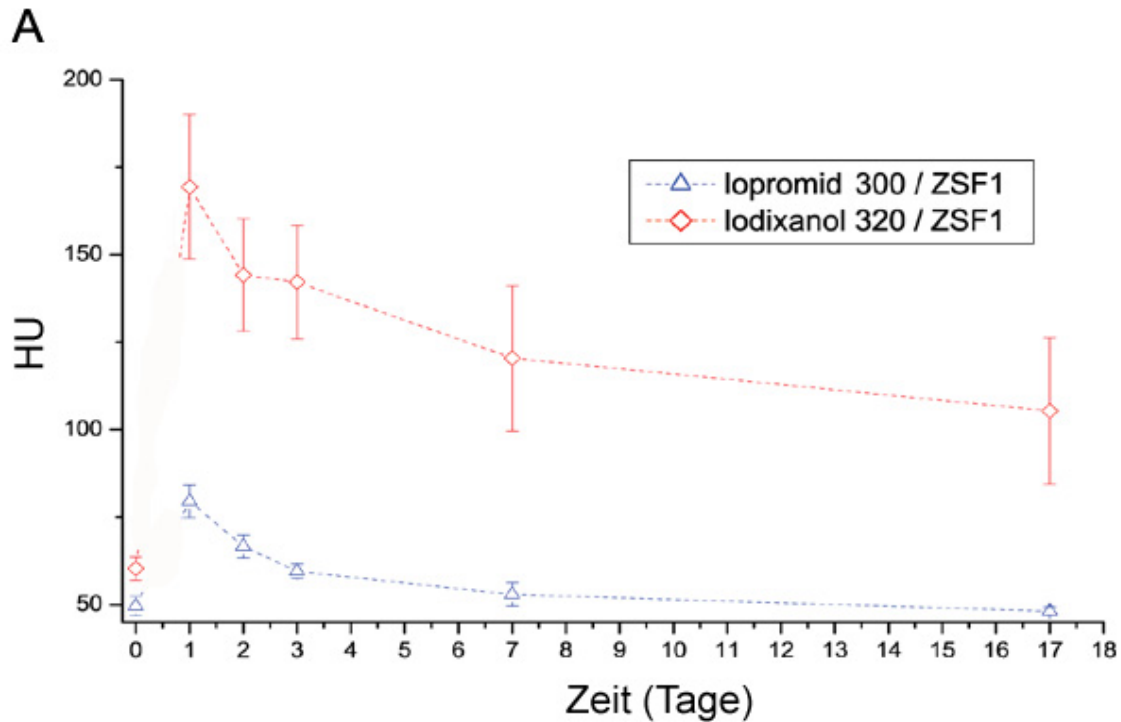
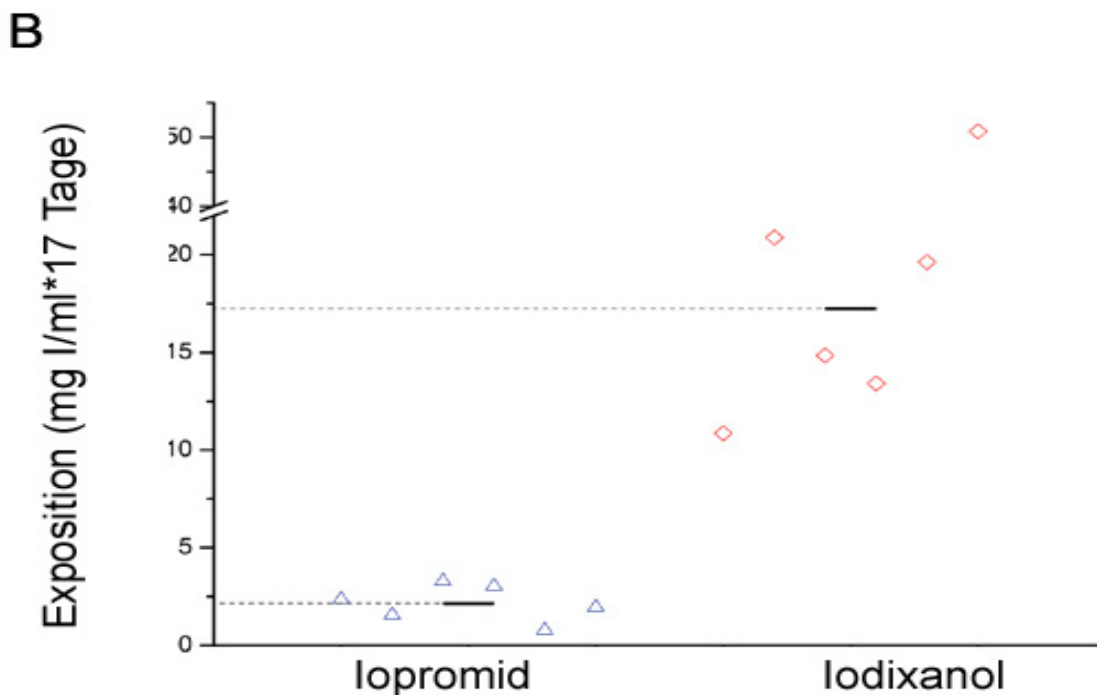


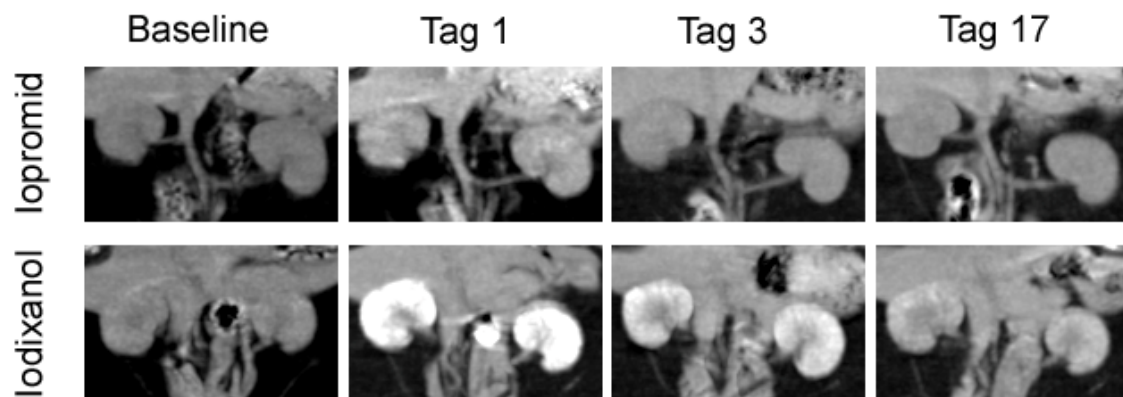
Abbildung 12: Retentionszeit der Kontrastmittel bei niereninsuffizienten ZSF1-Ratten.

(A) Iodabsorption (HU) der Nierenrinde vor und nach 1, 2, 3, 7 und 17 Tagen post injectionem von 1 g Iod/kg KM Iopromid 300 (untere Linie) und Iodixanol 320 (obere Linie).



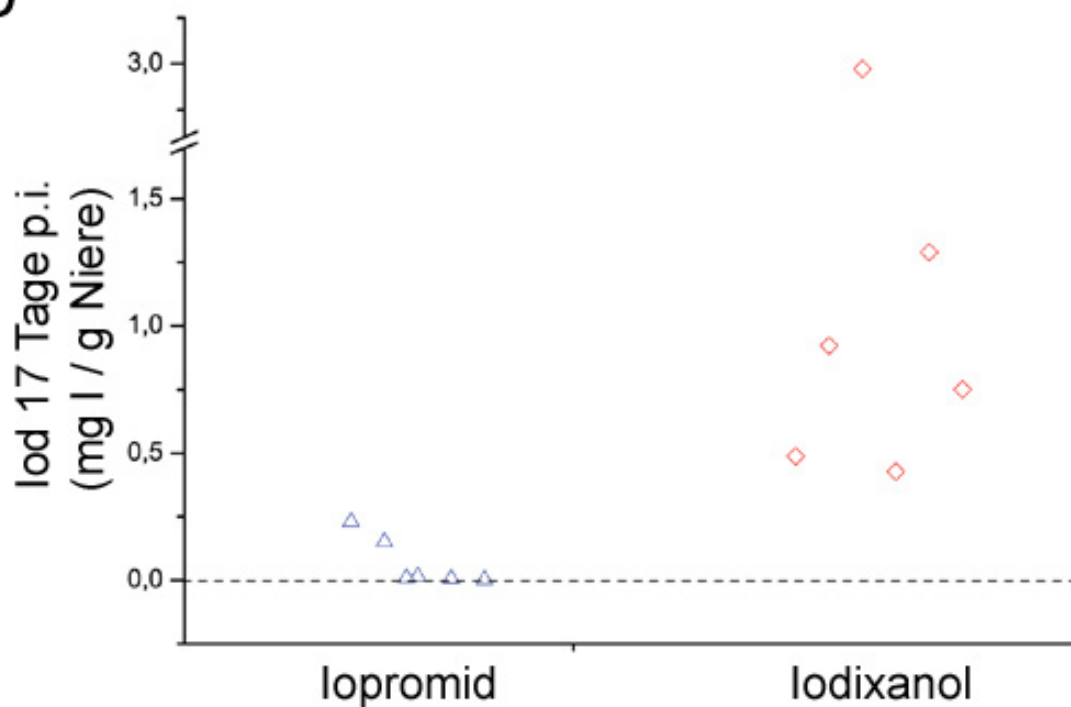
(B) Die Exposition der Niere bei niereninsuffizienten ZSF1-Ratten nach Applikation von 1 g Iod/kg KM Iopromid 300 (linkes Diagramm) und Iodixanol 320 (rechtes Diagramm). Der Mittelwert wird durch eine schwarze Linie dargestellt.

C



(C) Representative CT Bilder der Niere vor (Baseline) und 1, 3 und 17 Tage nach Applikation von 1 g Iod/kg KM Lopromid 300 (obere Reihe) und Iodixanol 320 (untere Reihe).

D



D) Iodkonzentration in der Niere von ZSF1-Ratten 17 Tage nach Applikation von 1 g Iod/kg KM Lopromid 300 (linkes Diagramm) und Iodixanol 320 (rechtes Diagramm) ermittelt durch RFA. Bei den mit dimeren Kontrastmitteln behandelten Ratten wurden signifikant höhere Iodkonzentrationen gemessen.

Nach Iopromidgabe (Iopromid 300) konnte bei den ZSF1-Ratten nur zu sehr frühen Zeitpunkten (ein Tag p.i.) ein Unterschied zum Baseline-Wert festgestellt werden. Am ersten Tag p.i. konnten Werte von $79,5 \pm 4,6$ HU und damit ein Unterschied von $29,9 \pm 4,6$ HU ermittelt werden. Dies entspricht einer Iodkonzentration von $1,66$ mg Iod/ml im renalen Cortex. Am dritten, siebten und siebzehnten Tag waren keine Unterschiede zum Baseline-Wert erkennbar. Ein Tag nach Iodixanol 300 Injektion waren Werte von $169,4 \pm 20,6$ HU und ein Unterschied von $109,1 \pm 20,3$ HU errechnet worden. Dies entspricht einer Iodkonzentration der Nierenrinde von $3,53$ mg Iod/ml. Am 17. Tag p.i. war der Absorptionskoeffizient dieser Tiere immer noch bei $105,3 \pm 21,0$ HU und damit der Unterschied zum Baseline-Wert bei $45,1 \pm 19,7$. Dies lässt auf eine Iodkonzentration von $2,19$ mg Iod/ml im Cortex renalis schließen.

Wie Abbildung 13 zeigt, konnte am Tag 17 in den Nieren aller mit Iodixanol behandelten Tiere immer noch eine Iodkonzentration von $1,14 \pm 0,39$ mg Iod/g Niere in der RFA festgestellt werden. Wohingegen bei den Tieren, die Iopromid erhielten, nur bei zwei von sechs Tieren ein messbarer Iodgehalt von $0,07 \pm 0,04$ mg Iod/g Niere nachgewiesen werden konnte.

Die unterschiedliche Exposition der Nieren durch die Kontrastmittel kann auch durch die AUC dargestellt werden. Nach der Behandlung mit Iopromid 300 wurden Mittelwerte von $2,15$ mg Iod/ml * Tage errechnet, wohingegen nach Behandlung mit Iodixanol 320 eine 8-fach höhere Exposition von $17,24$ mg Iod/ml * Tage errechnet wurde.

Die höhere Exposition nach Behandlung mit dem höher viskösen Iodixanol war im Vergleich mit der Behandlung mit dem weniger viskösen Iopromid in beiden Modellen signifikant ($p < 0,001$). Darüber hinaus war ein signifikanter Unterschied ($p < 0,001$) in der Exposition nach der Behandlung mit Iodixanol und Iopromid in den ZSF1-Ratten im Vergleich zu den Han-Wistar-Ratten nachweisbar.

Laborparameter der ZSF1-Ratten

Laborparameter	Referenzwerte: Han-Wistar Ratten Futter: Standardfutter	Referenzwerte: Han-Wistar Ratten Futter: spezielles Diätfutter	ZSF1-Ratten Futter: spezielles Diätfutter
Glucose mg/dl	86 +/- 8	192,67 +/- 25.15	285,47 +/- 100,19
Cholesterin mg/dl	76 +/- 17	76,33 +/- 18.15	393,35 +/- 241,44
Harnstoff/BUN mg/dl	18 +/- 2	15 +/- 1	15,36 +/- 7,23
Kreatinin mg/dl	0,69 +/- 0,05	0,78 +/- 0,05	0,91 +/- 0,21
Kalzium mmol/l	2,73 +/- 0,04	2,57 +/- 0,08	2,75 +/- 0,15
Natrium mmol/l	145 +/- 2	144,67 +/- 1	139,82 +/- 3,96
Kalium mmol/l	5,25 +/- 0,66	4,59 +/- 0,12	7,26 +/- 11,10
Chlorid mmol/l	103 +/- 2	107 +/- 2,65	96,35 +/- 5,97
Phosphor mg/dl	7,82 +/- 0,17	4,63 +/- 0,68	5,92 +/- 1,72
Triglyzerid mg/dl	32, 7 +/- 11,6	196,67 +/- 62,98	271,06 +/- 79,35
Eisen µg/dl	121,5 +/- 25,6	219,23 +/- 52,14	202 +/- 54,62
Magnesium mmol/l	0,96 +/- 0,063	0,88 +/- 0,01	1,53 +/- 0,64
GLDH Unit/l	7,22 +/- 1,64	31,07 +/- 20,95	42,14 +/- 32,80
AST Unit/l	103 +/- 14	99,33 +/- 34,82	136,71 +/- 103,96
ALT Unit/l	39 +/- 8	47 +/- 4,36	120,88 +/- 99,67
ALP Unit/l	52 +/- 11	46,67 +/- 2,08	115,24 +/- 48,15
Albumin g/dl	4,067 +/- 0,175	3,97 +/- 0,25	4,25 +/- 0,34

Tabelle 11: Laborwerte der ZSF1- und Han-Wistar Ratten.

Als Referenztiere dienten Han-Wistar-Ratten, welche dasselbe Futter wie die ZSF1-Ratten erhielten. Die Tiere waren gleichen Alters und wurden gemeinsam mit den ZSF1-Ratten in einem Käfig gehalten. Durch den hohen Eiweißgehalt des Futters waren diese Tiere ebenfalls adipös. Ihre Laborwerte zeigten gegenüber Laborratten mit normaler Fütterung (normaler Eiweißgehalt) ebenfalls Abweichungen. Zum Vergleich sind Referenzwerte von 31-36 Wochen alten Han-Wistar Ratten, welche Standardfutter mit normalem Eiweißgehalt erhielten, ebenfalls aufgeführt.

4.2. Genexpressionsanalyse / Proteinbestimmung

Genexpressionsanalyse des Kidney injury molecule (Kim-1) und der Hämoxygenase (HO-1) in der Niere

Um die potentielle Schädigung in der Niere zu evaluieren, wurde die Genexpression für die Gene der beiden Proteine Kidney injury molecule (KIM-1) und Hämoxygenase (HO-1) durch die reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion bestimmt. KIM-1 wird erfolgreich als spezifischer früher Biomarker zur Erkennung von Nierenschäden verwendet (Ichimura *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 2008). HO-1 ist etabliert als Hypoxie- und Ischämie-Biomarker (Maines and Panahian, 2001). Ratten, die mit Iodixanol behandelt wurden, zeigten eine signifikante Erhöhung des KIM-1 gegenüber den Ratten, die ausschließlich Kochsalzlösung erhielten. Die mit Iopromid behandelten Tiere zeigten keinen signifikanten Unterschied gegenüber der Kontrollgruppe. Darüber hinaus zeigte sich, dass die HO-1 mRNA-Expression in den mit Iodixanol behandelten Tieren ebenfalls als signifikant erhöht angesprochen werden kann. Im Gegensatz dazu zeigten die mit Iopromid behandelten Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren keine Veränderung in der HO-1 Expression. Dieses Verhältnis wird in Abbildung 14 verdeutlicht. Demnach zeigt Iodixanol einen signifikanten Effekt auf die untersuchten Biomarker der Niere, wohingegen unter Anwendung von Iopromid kein solcher zu verzeichnen ist.

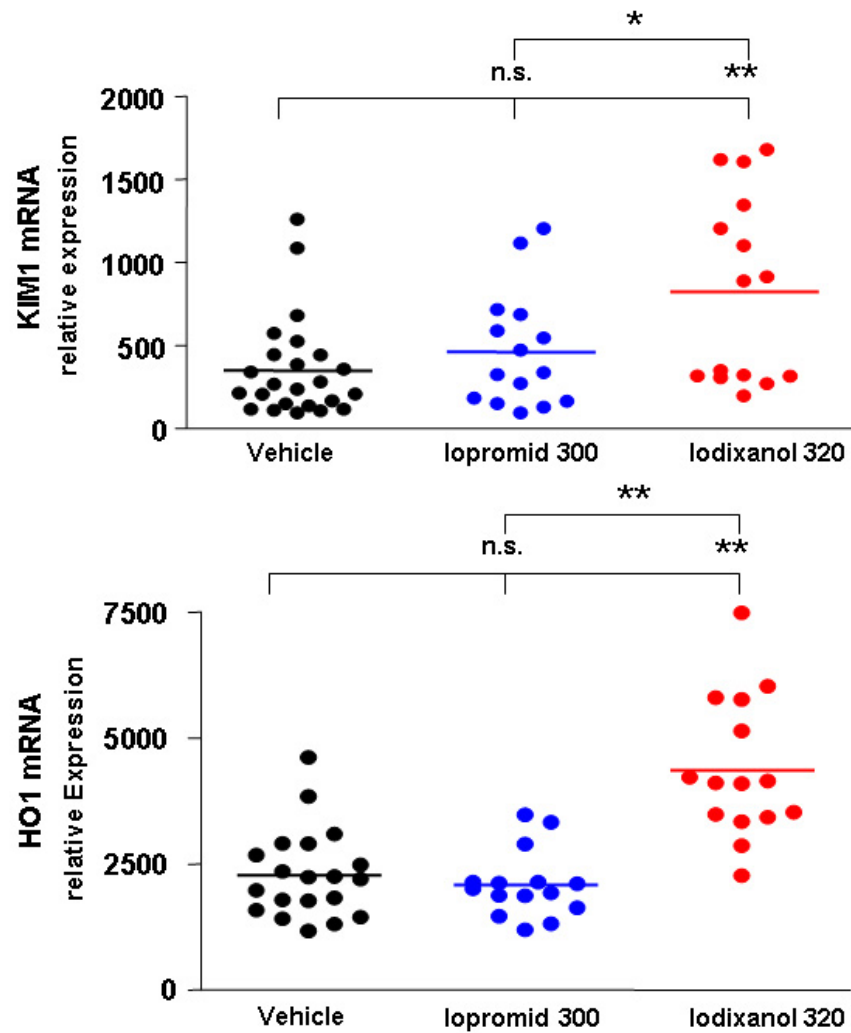


Abbildung 13: Genexpression von Biomarkern als Indikatoren für Nierenschädigung.

Genexpression des KIM-1 und der HO-1 24 Stunden nach Applikation von 0,9 % Kochsalzlösung (schwarz), Iopromid 300 (blau) und Iodixanol 320 (rot). Die Tiere erhielten die Kontrastmittel in einer Dosis von 4g Iod/kg KM. Die Kontrolltiere erhielten ein vergleichbares Volumen an Kochsalzlösung. Statistik: 1-way ANOVA und Tuckey's multiple comparison test, * p<0.05 bzw ** p<0.01

Proteinbestimmung

Um Biomarker zur Erkennung von frühen Nierenschäden in einem weiten Versuch nachzuweisen, wurden verschiedene Proteinanalysen durchgeführt. Die hierbei untersuchten Proteine waren: Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 (TIMP-1), Epidermal Growth Factor (EGF), Cystatin-C, Calbindin, Osteopontin, Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin (NGAL), KIM-1, Glutathione S-Transferase-alpha (GST-alpha) und Clustertin.

TIMP-1 hat als ein Hauptregulator der Synthese der extrazellulären Matrix herausragende Bedeutung. Sein Proteinniveau lag bei der Kontrollgruppe bei 0,5 +/- 0,2 ng/ml, bei Tieren nach Iopromid-Injektion ebenfalls bei 0,5 +/- 0,2 ng/ml und bei den Tieren nach Iodixanol-Gabe bei 1,0 +/- 0,4 ng/ml (siehe Abbildung 15).

Epidermal Growth Factor (EGF) ist mitverantwortlich für das Zellwachstum. In der Proteinanalyse konnte er bei der Kontrollgruppe mit 14,5 +/- 3,8 ng/ml, bei der Iopromid Gruppe mit 16,3 +/- 4,5 ng / ml und bei der Iodixanol Gruppe mit 12,8 +/- 2,5 ng/ml nachgewiesen werden.

Cystatin-C wird zur Nieren- und Urindiagnostik verwendet. Cystatin-C gehört zu den Cysteinprotease-Inhibitoren. Es wird normalerweise in den Endothelzellen exprimiert. Bei endothelialer Schädigung zeigt es sich erhöht. Bei der Kontrollgruppe lag Cystatin-C bei 258,2 +/- 102,7 ng/ml, bei den Tieren welche Iopromid erhielten bei 212,3 +/- 37,9 ng/ml und bei der Iodixanol Gruppe bei 532 +/- 158,3 ng/ml.

Das Vitamin D-abhängige Calbindin ist an den distalen Tubuluszellen und den Sammelrohren in den Ca^{2+} -Transport involviert. Es zeigte bei der vorliegenden Untersuchung bei der Kontrollgruppe Werte von 15733,3 +/- 5152,7 ng/ml, bei den Tieren die vor Entnahme Iopromid erhielten 14050 +/- 2725,3 ng/ml und denen, welche Iodixanol appliziert wurde, 15966,7 +/- 3975,3 ng/ml.

Osteopoetin wird mit der Interaktion der Zellmatrix in Verbindung gebracht. Im folgenden Versuch lag das Proteinniveau von Osteopoetin in der Kontrollgruppe bei 3,1 +/- 1,5 ng/ml, bei den mit Iopromid behandelten Tiere bei 2,9 +/- 0,4 ng/ml und bei den Tieren, die Iodixanol erhielten, bei 1,6 +/- 0,6 ng/ml.

NGAL interagiert mit einer Vielzahl von Molekülen im Körper und spielt eine Rolle bei allergischen Prozessen. Es zeigte sich im Versuch ebenfalls bei den mit Iodixanol behandelten Tieren (81,2 +/- 20,7 ng/ml) im Vergleich zu der Kontrollgruppe (32,5 +/- 10,9 ng/ml) und den Tieren nach Iopromid Applikation (37,4 +/- 10,9 ng/ml) erhöht.

Die Proteinmenge für KIM-1 war bei allen Tieren der Kontroll- und Iopromid Gruppe unter der Nachweisgrenze. Bei vier Tieren der Iodixanol Gruppe konnte hingegen eine KIM-1 Expression von 0,2 +/- 0,2 ng/ml nachgewiesen werden.

Glutathione S-Transferase-alpha (GST-alpha) spielt eine Schlüsselrolle bei der Entgiftung von Radikalen. GST-alpha war für alle drei Versuchsgruppen oberhalb des möglichen Messbereiches positioniert und konnte somit nicht ausgewertet werden.

Der Anstieg von Clustertin im Gewebe gibt Hinweis auf Zellapoptose. Für die Kontrollgruppe wurden Werte von 1,4 +/- 0,5 µg/ml gemessen. Bei den mit Iopromid behandelten Tieren wurden ein Wert von 1,3 +/- 0,4 µg/ml und für Iodixanol Werte von 1,7 +/- 0,5 µg/ml gemessen.

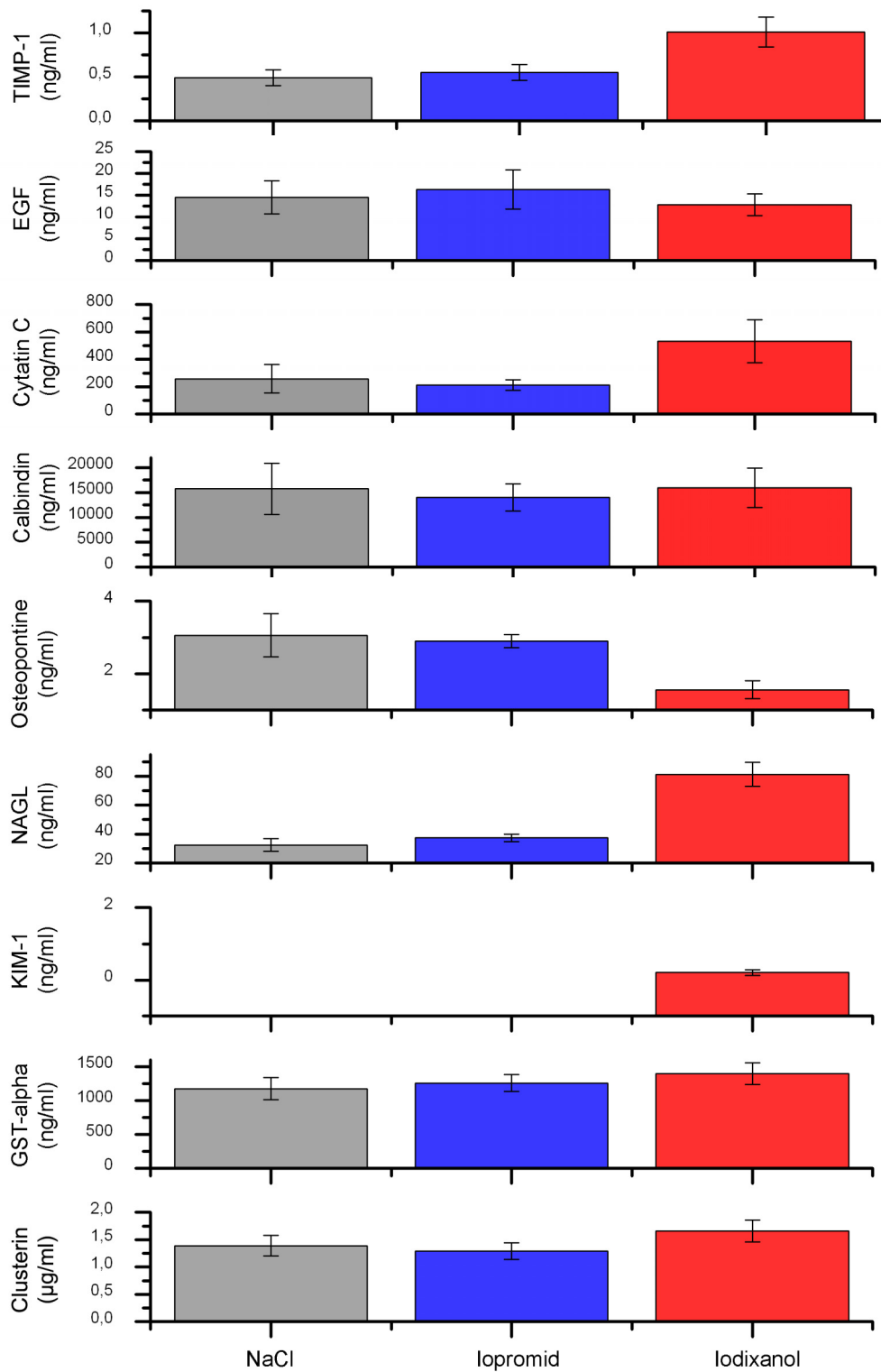


Abbildung 14: Proteinniveau von VEGF, TIMP-1, GST Mu, EGF, Cystatin-C, Calbindin, Osteopontin, NAGL, KIM-1, GST-alpha und Clusterin 24 Stunden p.i. 0,9% NaCl (grau), Iopromid 300 (blau) und Iodixanol 320 (rot) in einer Konzentration von 4g Iod/kg KM bzw. einer vergleichbaren Volumenmenge (bei Kontrolltieren).

4.3. Zytotoxizität

4.3.1. Mitochondriale Aktivität

Die Ergebnisse zeigten *in vitro* einen Abfall in der mitochondrialen Dehydrogenase-Aktivität, was zu einem geringeren MTT-Umsatz führte. Dieses Ereignis war Konzentrations- jedoch nicht Zeit-abhängig. Die MTT-Reduktion war bei einer Konzentration von 10 mg Iod/ml noch bei 89 %, bei einer Konzentration von 50 mg Iod/ml durchschnittlich bei 81 %. Bei einer Konzentration von 100 mg Iod/ml sank das arithmetische Mittel auf 67 %. Diese Konzentrationsabhängigkeit ist in Abbildung 16 zu sehen. In Abbildung 17 sind die gleichen Konzentrationen mit unterschiedlichen Inkubationszeiten dargestellt. Nach 24-stündiger Inkubationszeit liegt die durchschnittliche Aktivität immer noch bei 82 %. Zwischen den verwendeten Kontrastmitteln Iopromid 300 und Iodixanol 320 besteht kein relevanter Unterschied in der Beeinflussung der mitochondrialen Dehydrogenase.

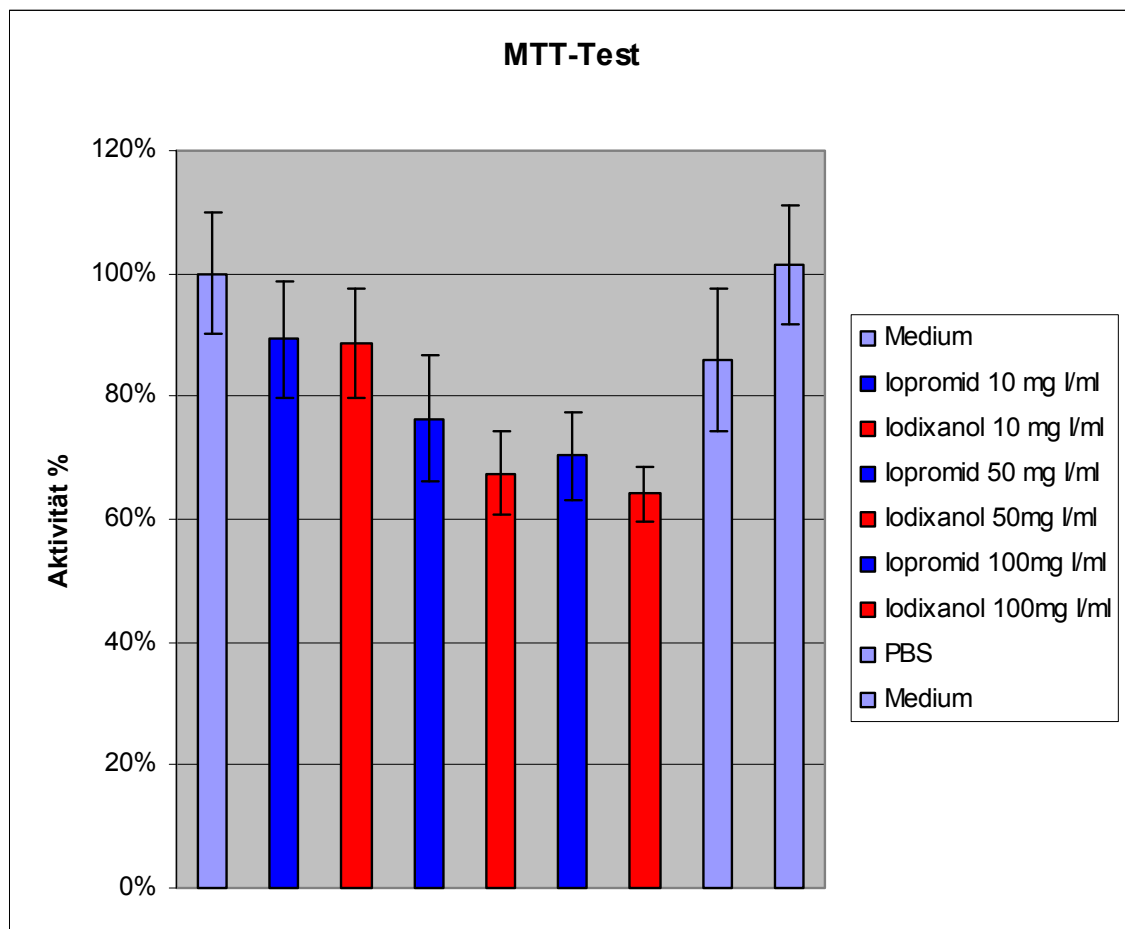


Abbildung 15: MTT-Test mit steigender Konzentration nach 4h Inkubationszeit von 10 mg Iod/ml bis 100 mg Iod/ml Iopromid 300 und Iodixanol 320. Die Säulen entsprechen der durchschnittlichen mitochondrialen Aktivität in acht 96-Well-Platt.

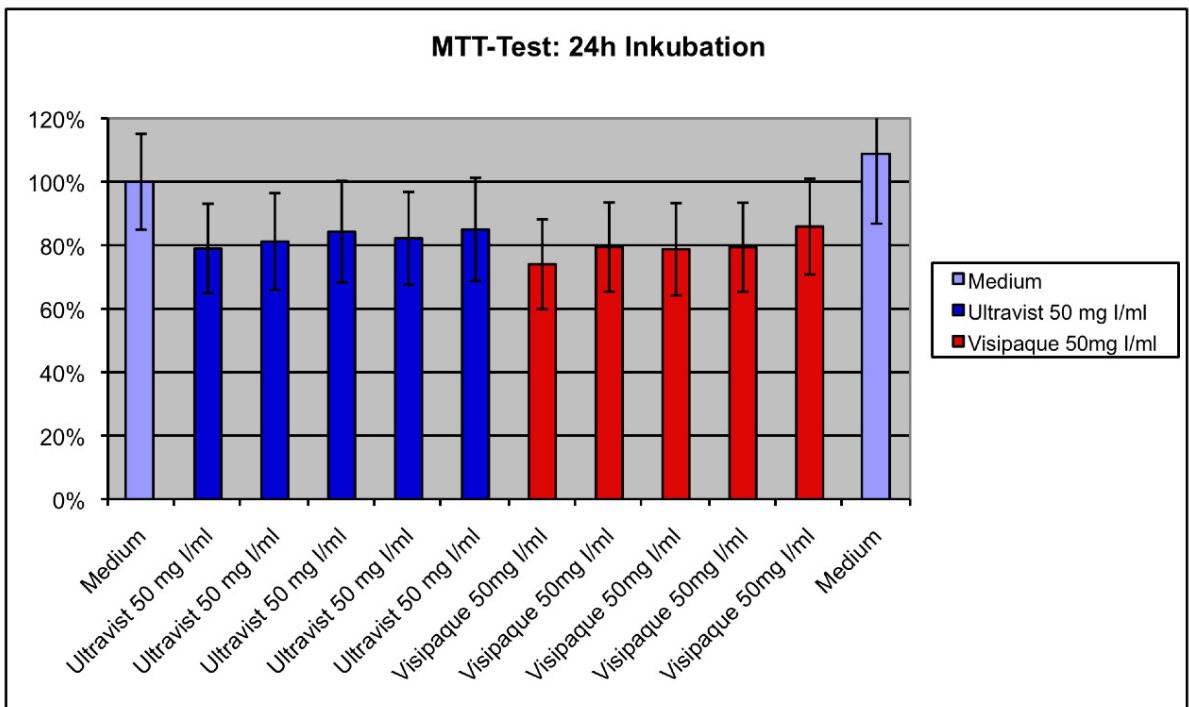
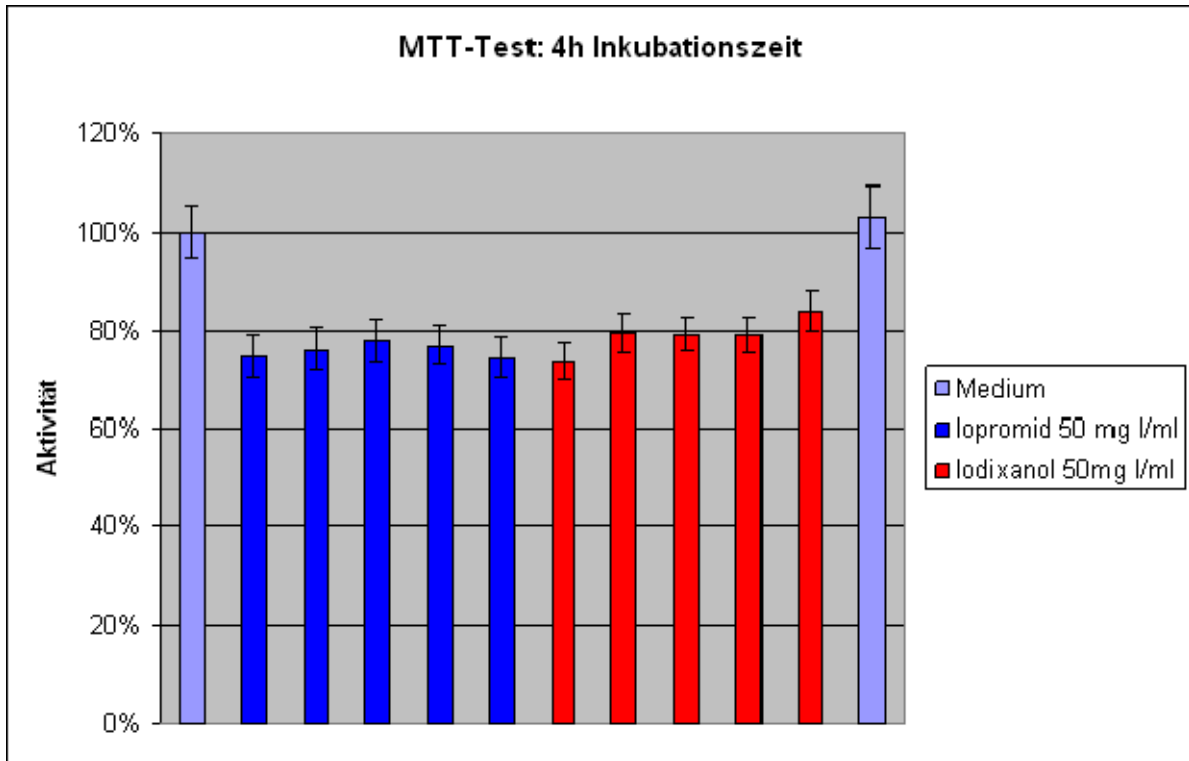


Abbildung 16: MTT-Test nach 4 h (obere Abbildung) und 24 h (untere Abbildung) in einer Konzentration von 50 mg Iod/ml. Die Säulen entsprechen der durchschnittlichen mitochondrialen Aktivität in acht 96-Well-Platt.

4.3.2. Adenosintriphosphat (ATP) –Bestimmung

Die Ergebnisse zeigen einen Abfall der ATP Konzentration und damit einen Abfall der lebenden Zellen *in vitro*. Bei Iopromid 300 sinkt der ATP-Gehalt nach 4 stündiger Inkubationszeit auf 62,1 % +/- 2,13 %, bei Iodixanol 320 auf 61,4 % +/- 8,3 % (siehe Abbildung 18).

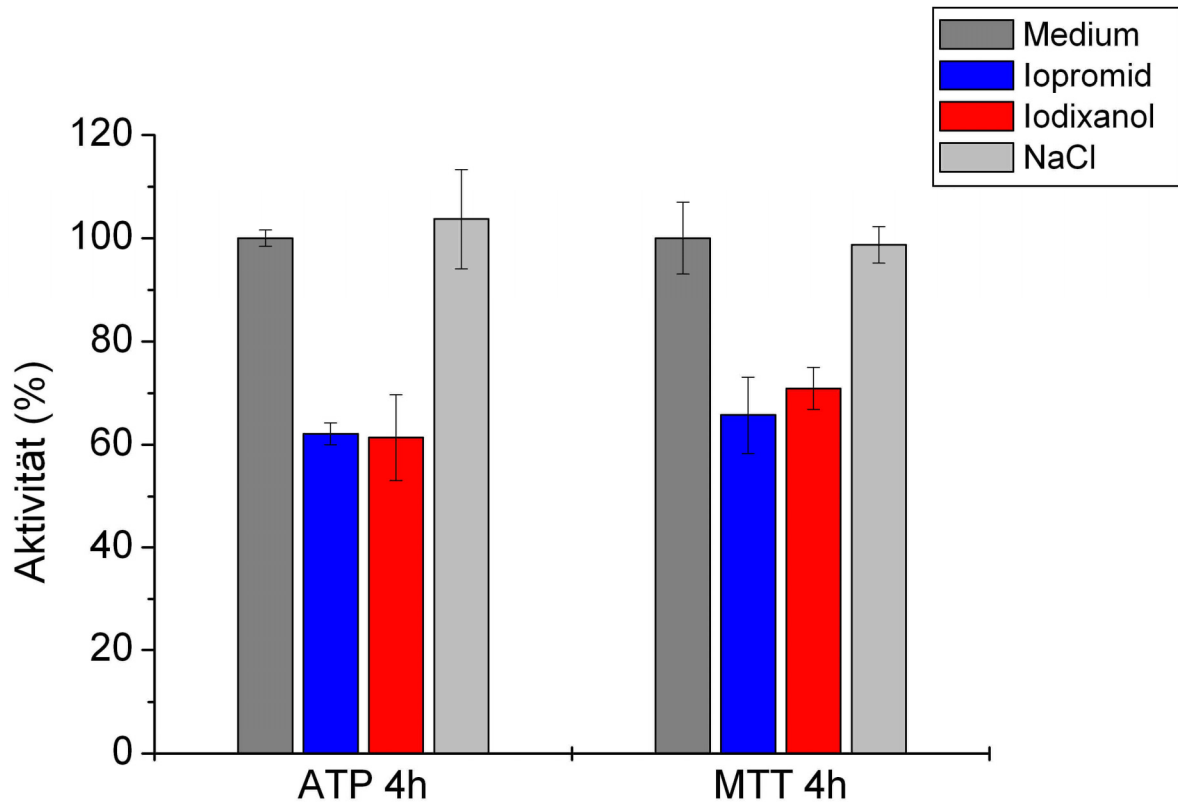


Abbildung 17: ATP- und MTT- Test nach vier Stunden Inkubationszeit bei einer Konzentration von 75 mg Iod/ml. Die ATP-Säulen erläutern den Abfall der noch lebenden Zellen durch ATP-Verlust, die MTT-Säulen erläutern den Abfall der mitochondrialen Aktivität und damit den verminderten Zellmetabolismus.

4.4. Perfusion

Der zunächst an der Ratte durchgeführte Versuch zeigte große intraindividuelle Unterschiede. Bereits nach mehrmalig wiederholter Sonovue-Injektion zeigten sich große Schwankungen. Die Ergebnisse konnten daher zu keiner Aussage über die Perfusion in der Niere führen.

Bei den Kaninchen waren die Schwankungen im Vergleich zu den Ratten kleiner. Es ließ sich zudem ein Unterschied zwischen Nierenmark und Nierenrinde feststellen, jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen einzelnen Tieren nach Kontrastmittel Injektion. Hierfür waren die Schwankungen zu erheblich.

Ligatur der A. renalis

Zur Evaluierung der Methode wurde der Durchmesser der A. renalis während der Ultraschallmessung eingeschränkt. Vor der Teilstenose zeigten die beiden Versuchstiere in allen untersuchten Regionen eine regelmäßige und unauffällige Einstromkurve. Nach der Teilstenose der A. renalis konnte man im Nierenmark kaum noch ein Signal messen. Das Signal in der Nierenrinde war im Vergleich zur Ausgangskurve deutlich niedriger. Der Unterschied in der Kurvenamplitude wurde auch am Ultraschallbildschirm sichtbar. Es konnten nur wenige Signale detektiert werden. In den Daten war zu erkennen, dass die Nierenrinde stärker perfundiert war als das Nierenmark und die gesetzte Teilstenose zu einer Reduktion der Perfusion sowohl in der Nierenrinde wie auch im Nierenmark führte.

5. Diskussion

5.1. Retention

Obgleich das klinische Phänomen der Retention von Iodkontrastmitteln in der Niere bereits untersucht ist (Braedel *et al.*, 1987; Love and Olson, 1991; Yamazaki *et al.*, 1996a; Yamazaki *et al.*, 1996b; Yamazaki *et al.*, 1997), sind die Retentionszeiten moderner iodhaltiger, nicht-ionischer Röntgenkontrastmittel bisher nicht ausreichend systematisch evaluiert. Die vorliegende Studie vergleicht die Retentionszeit des weit verbreiteten niedrig viskösen monomeren Kontrastmittels Iopromid mit der des dimeren hoch viskösen Kontrastmittels Iodixanol bei der Anwendung in der Ratte. Es wurden dazu Untersuchungen zu verschiedenen Zeitpunkten und Kontrastmittelmengen durchgeführt. Während der Studie wurden zwei unabhängige Nachweismethoden für den Versuch verwendet. Um die absolute Iodkonzentration in der Niere zu ermitteln, kam die Röntgenfluoreszenzanalyse zum Einsatz, zur Bestimmung der Absorption die Computertomographie. Letztere erlaubt vor allem im Hinblick auf die zusätzliche Bestimmung der Iodkonzentration eine Aussage über die Retentionszeit der Kontrastmittel in der Niere. Beide Methoden ergaben vergleichbare Ergebnisse (siehe Abbildung 9).

Zu allen Zeitpunkten und allen gewählten Kontrastmittelmengen konnte eine höhere Iodkonzentration und eine längere Retentionszeit nach Applikation des hoch viskösen dimeren Kontrastmittels im Vergleich zu dem niedrig viskösen monomeren Kontrastmittel beobachtet werden (siehe Abbildung 10). Die Daten lassen darauf schließen, dass das höher visköse Kontrastmittel, trotz gleicher Halbwertszeit im Blut wie das monomere Kontrastmittel, im Allgemeinen langsamer von der Niere eliminiert wird. Diese Beobachtung stimmt mit der Untersuchung von Ueda *et al.* (Ueda *et al.*, 1998) überein.

Die unterschiedlichen Eliminationszeiten können dadurch erklärt werden, dass die iodhaltigen Kontrastmittel an den Glomerula filtriert werden und ins Tubulussystem gelangen. Eine der wichtigsten Aufgaben des Tubulussystems ist die Reabsorption von Wassermolekülen. Durch die Reabsorption von Wasser wird der verbleibende Tubulusinhalt in den Abschnitten der HENLE-Schleife stark konzentriert. Dieser physiologische Mechanismus hat zur Folge, dass dem Patienten applizierte Kontrastmittel im Tubuluslumen schließlich stark konzentriert vorliegen und dadurch ihre Viskosität zusätzlich steigt. Die hoch visköse Eigenschaft der dimeren Kontrastmittel wird dabei im Tubuluslumen folglich weiter verstärkt. Demzufolge kommt es zu gravierenden Unterschieden in der Viskositätserhöhung im Tubuluslumen nach Applikation von monomeren und dimeren Kontrastmitteln.

Die renalen Tubulus-Lumina könnten dadurch möglicherweise verstopfen und auf diese Art und Weise die Elimination der Kontrastmittel sistieren. Es ist denkbar, dass durch luminale Obstruktion der Nierentubuli Rückresorptionsvorgänge gestört werden, deren Fehlen eine Minderperfusion der peritubulären Kapillaren zur Folge haben könnte. Die Viskosität steht im exponentiellen Zusammenhang zu der Konzentration des applizierten Kontrastmittels, was dazu führt, dass der beschriebene Effekt bei höheren Kontrastmittel-Konzentrationen und geringerer Hydratation zunehmend deutlicher wird (Speck *et al.*, 1999; Ruehm *et al.*, 2000; Bartorelli L Antonio, 2006; Persson and Tepel, 2006).

Der Unterschied in der Iodkonzentration und Retentionszeit zwischen dem monomeren und dimeren Kontrastmittel war bei höheren Konzentrationen und späteren Zeitpunkten der Auswertung nach Applikation stärker ausgeprägt (wie in Abbildung 10 und 11 zu sehen). Dieser Unterschied konnte mit der RFA, welche zur Messung des absoluten Iodgehaltes in der Niere dient, detektiert werden (wie in Abbildung 9, 10, und 13 zu sehen). In der Auswertung der CT-Daten waren die höchsten Iodkonzentrationen in der Nierenrinde zu vermerken, wie schon in früheren Studien am menschlichen Probanden beschrieben (Braedel *et al.*, 1987; Yamazaki *et al.*, 1996a; Yamazaki *et al.*, 1997).

Die unterschiedliche Exposition der Niere kann während der Untersuchung ebenfalls dargestellt werden. Das hoch visköse Kontrastmittel zeigt eine achtfach höhere Exposition als das niedrig visköse (siehe Abbildung 10). Eine höhere Exposition könnte möglicherweise die Nierenfunktion negativ beeinflussen.

Die Auswertung der Untersuchungsdaten der niereninsuffizienten ZSF1-Ratten ergab eine signifikant verlangsamte Ausscheidung der Kontrastmittel im Vergleich zu den Kontrolltieren (Han-Wistar). Abbildung 12 belegt diesen signifikanten Unterschied. In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Wahrscheinlichkeit, eine verlängerte Kontrastmittel-Retention zu ermitteln, bei Patienten mit vorbestehender Niereninsuffizienz steigt (Love *et al.*, 1989). Die meisten Autoren suggerieren für jene Patienten sogar eine erhöhte Inzidenz, CIN zu entwickeln (VanZee *et al.*, 1978; Solomon, 1998; Barrett *et al.*, 2006). Bei dem hoch viskösen Kontrastmittel konnte in den ZSF1-Ratten selbst am 17. Tag p.i. eine noch signifikante Menge an Kontrastmittel in den Nierenrinden festgestellt werden, wohingegen bei dem niedrig viskösen Iopromid bereits am dritten Tag keine signifikanten Unterschiede zum Baselinewert mehr festgestellt werden konnten (siehe Abbildung 13). Dies lässt darauf schließen, dass Iopromid zu diesem Zeitpunkt bereits völlig ausgeschieden war. Nach Applikation von dem dimeren hoch viskösen Kontrastmittel kommt es bei den ZSF1-Ratten zu einer achtfach höheren Exposition der Niere im Vergleich mit der Exposition nach

Injektion von dem niedrig viskösen monomeren Kontrastmittel. Diese erhöhte Exposition der Niere mit Kontrastmittel kann möglicherweise die erhöhte Inzidenz zur Entwicklung der CIN bei niereninsuffizienten Patienten erklären.

Ein wahrscheinlicher Mechanismus der verlängerten Retention könnte die Minderperfusion der Niere nach Kontrastmittelapplikation sein (Bakris and Burnett, 1985; Solomon, 1998). Liss et al. beschreiben, dass höher visköse Substanzen zu einer höheren Reduktion des kapillären Blutflusses beitragen (Liss *et al.*, 1996). Da die Minderperfusion nur unmittelbar nach Kontrastmittelinjektion für einen kurzen Moment stattfindet, kann die lange Verzögerung der Retention wahrscheinlich nicht mit diesem Phänomen erklärt werden.

Vakuolisierung im proximalen und distalen Tubulus ist ein häufig beobachtetes Phänomen nach Injektion einiger Substanzen, zu denen pharmakologisch auch die Gruppe der Kontrastmittel zu zählen ist (Moreau *et al.*, 1975; Tervahartiala *et al.*, 1993; Andersen *et al.*, 1994; Dobrota *et al.*, 1995; Walday *et al.*, 1995). Vakuolisierung ist ein Hinweis auf intrazelluläre Schädigung (Hardiek *et al.*, 2001). Da der proximale und der distale Tubulus im *Cortex renalis* lokalisiert sind, könnte eine Vakuolisierung die erhöhte Iodretention in diesen Bereichen erklären. Dobrota et al. konnten feststellen, dass nach der Injektion von 3 g Iod/kg KM bis zum siebten Tag p.i. reichlich Vakuolen detektiert werden können und diese sich nur langsam und über mehrere Wochen reduzierten. Weiter vermutet die Arbeitsgruppe, dass es sich bei den Vakuolen um große Lysosomen handelt, welche das verbliebene intrazelluläre Kontrastmittel enthalten (Dobrota *et al.*, 1995). Der Prozess der Vakuolisierung ist möglicherweise abhängig von Dosis und Zeit, was erklären könnte, warum ein Kontrastmittel das aufgrund seiner Viskosität und Osmolarität langsamer ausgeschieden wird und damit in höherer Konzentration vorliegt, zu einer stärkeren Vakuolisierung führen könnte.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass es nach Applikation von dimeren Kontrastmitteln im Vergleich zu monomeren Kontrastmitteln zu einer verlängerten Retentionszeit von Iod in der Niere kommt. Dieser Effekt war in allen Untersuchungen der vorliegenden Studie Dosis-abhängig und zeigte sich in einem Nephropathie-Tiermodell dramatisch erhöht. Möglicherweise sind für das Auftreten von Minderperfusion und Parenchymzell-Vakuolisierung die Kontrastmittel selbst verantwortlich. Obwohl die durch Kontrastmittel ausgelöste Minderperfusion und Vakuolisierung reversibel sind, führt die verlängerte Retentionszeit möglicherweise doch zu einer verlängerten Hypoxie des Nierengewebes. Des Weiteren sind die Zellen der applizierten Substanz über einen längeren Zeitraum ausgesetzt, was in Konsequenz möglicherweise das Vorliegen einer erhöhten zellulären Toxizität erklärt.

5.2. Genexpressionsanalyse

Genexpressionsanalyse des Kidney injury molecule (Kim-1) und der Hämoxygenase (HO-1) in der Niere

Zum Verifizieren der Aussage, dass eine höhere Exposition der Niere mit Kontrastmittel die Wahrscheinlichkeit CIN zu entwickeln erhöht, wurden in der vorliegenden Studie das Transkriptionsausmaß für die Gene der beiden Proteine Kidney injury molecule (KIM-1) und Hämoxygenase (HO-1) aus der Niere durch die reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion bestimmt. Nach Applikation des hoch viskösen dimeren Kontrastmittels waren die beiden untersuchten Biomarker in der RNA-Analyse im Vergleich zu den Tieren, die mit Kochsalz behandelt wurden, signifikant erhöht. Dahingegen konnte nach Injektion des niedrig viskösen Kontrastmittels im Vergleich zu den mit Kochsalz behandelten Tieren kein Unterschied festgestellt werden (siehe Abbildung 14). Dies deutet darauf hin, dass die renale Schädigung, gekennzeichnet durch die erhöhte Genexpression von KIM-1 und HO-1, nur nach Injektion des dimeren Kontrastmittels auftritt. Da KIM-1 nach ischämischer oder toxischer Schädigung der proximalen Tubuluszellen hochreguliert wird und hauptsächlich von Zellen exprimiert wird, die für Reparationsprozesse von Nephronen in ischämischen Nieren verantwortlich sind, deutet eine Erhöhung von KIM-1 nach Applikation von dimeren Kontrastmitteln auf vermehrte Reparationsprozesse in der Niere mit vorangegangener Nierenschädigung hin (Ichimura *et al.*, 1998; Han *et al.*, 2002; Ichimura *et al.*, 2004; Vaidya *et al.*, 2006). Eine erhöhte Expression der HO-1 deutet wiederum auf eine verlängerte Hypoxie nach Applikation von dimeren Kontrastmitteln hin (Tenhunen *et al.*, 1968; Lavrovsky *et al.*, 1994; Takahashi *et al.*, 2004; Goncalves *et al.*, 2006; Olszanecki *et al.*, 2007).

Proteinbestimmung

Unter Berücksichtigung der posttranslationalen Proteinmodifikation wurden zudem Untersuchungen zur Proteinkonfiguration durchgeführt, die auch außerhalb der genetischen Vorlage vorkommende Eiweißmodifikationen berücksichtigen.

Bei der Bestimmung der Proteine im Nierengewebe, die zur frühen Erkennung von Nierenschäden herangezogen werden können, konnte bei dem dimeren Kontrastmittel im Vergleich zu den Kontrolltieren und dem monomeren Kontrastmittel bei einigen Proteinen ein verändertes Proteinniveau nachgewiesen werden. Diese Proteine waren Clustertin, Cystatin-C, KIM-1 und das neutrophile Gelatinase Associated Lipocalin (NGAL). Dies festigt die These, dass die Injektion höher visköser dimerer Kontrastmittel die Nieren stärker beeinträchtigt als

die Injektion niedrig visköser monomerer Kontrastmittel. Ein erhöhtes Clustertin-Niveau im Gewebe gibt Hinweis auf eine vermehrte Apoptoserate (Chevalier, 1999; Takase *et al.*, 2008). Cystatin-C wird in den Endothelzellen exprimiert. Seine Erhöhung nach Iodixanol Injektion könnte einen Hinweis auf vaskuläre Schädigung geben (Shi *et al.*, 1999). Wie bereits erläutert, deutet eine Erhöhung des KIM-1 auf eine vorangegangene Nierenschädigung hin. Der Nachweis eines erhöhten KIM-1 Niveaus konnte auf zwei Wegen erbracht werden. Zum einen durch die Proteinbestimmung, zum anderen durch die RNA-Analyse. Die Ergebnisse beider Versuche stimmten insofern überein, dass sowohl bei der Proteinbestimmung als auch bei der RNA-Analyse die mit Iodixanol behandelten Tiere eine signifikante Erhöhung des KIM-1 im Vergleich zu den Kontrolltieren und den mit Iopromid behandelten Tieren zeigten (siehe Abbildung 14 und 15). Das Proteinniveau der mit Iopromid oder Kochsalzlösung behandelten Ratten zeigte sich sogar unterhalb der Nachweisgrenze, was darauf hindeutet, dass beide Substanzen keinen negativen Einfluss auf die proximalen Tubuluszellen der Niere ausüben. Das neutrophile Gelatinase Associated Lipocalin (NGAL) ist eines der vielversprechendsten Proteine zu frühen Erkennung von Nierenschädigung (Bolignano, 2008). Es zeigt sich nach Iodixanol Injektion ebenfalls erhöht.

5.3. Zytotoxizität

Um die direkte Wirkung des monomeren Kontrastmittels Iopromid und des dimeren Iodixanol auf die renalen Tubuluszellen direkt miteinander vergleichen zu können, wurden zwei voneinander unabhängige Zytotoxizitätstests durchgeführt: der MTT- und der ATP-Test. Die ausgewählten Kontrastmittelmengen waren vergleichbar mit der Belastung nach Applikation der in der Praxis zugelassenen Dosis. 1,5 ml/kg Kontrastmittel führt zu einer Plasma-Konzentration von ca. 10 mg Jod/ml. Die Injektion von höheren Mengen ist nicht unüblich und führt im Patienten zu einer Plasma-Konzentration von 15-20 mg Jod/ml. Da 60 bis 70 % des glomerulär filtrierte Wassers in den proximalen Tubuluszellen rückresorbiert werden, ist die Konzentration der Kontrastmittel in diesem Abschnitt der Niere wahrscheinlich sogar höher als im Plasma (Hardiek *et al.*, 2001); Messdaten zu dieser Annahme wurden im Rahmen dieser Studie allerdings nicht ermittelt. Der MTT-Umsatz ist ein guter Indikator für die Abnahme der mitochondrialen Aktivität sowie für die Vitalität und Proliferation der Zelle (Hardiek *et al.*, 2001). Es konnte im Rahmen dieser Dissertationsarbeit in keinem Versuch eine Abhängigkeit von Inkubationszeiten beobachtet und damit beschrieben werden. Obwohl die Zeit die durch Kontrastmittel verursachte renale Schädigung

nicht maßgeblich beeinflusst, kann keine Zellregeneration ablaufen, bis die applizierte Kontrastmittel-Dosis von der Niere in ihrer Gesamtheit ausgeschieden ist (Hardiek *et al.*, 2001). Hardiek *et al.* (2001) zeigten, dass sich die LLC-Pk1 Tubuluszellen erst nach Entfernen des Kontrastmittels wieder erholen. Die proximalen Tubuluszellen von Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion haben möglicherweise nach Kontrastmittelapplikation eine sukzessive verlangsamte Regeneration.

Häufig klingen die Symptome der Nierenschädigung nach Injektion der Kontrastmittel erst nach mehreren Wochen ab, da der Prozess der Zellregeneration seine Zeit fordert (Hardiek *et al.*, 2001).

Die Phänomene des Abfalls der mitochondrialen Dehydrogenase-Aktivität und des ATP-Spiegels erweisen sich bei den beiden getesteten Kontrastmitteln der vorliegenden Studie als sehr ähnlich ($\pm 3\%$). Iodixanol 320 mit seiner verlängerten Retentionszeit und damit verbundenen längeren Verweildauer im Nierenparenchym verlangsamt in diesem Zusammenhang möglicherweise den Heilungsprozess der proximalen Tubuluszellen.

5.4. Perfusion

Durch quantitative Verfahren in der kontrastverstärkten Sonographie ist es möglich, Organ- und Tumorperfusion objektiv beurteilen zu können (Krix *et al.*, 2004; Delorme *et al.*, 2006; Mule *et al.*, 2007). Da die renale Funktionsstörung nach Kontrastmittelapplikation einer reduzierten renalen Durchblutung zugeschrieben wird, sollte die Nierenperfusion in dieser Studie mittels kontrastmittelgestützter Sonographie untersucht werden (Hardiek *et al.*, 2001).

Es stellte sich die Frage, ob ein relevanter Unterschied der Nierenperfusion bei und im Anschluss an die Verwendung der beiden Kontrastmittel aufgrund des Viskositätsunterschiedes in der kontrastmittelgestützten Sonographie feststellbar sei.

Um die bereits mehrfach publizierte Methode nochmals zu evaluieren, wurde eine Teilstenose der A. renalis vorgenommen. Die Ergebnisse zeigten eine deutliche Perfusionminderung, welche nach Eröffnen der Teilstenose ihr altes Niveau erreichte.

Nach Applikation verschiedener Substanzen konnte jedoch in allen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit kein signifikanter Unterschied in der Nierenperfusion festgestellt werden. Die Schwankungen zwischen den einzelnen Injektionen erwiesen sich als hoch, was dazu führte, dass keine verlässliche Aussage über die Nierenperfusion getroffen werden konnte. Die Sensitivität der Methode scheint für die Detektion der Mikrozirkulation der Nieren der untersuchten Versuchstiere nicht ausreichend bzw. nicht geeignet zu sein.

Bei den Ratten zeigte sich ein Nachteil im Sinne der geringen Größe der Tiere. Die Nieren liegen unterhalb des Rippenbogens, weshalb der Schallkopf durch starke Größendifferenzen zwischen Proband und Gerät schräg aufgelegt werden musste. Die Nieren der ZSF1-Ratten konnten aufgrund der ausgeprägten Adipositas nicht gut dargestellt werden. Das Fett dämpfte die Schallwelle stark, wodurch die Nieren nicht einwandfrei vom umliegenden Fettgewebe abgegrenzt werden konnten. Bei den Kaninchen ließen sich die Nieren ausreichend detailliert darstellen.

Nach der Geburt nimmt die Anzahl der Glomerula in der Kaninchenniere noch zu (wie auch bei der Ratte), während z.B. bei Mensch und Hund zum Zeitpunkt der Geburt alle Glomerula vorliegen. Die Anzahl der Glomerula, die gleichzeitig aktiv sind, kann sich stark verändern. Dies ist bei Amphibien und neonaten Säugetieren bekannt, nicht jedoch bei adulten Mammaliern. Selbst eine 16-fache Erhöhung der Wasserdiurese führt zu keiner nennenswerten Änderung der glomerulären Filtrationsrate, ebenso wie ein zweifach erhöhter Blutdruck kaum Auswirkungen auf den renalen Plasmafluss oder die GFR zeigt, nicht einmal bei Kaninchen mit denervierten Nieren. Dieser Grad an Autoregulation, wie er bei Kaninchen vorkommt, ist bei anderen Säugern nicht bekannt (BREWER und CRUISE 1994 in der Dissertationsschrift von Bianca Spennemann zum Thema Harnuntersuchung beim Heimtierkaninchen, Spennemann, 2002). Die vorangegangene Erläuterung könnte erklären, warum keine verifizierbaren Perfusionsänderungen beim Kaninchen sichtbar wurden.

6. Zusammenfassung

Einleitung und Ziel:

Iodhaltige nicht-ionische Röntgenkontrastmittel, welche heutzutage klinisch regelmäßig eingesetzt werden, besitzen eine ähnliche molekulare Struktur, jedoch unterschiedliche physikochemische Eigenschaften. Die Bedeutung der Viskosität von Kontrastmitteln ist möglicherweise im Hinblick auf die klinische Relevanz des akuten Nierenversagens im Anschluss an eine Applikation dieser Pharmaka vernachlässigt worden. Das Ziel dieser präklinischen Studie war es, die Rolle der Viskosität und Osmolarität auf die Retentions- und Perfusionszeit von Kontrastmitteln in der Niere zu untersuchen. Darüber hinaus sollten Genexpressions- und Proteinanalysen von Biomarkern für Nierenschädigung und renale Hypoxie nach Applikation eines hoch viskösen und eines niedrig viskösen Kontrastmittels durchgeführt werden. Ferner sollte ein möglicher Unterschied des zytotoxischen Potentials zwischen dem ionischen monomeren Kontrastmittel und dem nicht-ionischen dimeren Röntgenkontrastmittel auf die Nierentubuluszellen untersucht werden.

Material und Methoden:

Die Retention der Röntgenkontrastmittel wurde durch Computertomographie (CT) und Röntgenfluoreszenzanalyse (RFA) an Han-Wistar-Ratten (männlich; 230-300 g) und renal vorgeschädigten ZSF1-Ratten (ZDFxSHHF-fa/fa(cp) (männlich 500-900 g) durchgeführt. Die Genexpressionsanalyse wurde an Han-Wistar-Ratten (Ctrl:WI) (männlich; 230-300 g) nach Applikation eines niedrig viskösen Kontrastmittels (Iopromid) und eines hoch viskösen Kontrastmittels (Iodixanol) durch quantitative RT-PCR-Analytik und Proteinbestimmung durchgeführt. Nach Kontamination der LCC-PK1 Zellen des Schweines mit dem monomeren und dem dimeren Kontrastmittel wurde der MTT- und der ATP-Test durchgeführt. Die Perfusionszeit in der Niere nach Applikation der Kontrastmittel wurde mit Hilfe eines Ultraschallgerätes an Han-Wistar-Ratten und ZSF1-Ratten sowie an Kaninchen der Rasse Weiße Neuseeländer durchgeführt.

Ergebnisse:

Die CT-Bilder und die RFA der Nieren der Tiere, die mit Iodixanol behandelt wurden, zeigten höhere Iodkonzentrationen im Vergleich zu den Tieren, welche mit 0,9 % Kochsalzlösung oder Iopromid behandelt wurden. Dieser Effekt war in den ZSF1-Ratten dramatisch erhöht.

24 Stunden nach Iodixanol-Injektion konnte ein signifikant erhöhtes Transkriptionslevel der Biomarker KIM-1 und HO-1 im Vergleich zu den mit Iopromid und 0,9 % Kochsalzlösung

behandelten Tieren festgestellt werden. Einige untersuchten Proteine im renalen Gewebe, die zur Früherkennung von Nierenschäden herangezogen werden können, waren nach Gabe des dimeren Kontrastmittels im Vergleich zu der Gabe des monomeren Kontrastmittels und NaCl erhöht.

Die mitochondriale Dehydrogenase und die ATP-Konzentration zeigten eine konzentrationsabhängige Abnahme bei Kontrastmitteleinfluss.

Fazit:

Es konnten höhere Iodkonzentrationen und verlängerte Retentionszeiten nach Applikation des hoch viskösen isoosmolaren dimeren Kontrastmittels im Vergleich zu dem niedrig viskösen monomeren Kontrastmittel beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die hohe Viskosität und die ausbleibende Verdünnung durch osmotische Diurese sein. Dahingegen scheint die niedrige Viskosität und die osmotische Diurese der monomeren Kontrastmittel die Retentionszeit zu verkürzen.

Die verlängerte Retentionszeit nach Applikation des hoch viskösen dimeren Kontrastmittels (Iodixanol) induziert einen Anstieg der Genexpression von Biomarkern, welche charakteristisch für Hypoxie und Nierenschädigung sind. Die Nierenzellen sind der applizierten Substanz über einen längeren Zeitraum ausgesetzt, was in Konsequenz möglicherweise das Vorliegen einer erhöhten zellulären Toxizität bedeutet.

Deskriptoren:

contrast media, kidneys, diagnostic techniques, perfusion, retention, rats, rabbits

Summary

Retention of Iodine and Perfusion in the kidney after Application of iodinated Contrast Media

Introduction:

Commercially available iodinated contrast media show similar molecular structure but significant different physico-chemical properties. The relevance of the viscosity of contrast media may be underestimated as a contributing factor for clinically relevant renal failure after application of those drugs. The aim of this preclinical study is to assess the role of viscosity and osmolarity of contrast media regarding their retention and perfusion time in kidney. Furthermore the expression of marker genes for renal damage and hypoxia was tested to evaluate a potential renal damage and hypoxia after application of iodinated contrast media. To a certain extent protein configuration has been explored for the early recognition of renal deficiencies. To evaluate the toxic potentials in renal cell-damage furthermore this assay examines cytotoxic differences between iodinated monomer contrast media and iodinated dimere contrast media.

Material and methods:

The retention time of contrast media after application of low-viscous, low-osmolar (Iopromide 300) and high-viscous, iso-osmolar (Iodixanol 320) contrast media and the iodine concentration over time was determined using computer tomography (CT) and X-ray fluorescence analysis (RFA) in healthy Han-Wistar and renally impaired ZSF1-rats. The latter served as a model for age and diabetes-related renal damage. The expression of kidney injury molecule 1 (Kim-1) and Heme Oxygenase I (HO-1) was measured in healthy Han Wistar rats by quantitative reverse transcriptase-polymerase chain-reaction (RT-PCR). The protein syntheses with Multiplex ELISA was also tested on Han Wistar rats. Porcine tubule cells, LLC-PK1, were subjected to contrast media exposure followed by assessment of ATP and MTT tests. The perfusion time of the kidney after contrast media application was determined using contrast-enhanced ultrasound.

Results:

CT and RFA in the kidneys of animals treated with Iodixanol revealed prolonged retention of iodine in the kidney as compared to animals treated with Iopromide. This difference was even more pronounced in renally impaired rats. 24 hours after Iodixanol treatment, significantly

increased levels of Kim-1 and HO-1 transcript levels were observed compared to the saline and Iopromide treatment. When evaluating the proteins in the renal tissue that can be used for the early detection of renal deficiencies, for the dimeric contrast media there have been found elevated values for some proteins in comparison to the values found in the proband animal group treated with monomeric contrast media. The MTT and ATP concentration show a concentration dependent decrease.

Conclusion:

A prolonged retention of contrast media in the kidney was observed after administration of high-viscous, iso-osmolar contrast media. One possible explanation for this effect could be the high viscosity of high-viscous, iso-osmolar dimeric contrast media and the lack of dilution by osmotic diuresis. This prolonged exposure is possibly associated with higher renal toxicity as indicated by the elevated expression of biomarkers for hypoxia and renal injury.

Key words:

contrast media, kidneys, diagnostic techniques, perfusion, retention, rats, rabbits

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Chemische Struktur monomerer und dimerer nicht-ionischer Röntgenkontrastmittel.....	9
Abbildung 2: Sonographische Darstellung einer Kaninchenniere. Die Kurve stellt die Wiederanflutungskinetik nach Zerstörung der MB in die Nierenrinde und das Nierenmark dar. Die Kurvendiagramme 1, 2 und 3 entsprechen Regions of Interest (ROIs) in der Nierenrinde, die Kurvendiagramme 4,5 und 6 den ROIs im Nierenmark. Die Kurve 7 entspricht der A. renalis, die Kurve 8 der Aorta. Die injizierten MB werden nach der Applikation kurzfristig durch einen hohen MI zerstört. Die darauffolgende Wiederanflutung entspricht der Perfusion im detektierten Bereich.....	29
Abbildung 3: Beispiel der CT Schnittbild-Analyse. In der linken Niere der Han-Wista-Ratte wurden in der Nierenrinde drei Regionen (ROI) platziert, welche zur Auswertung herangezogen wurden. Eine weitere Region wurde in der inneren Lendenmuskulatur platziert und zur vergleichenden Auswertung verwendet.....	33
Abbildung 4: Resektion der Niere einer ZSF1-Ratte. n = Niere, m = Magen, ca = capsula adiposa, pF = praeumbilicaler Fettkörper, l = Leber, d = Duodenum, j/c = Jejunalschlingen / Colon (Intestinum crassum).....	34
Abbildung 5: Schematische Darstellung des experimentellen Ablaufes der Genexpressionsanalyse und Proteinbestimmung.....	38
Abbildung 6: Untersuchung einer Han-Wistar-Ratte mit dem Ultraschallgerät.....	43
Abbildung 7: Ultraschallbild und dazugehörige Time-Intensity-Kurve des CHI-Quantifizierungsmoduls. Die farbig eingekreisten Regionen in den oberen Bildern entsprechen den farbigen Kurven der unteren Bilder und stellen die Anflutungskinetik der MB dar. Vor der Teilstenose entsteht eine übliche Einflutungskurve der MB im Quantifizierungsmodul des Ultraschallgerätes (linke Reihe). Nach der Teilstenose sind nur noch wenige MB am Ultraschallmonitor zu detektieren (rechte Reihe). Dies spiegelt sich deutlich in der Time-Intensity-Kurve wieder.....	45
Abbildung 8: Absorptionskoeffizient (HU) der Nierenrinde (x-Achse) verglichen mit der Iodkonzentration in der Niere (Y-Achse) drei Stunden nach Applikation von Iopromid 300 (blaue Dreiecke) und Iodixanol 320 (rote Rauten) in einer Konzentration von 1g Iod/kg KM. Jedes Dreieck bzw. jede Raute entspricht einem Versuchstier.....	46
Abbildung 9: Retentionszeit von Kontrastmitteln in der Niere nach Applikation von Iopromid 300 und Iodixanol 320.....	48
Abbildung 10: Kontrastmittelkonzentration in der Niere 3 Stunden nach Injektion verschiedener Mengen Kontrastmittel bei Han-Wistar-Ratten. (A) Ermittelte Iodkonzentration in der Niere 3 Stunden nach Applikation verschiedener Kontrastmittel Konzentrationen (300mg, 1g, 2g Iod/kg KM Iopromid 300 und Iodixanol 320) mittels RFA.....	50
Abbildung 11: Retentionszeit von Kontrastmitteln in der Niere bei niereninsuffizienten ZSF1-Ratten und gesunden Han Wistar Kontrolltieren.....	53
Abbildung 12: Retentionszeit der Kontrastmittel bei niereninsuffizienten ZSF1-Ratten. (A) Iodabsorption (HU) der Nierenrinde vor und nach 1, 2, 3, 7 und 17 Tagen post injectionem von 1 g Iod/kg KM Iopromid 300 (untere Linie) und Iodixanol 320 (obere Linie).	55
Abbildung 13: Genexpression von Biomarkern als Indikatoren für Nierenschädigung.....	60
Abbildung 14: Proteinniveau von VEGF, TIMP-1, GST Mu, EGF, Cystatin-C, Calbindin, Osteopoetin, NAGL, KIM-1, GST-alpha und Clustertin 24 Stunden p.i. 0,9% NaCl (grau), Iopromid 300 (blau) und Iodixanol 320 (rot) in einer Konzentration von 4g Iod/kg KM bzw. einer vergleichbaren Volumenmenge (bei Kontrolltieren).....	62
Abbildung 15: MTT-Test mit steigender Konzentration nach 4h Inkubationszeit von 10 mg Iod/ml bis 100 mg Iod/ml Iopromid 300 und Iodixanol 320. Die Säulen entsprechen der durchschnittlichen mitochondrialen Aktivität in acht 96-Well-Platt.....	63
Abbildung 16: MTT-Test nach 4 h (obere Abbildung) und 24 h (untere Abbildung) in einer Konzentration von 50 mg Iod/ml. Die Säulen entsprechen der durchschnittlichen mitochondrialen Aktivität in acht 96-Well-Platt.....	64
Abbildung 17: ATP- und MTT- Test nach vier Stunden Inkubationszeit bei einer Konzentration von 75 mg Iod/ml. Die ATP-Säulen erläutern den Abfall der noch lebenden Zellen durch ATP-Verlust, die MTT-Säulen erläutern den Abfall der mitochondrialen Aktivität und damit den verminderten Zellmetabolismus.....	65

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Narkoseprotokoll der Versuchstiere.	30
Tabelle 2:	Euthanasie der Versuchstiere.....	30
Tabelle 3:	Viskosität und Osmolarität der verwendeten Kontrastmittel.....	31
Tabelle 4:	Übersicht über Versuchsgruppen, Substanzen und Tierzahlen für die CT Untersuchung (Han-Wistar-Ratten).....	32
Tabelle 5:	Übersicht über Versuchsgruppen, Substanzen und Tierzahlen für die CT Untersuchung (ZSF1;Ratten).....	33
Tabelle 6:	Übersicht über Versuchsgruppen, Substanzen und Tierzahlen für die RFA (Han-Wistar-Ratten).....	35
Tabelle 7:	Übersicht über die Versuchsgruppen, Substanzen und Tierzahlen für die Genexpressionsanalyse und Proteinbestimmung (Han-Wistar-Ratten).....	36
Tabelle 8:	Sequenz der Primer und der Fluorogenic Probe.....	38
Tabelle 9:	Protokoll der verwendeten Sonographietechnik.....	43
Tabelle 10:	Übersicht über die Versuchsgruppen, Substanzen und Tierzahlen für die Untersuchung der Nierenperfusion.....	44
Tabelle 11:	Laborwerte der ZSF1- und Han-Wistar Ratten.....	58

9. Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
ADH	Antidiuretisches Hormon/ Vasopressin
ANP	Atriales Natriuretisches Peptid
ANI	Akute Nieren-Insuffizienz
ANV	Akutes Nieren-Versagen
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Area under the curve
B-Mode	Brightness modulation
Bzw.	Beziehungsweise
CIN	Contrast Induced Nephropathy
CT	Computertomographie
D.m.	Diabetes mellitus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
Et al.	et alteri
FBS	Fetales Bovines Serum
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GHz	Gigahertz
GLUT1	Glucosetransporter
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde (lat. hora)
HCL	Salzsäure
HO-1	Hämoxygenase-1
HO-2	Hämoxygenase-2
HU	Hounsfield-Unit
i.m.	intramuskulär
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
kHz	Kilohertz
Kim-1	Kidney Injury Molecule-1
kg	Kilogramm

KM	Kontrastmittel
kV	Kilovolt
MB	Mikrobläschen
MHz	Megahertz
MI	Mechanical Index
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmHg	Torr, Millimeter-Quecksilbersäule
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NGAL	Neutrophil gelatinase associated lipocalin
NSAIDs	Non-steroidal anti-inflammatory drugs
PBS	Phosphate buffered saline
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RFA	Röntgenfluoreszenzanalyse
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	Region of Interest
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
s	Sekunden
SAE	Stimulated Acoustic Emission
SI	Système International d'Unités
TGF	Tubuloglomeruläres Feedback
THI	Tissue Harmonic Imaging
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinases
TGF	Tubuloglomerulärer Feedback
TGF- β	Transforming Growth Factor
USKM	Ultraschallkontrastmittel
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
V.	Vena
μm	Mikrometer

10. Literaturverzeichnis

Albrecht, T., Blomley, M.J., Heckemann, R.A., Cosgrove, D.O., Jayaram, V., Butler-Barnes, J., Eckersley, R.J., Hoffmann, C.W., and Bauer, A. (2000a). Stimulated acoustic emissions with the ultrasound contrast medium levovist: a clinically useful contrast effect with liver-specific properties. *Rofo* 172, 61-67.

Albrecht, T., Hoffmann, C.W., Schettler, S., Overberg, A., Ilg, M., von Behren, P.L., Bauer, A., and Wolf, K.J. (2000b). B-mode enhancement at phase-inversion US with air-based microbubble contrast agent: initial experience in humans. *Radiology* 216, 273-278.

Allaqaband, S., Tumuluri, R., Malik, A.M., Gupta, A., Volkert, P., Shalev, Y., and Bajwa, T.K. (2002). Prospective randomized study of N-acetylcysteine, fenoldopam, and saline for prevention of radiocontrast-induced nephropathy. *Catheter Cardiovasc Interv* 57, 279-283.

Almen, T. (1990). Contrast media: the relation of chemical structure, animal toxicity and adverse clinical effects. *Am J Cardiol* 66, 2F-8F.

Andersen, K.J., Christensen, E.I., and Vik, H. (1994). Effects of iodinated x-ray contrast media on renal epithelial cells in culture. *Invest Radiol* 29, 955-962.

Andersen, K.J., Vik, H., Eikesdal, H.P., and Christensen, E.I. (1995). Effects of contrast media on renal epithelial cells in culture. *Acta Radiol Suppl* 399, 213-218.

Averkiou, M., Powers, J., Skyba, D., Bruce, M., and Jensen, S. (2003). Ultrasound contrast imaging research. *Ultrasound Q* 19, 27-37.

Bakris, G.L., and Burnett, J.C., Jr. (1985). A role for calcium in radiocontrast-induced reductions in renal hemodynamics. *Kidney Int* 27, 465-468.

Baliga, R., Ueda, N., Walker, P.D., and Shah, S.V. (1997). Oxidant mechanisms in toxic acute renal failure. *Am J Kidney Dis* 29, 465-477.

Barrett, B.J. (1994). Contrast nephrotoxicity. *J Am Soc Nephrol* 5, 125-137.

Barrett, B.J., Katzberg, R.W., Thomsen, H.S., Chen, N., Sahani, D., Soulez, G., Heiken, J.P., Lepanto, L., Ni, Z.H., and Nelson, R. (2006). Contrast-induced nephropathy in patients with chronic kidney disease undergoing computed tomography: a double-blind comparison of iodixanol and iopamidol. *Invest Radiol* 41, 815-821.

Bartels, L.W., and Bakker, C.J. (2003). Endovascular interventional magnetic resonance imaging. *Phys Med Biol* 48, R37-64.

Bartorelli, A.L., and Marenzi, G. (2008). Contrast-induced nephropathy. *J Interv Cardiol* 21, 74-85.

Bartorelli L Antonio, M.G. (2006). Contrast-Induced Nephropathy. Taylor&Francis.

Bellomo, R., Kellum, J.A., and Ronco, C. (2004). Defining acute renal failure: physiological principles. *Intensive Care Med* 30, 33-37.

- Beck, T. (1999). Das Tubulussystem der Niere, Anatomie des Menschen Verlag. GOVI, Pharma 7tg 28: 10-18.
- Berger, E.D., Bader, B.D., Bosker, J., Risler, T., and Erley, C.M. (2001). Contrast media-induced kidney failure cannot be prevented by hemodialysis. *Dtsch Med Wochenschr* 126, 162-166.
- Berns, A.S. (1989). Nephrotoxicity of contrast media. *Kidney Int* 36, 730-740.
- Bilecen, D., Schulte, A.C., Heidecker, H.G., Aschwanden, M., Huegli, R., Jaeger, K.A., Ostheim-Dzerowycz, W., and Bongartz, G. (2005). Lower extremity: low-dose contrast agent intraarterial MR angiography in patients--initial results. *Radiology* 234, 250-255.
- Blomley, M., Albrecht, T., Cosgrove, D., Jayaram, V., Butler-Barnes, J., and Eckersley, R. (1998). Stimulated acoustic emission in liver parenchyma with Levovist. *Lancet* 351, 568.
- Bokor, D., Chambers, J.B., Rees, P.J., Mant, T.G., Luzzani, F., and Spinazzi, A. (2001). Clinical safety of SonoVue, a new contrast agent for ultrasound imaging, in healthy volunteers and in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Invest Radiol* 36, 104-109.
- Bolignano, D., Donato, V., Coppolino MD G., Campo MD S., Buemi MD A., Lacquaniti MD, A., and Buemi MD, M (2008). Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) as a Marker of Kidney Damage. *American Journal of Kidney Diseases* 52, 595-605.
- Braedel, H.U., Schindler, E., Cullen, P., and Hoene, E. (1987). Demonstration of residual contrast medium in renal parenchyma using computerized tomography. *J Urol* 137, 11-14.
- Bianca Spennemann, (2002). Dissertationschrift zum Thema Harnuntersuchung beim Heimtierkaninchen, (Frau Dr. Spennemann zitierte Brewer und Cruise (1994))
- Briggs, J.P., Schnermann, J., and Wright, F.S. (1980). Failure of tubule fluid osmolarity to affect feedback regulation of glomerular filtration. *Am J Physiol* 239, F427-432.
- Briguori, C., Manganeli, F., Scarpato, P., Elia, P.P., Golia, B., Riviezzo, G., Lepore, S., Librera, M., Villari, B., Colombo, A., and Ricciardelli, B. (2002). Acetylcysteine and contrast agent-associated nephrotoxicity. *J Am Coll Cardiol* 40, 298-303.
- Brooks, D.P., and DePalma, P.D. (1996). Blockade of radiocontrast-induced nephrotoxicity by the endothelin receptor antagonist, SB 209670. *Nephron* 72, 629-636.
- Burns, P.N., Wilson, S.R., and Simpson, D.H. (2000). Pulse inversion imaging of liver blood flow: improved method for characterizing focal masses with microbubble contrast. *Invest Radiol* 35, 58-71.
- Byrd, L., and Sherman, R.L. (1979). Radiocontrast-induced acute renal failure: a clinical and pathophysiological review. *Medicine (Baltimore)* 58, 270-279.
- Cantley, L.G., Spokes, K., Clark, B., McMahon, E.G., Carter, J., and Epstein, F.H. (1993). Role of endothelin and prostaglandins in radiocontrast-induced renal artery constriction. *Kidney Int* 44, 1217-1223.

- Chatterjee, T.S.C.H.B. (2004). Röntgenkontrastmittel-induzierte Nephropathie nach diagnostischen, therapeutischen, angiologischen und kardiologischen Katheteruntersuchung *Kardiovaskuläre Medizin* 2004 9 *Seiten*, 281-290.
- Chevalier, R.L. (1999). Molecular and cellular pathophysiology of obstructive nephropathy. *Pediatr Nephrol* 13, 612-619.
- Cigarroa, R.G., Lange, R.A., Williams, R.H., and Hillis, L.D. (1989). Dosing of contrast material to prevent contrast nephropathy in patients with renal disease. *Am J Med* 86, 649-652.
- Correas, J.M., Claudon, M., Tranquart, F., and Helenon, O. (2003). Contrast-enhanced ultrasonography: renal applications. *J Radiol* 84, 2041-2054.
- Davis, J.W., Goodsaid, F.M., Bral, C.M., Obert, L.A., Mandakas, G., Garner, C.E., Collins, N.D., Smith, R.J., and Rosenblum, I.Y. (2004). Quantitative gene expression analysis in a nonhuman primate model of antibiotic-induced nephrotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 200, 16-26.
- Delorme, S. (1998). Evaluating tumor vascularization with Doppler ultrasound *Radiologie* 38, 335-343.
- Delorme, S., and Knopp, M.V. (1998). Non-invasive vascular imaging: assessing tumour vascularity. *Eur Radiol* 8, 517-527.
- Delorme, S., Krix, M., and Albrecht, T. (2006). Ultrasound contrast media--principles and clinical applications. *Rofo* 178, 155-164.
- Devarajan, P. (2008). Proteomics for the Investigation of Acute Kidney Injury. *Contrib Nephrol* 160, 1-16.
- Diaz-Sandoval, L.J., Kosowsky, B.D., and Losordo, D.W. (2002). Acetylcysteine to prevent angiography-related renal tissue injury (the APART trial). *Am J Cardiol* 89, 356-358.
- Dieterle, F., Marrer, E., Suzuki, E., Grenet, O., Cordier, A., and Vonderscher, J. (2008). Monitoring kidney safety in drug development: emerging technologies and their implications. *Curr Opin Drug Discov Devel* 11, 60-71.
- Dobrota, M., Powell, C.J., Holtz, E., Wallin, A., and Vik, H. (1995). Biochemical and morphological effects of contrast media on the kidney. *Acta Radiol Suppl* 399, 196-203.
- Docherty, J.C., Schacter, B.A., Firneisz, G.D., and Brown, S.B. (1984). Mechanism of action of heme oxygenase. A study of heme degradation to bile pigment by ¹⁸O labeling. *J Biol Chem* 259, 13066-13069.
- Dyvik, K., Dyrstad, K., and Tronstad, A. (1995). Relationship between viscosity and determined injection pressure in angiography catheters for common roentgen contrast media. *Acta Radiol Suppl* 399, 43-49.
- Erley, C.M., Duda, S.H., Rehfuss, D., Scholtes, B., Bock, J., Muller, C., Osswald, H., and Risler, T. (1999). Prevention of radiocontrast-media-induced nephropathy in patients with

pre-existing renal insufficiency by hydration in combination with the adenosine antagonist theophylline. *Nephrol Dial Transplant* 14, 1146-1149.

Erley, C.M., Duda, S.H., Schlepckow, S., Koehler, J., Huppert, P.E., Strohmaier, W.L., Bohle, A., Risler, T., and Osswald, H. (1994). Adenosine antagonist theophylline prevents the reduction of glomerular filtration rate after contrast media application. *Kidney Int* 45, 1425-1431.

Goncalves, G.M., Cenedeze, M.A., Feitoza, C.Q., Wang, P.M., Bertocchi, A.P., Damiao, M.J., Pinheiro, H.S., Antunes Teixeira, V.P., dos Reis, M.A., Pacheco-Silva, A., and Camara, N.O. (2006). The role of heme oxygenase 1 in rapamycin-induced renal dysfunction after ischemia and reperfusion injury. *Kidney Int* 70, 1742-1749.

Gramiak, R., and Shah, P.M. (1968). Echocardiography of the aortic root. *Invest Radiol* 3, 356-366.

Gruberg, L., Mehran, R., Dangas, G., Mintz, G.S., Waksman, R., Kent, K.M., Pichard, A.D., Satler, L.F., Wu, H., and Leon, M.B. (2001). Acute renal failure requiring dialysis after percutaneous coronary interventions. *Catheter Cardiovasc Interv* 52, 409-416.

Han, W.K., Bailly, V., Abichandani, R., Thadhani, R., and Bonventre, J.V. (2002). Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury. *Kidney Int* 62, 237-244.

Han, W.K., Waikar, S.S., Johnson, A., Betensky, R.A., Dent, C.L., Devarajan, P., and Bonventre, J.V. (2008). Urinary biomarkers in the early diagnosis of acute kidney injury. *Kidney Int* 73, 863-869.

Hardiek, K., Katholi, R.E., Ramkumar, V., and Deitrick, C. (2001). Proximal tubule cell response to radiographic contrast media. *Am J Physiol Renal Physiol* 280, F61-70.

Harkonen, S., and Kjellstrand, C.M. (1977). Exacerbation of diabetic renal failure following intravenous pyelography. *Am J Med* 63, 939-946.

Hebel, R., W. Stromberg Melvin. (1986). *Anatomy and Embryology of the Laboratory Rat*. BioMed Verlag.

Hess, B. (2003). Nephrologie im Alltag. *Primary Care* 3003, 1051-1054.

Heyman, S.N., Brezis, M., Epstein, F.H., Spokes, K., Silva, P., and Rosen, S. (1991). Early renal medullary hypoxic injury from radiocontrast and indomethacin. *Kidney Int* 40, 632-642.

Hou, S.H., Bushinsky, D.A., Wish, J.B., Cohen, J.J., and Harrington, J.T. (1983). Hospital-acquired renal insufficiency: a prospective study. *Am J Med* 74, 243-248.

Hunter, J.V., and Kind, P.R. (1992). Nonionic iodinated contrast media: potential renal damage assessed with enzymuria. *Radiology* 183, 101-104.

Hull, RN, Cherry WR, Weaver GW (1976). The origin and characteristics of a pig kidney cell strain, LLC-PK. *In Vitro* 1976 Oct;12(10):670-7

Ichimura, T., Bonventre, J.V., Bailly, V., Wei, H., Hession, C.A., Cate, R.L., and Sanicola, M. (1998). Kidney injury molecule-1 (KIM-1), a putative epithelial cell adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury. *J Biol Chem* 273, 4135-4142.

Ichimura, T., Hung, C.C., Yang, S.A., Stevens, J.L., and Bonventre, J.V. (2004). Kidney injury molecule-1: a tissue and urinary biomarker for nephrotoxicant-induced renal injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 286, F552-563.

Idee, J.M., Beaufile, H., and Bonnemain, B. (1994). Iodinated contrast media-induced nephropathy: pathophysiology, clinical aspects and prevention. *Fundam Clin Pharmacol* 8, 193-206.

Idee, J.M., Lancelot, E., Berthommier, C., Couturier-Goulas, V., Vazin, V., and Corot, C. (2000). Effects of non-ionic monomeric and dimeric iodinated contrast media on renal and systemic haemodynamics in rats. *Fundam Clin Pharmacol* 14, 11-18.

Kapoor, A., Sinha, N., Sharma, R.K., Shrivastava, S., Radhakrishnan, S., Goel, P.K., and Bajaj, R. (1996). Use of dopamine in prevention of contrast induced acute renal failure-a randomised study. *Int J Cardiol* 53, 233-236.

Katayama, H., Yamaguchi, K., Kozuka, T., Takashima, T., Seez, P., and Matsuura, K. (1990). Adverse reactions to ionic and nonionic contrast media. A report from the Japanese Committee on the Safety of Contrast Media. *Radiology* 175, 621-628.

Katholi, R.E., Taylor, G.J., McCann, W.P., Woods, W.T., Jr., Womack, K.A., McCoy, C.D., Katholi, C.R., Moses, H.W., Mishkel, G.J., Lucore, C.L., and et al. (1995). Nephrotoxicity from contrast media: attenuation with theophylline. *Radiology* 195, 17-22.

Katzberg, R.W. (1997). Urography into the 21st century: new contrast media, renal handling, imaging characteristics, and nephrotoxicity. *Radiology* 204, 297-312.

Kerns, S.R., and Hawkins, I.F., Jr. (1995). Carbon dioxide digital subtraction angiography: expanding applications and technical evolution. *AJR Am J Roentgenol* 164, 735-741.

Kolonko, A., Wiecek, A., and Kokot, F. (1998). The nonselective adenosine antagonist theophylline does prevent renal dysfunction induced by radiographic contrast agents. *J Nephrol* 11, 151-156.

Krinke, G.J. (2000). The laboratory rat. Academic press.

Krix, M., and Jenne, J.W. (2007). Ultrasound contrast agents : Pharmaceutical drug safety and bioeffects. *Radiologe* 47, 800-807.

Krix, M., Kauczor, H.U., and Delorme, S. (2003a). Quantification of tissue perfusion with novel ultrasound methods. *Radiologe* 43, 823-830.

Krix, M., Kiessling, F., Farhan, N., Schmidt, K., Hoffend, J., and Delorme, S. (2003b). A multivessel model describing replenishment kinetics of ultrasound contrast agent for quantification of tissue perfusion. *Ultrasound Med Biol* 29, 1421-1430.

Krix, M., Plathow, C., Kiessling, F., Herth, F., Karcher, A., Essig, M., Schmitteckert, H., Kauczor, H.U., and Delorme, S. (2004). Quantification of perfusion of liver tissue and metastases using a multivessel model for replenishment kinetics of ultrasound contrast agents. *Ultrasound Med Biol* 30, 1355-1363.

Kurnik, B.R., Allgren, R.L., Genter, F.C., Solomon, R.J., Bates, E.R., and Weisberg, L.S. (1998). Prospective study of atrial natriuretic peptide for the prevention of radiocontrast-induced nephropathy. *Am J Kidney Dis* 31, 674-680.

Kurnik, B.R., Weisberg, L.S., Cuttler, I.M., and Kurnik, P.B. (1990). Effects of atrial natriuretic peptide versus mannitol on renal blood flow during radiocontrast infusion in chronic renal failure. *J Lab Clin Med* 116, 27-36.

Lancelot, E., Idee, J.M., Couturier, V., Vazin, V., and Corot, C. (1999). Influence of the viscosity of iodixanol on medullary and cortical blood flow in the rat kidney: a potential cause of Nephrotoxicity. *J Appl Toxicol* 19, 341-346.

Lautin, E.M., Freeman, N.J., Schoenfeld, A.H., Bakal, C.W., Haramati, N., Friedman, A.C., Lautin, J.L., Braha, S., Kadish, E.G., Sprayregen, S., et al. (1991). Radiocontrast-associated renal dysfunction: incidence and risk factors. *AJR Am J Roentgenol* 157, 49-58.

Lavrovsky, Y., Schwartzman, M.L., Levere, R.D., Kappas, A., and Abraham, N.G. (1994). Identification of binding sites for transcription factors NF-kappa B and AP-2 in the promoter region of the human heme oxygenase 1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 5987-5991.

Lehnert, T., Keller, E., Gondolf, K., Schaffner, T., Pavenstadt, H., and Schollmeyer, P. (1998). Effect of haemodialysis after contrast medium administration in patients with renal insufficiency. *Nephrol Dial Transplant* 13, 358-362.

Liss, P., Nygren, A., Erikson, U., and Ulfendahl, H.R. (1998a). Injection of low and iso-osmolar contrast medium decreases oxygen tension in the renal medulla. *Kidney Int* 53, 698-702.

Liss, P., Nygren, A., and Hansell, P. (1998b). Influence of iotrolan on renal cortical and outer medullary blood flow in the rat. *Acad Radiol* 5 Suppl 1, S123-126.

Liss, P., Nygren, A., and Hansell, P. (1999). Hypoperfusion in the renal outer medulla after injection of contrast media in rats. *Acta Radiol* 40, 521-527.

Liss, P., Nygren, A., Olsson, U., Ulfendahl, H.R., and Erikson, U. (1996). Effects of contrast media and mannitol on renal medullary blood flow and red cell aggregation in the rat kidney. *Kidney Int* 49, 1268-1275.

Liss, P., Persson, P.B., Hansell, P., and Lagerqvist, B. (2006). Renal failure in 57 925 patients undergoing coronary procedures using iso-osmolar or low-osmolar contrast media. *Kidney Int* 70, 1811-1817.

Love, L., Lind, J.A., Jr., and Olson, M.C. (1989). Persistent CT nephrogram: significance in the diagnosis of contrast nephropathy. *Radiology* 172, 125-129.

Love, L., and Olson, M.C. (1991). Persistent CT nephrogram: significance in the diagnosis of contrast nephropathy--an update. *Urol Radiol* 12, 206-208.

Lucidarme, O., Franchi-Abella, S., Correas, J.M., Bridal, S.L., Kurtisovski, E., and Berger, G. (2003). Blood flow quantification with contrast-enhanced US: "entrance in the section" phenomenon-phantom and rabbit study. *Radiology* 228, 473-479.

Maines, M.D. (1988). Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *Faseb J* 2, 2557-2568.

Maines, M.D., and Panahian, N. (2001). The heme oxygenase system and cellular defense mechanisms. Do HO-1 and HO-2 have different functions? *Adv Exp Med Biol* 502, 249-272.

Margulies, K.B., McKinley, L.J., Cavero, P.G., and Burnett, J.C., Jr. (1990). Induction and prevention of radiocontrast-induced nephropathy in dogs with heart failure. *Kidney Int* 38, 1101-1108.

McCullough, P.A., Adam, A., Becker, C.R., Davidson, C., Lameire, N., Stacul, F., and Tumlin, J. (2006). Epidemiology and prognostic implications of contrast-induced nephropathy. *Am J Cardiol* 98, 5K-13K.

McCullough, P.A., Wolyn, R., Rocher, L.L., Levin, R.N., and O'Neill, W.W. (1997). Acute renal failure after coronary intervention: incidence, risk factors, and relationship to mortality. *Am J Med* 103, 368-375.

Möckel, M. (2002). Empfehlung zur Prophylaxe der durch Röntgen-Kontrastmittel induzierten Nephropathie. *Zeitschrift für Kardiologie*, Band 91, Heft 9 (2002) 7 Seiten, 719-726.

Morcos, S.K., Thomsen, H.S., and Webb, J.A. (1999). Contrast-media-induced nephrotoxicity: a consensus report. Contrast Media Safety Committee, European Society of Urogenital Radiology (ESUR). *Eur Radiol* 9, 1602-1613.

Moreau, J.F., Droz, D., Sabto, J., Jungers, P., Kleinknecht, D., Hinglais, N., and Michel, J.R. (1975). Osmotic Nephrosis Induced by Water-Soluble Triiodinated Contrast Media in Man. A Retrospective Study of 47 Cases. *Radiology* 115, 329-336.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65, 55-63.

Mule, S., De Cesare, A., Frouin, F., Lucidarme, O., and Herment, A. (2007). An original methodology for quantitative assessment of perfusion in small animal studies using contrast-enhanced ultrasound. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2007, 347-350.

Nash, K., Hafeez, A., and Hou, S. (2002). Hospital-acquired renal insufficiency. *Am J Kidney Dis* 39, 930-936.

Newaz, M.A., and Oyekan, A.O. (2001). Vascular responses to endothelin-1, angiotensin-II, and U46619 in glycerol-induced acute renal failure. *J Cardiovasc Pharmacol* 38, 569-577.

- Nguyen, M.T., and Devarajan, P. (2007). Biomarkers for the early detection of acute kidney injury. *Pediatr Nephrol*.
- Ohlerth, S., and O'Brien R, T. (2007). Contrast ultrasound: General principles and veterinary clinical applications. *Vet J*.
- Oldroyd, S., Slee, S.J., Haylor, J., Morcos, S.K., and Wilson, C. (1994). Role for endothelin in the renal responses to radiocontrast media in the rat. *Clin Sci (Lond)* 87, 427-434.
- Olszanecki, R., Rezzani, R., Omura, S., Stec, D.E., Rodella, L., Botros, F.T., Goodman, A.I., Drummond, G., and Abraham, N.G. (2007). Genetic suppression of HO-1 exacerbates renal damage: reversed by an increase in the antiapoptotic signaling pathway. *Am J Physiol Renal Physiol* 292, F148-157.
- Pannu, N., Wiebe, N., and Tonelli, M. (2006). Prophylaxis strategies for contrast-induced nephropathy. *Jama* 295, 2765-2779.
- Persson, P.B. (2005). Contrast-induced nephropathy. *Eur Radiol* 15 *Suppl* 4, D65-69.
- Persson, P.B. (2006). Contrast-induced-Nephropathie. Taylor&Francis.
- Persson, P.B., Hansell, P., and Liss, P. (2005). Pathophysiology of contrast medium-induced nephropathy. *Kidney Int* 68, 14-22.
- Persson, P.B., and Patzak, A. (2005). Renal haemodynamic alterations in contrast medium-induced nephropathy and the benefit of hydration. *Nephrol Dial Transplant* 20 *Suppl* 1, i2-5.
- Persson, P.B., and Tepel, M. (2006). Contrast medium-induced nephropathy: the pathophysiology. *Kidney Int Suppl*, S8-10.
- Reinhardt, M., Hauff, P., Briel, A., Uhlendorf, V., Linker, R.A., Maurer, M., and Schirner, M. (2005). Sensitive particle acoustic quantification (SPAQ): a new ultrasound-based approach for the quantification of ultrasound contrast media in high concentrations. *Invest Radiol* 40, 2-7.
- Ruehm, S.G., Hany, T.F., Pfammatter, T., Schneider, E., Ladd, M., and Debatin, J.F. (2000). Pelvic and lower extremity arterial imaging: diagnostic performance of three-dimensional contrast-enhanced MR angiography. *AJR Am J Roentgenol* 174, 1127-1135.
- Runge, V.M. (2000). Safety of approved MR contrast media for intravenous injection. *J Magn Reson Imaging* 12, 205-213.
- Runge, V.M., and Knopp, M.V. (1999). Off-label use and reimbursement of contrast media in MR. *J Magn Reson Imaging* 10, 489-495.
- Salomon, F.-V.G.H.G., Uwe. (2005). Anatomie für die Tiermedizin Enke Verlag in MVS Medizinverlag Stuttgarter GmbH & Co. KG Stuttgart.
- Schnermann, J., Ploth, D.W., and Hermle, M. (1976). Activation of tubulo-glomerular feedback by chloride transport. *Pflugers Arch* 362, 229-240.

- Seelinger, E., F.B., Wronski, T., Landwig, M., Arakelyan K., Godes M., Möckel M., Persson P. B. . (2007). Viscosity of Contrast Media Perturbs Renal Hemodynamics. *JASN, Journal of the American Society of Nephrology* 18 Auflage 8, 2912-2920.
- Seidel, G., and Meyer, K. (2001a). Harmonic imaging-a new method for the sonographic assessment of cerebral perfusion. *Eur J Ultrasound* 14, 103-113.
- Seidel, G., and Meyer, K. (2001b). Harmonic imaging. A new method of ultrasound imaging of brain perfusion. *Nervenarzt* 72, 600-609.
- Shammas, N.W., Kapalis, M.J., Harris, M., McKinney, D., and Coyne, E.P. (2001). Aminophylline does not protect against radiocontrast nephropathy in patients undergoing percutaneous angiographic procedures. *J Invasive Cardiol* 13, 738-740.
- Shi, G.P., Sukhova, G.K., Grubb, A., Ducharme, A., Rhode, L.H., Lee, R.T., Ridker, P.M., Libby, P., and Chapman, H.A. (1999). Cystatin C deficiency in human atherosclerosis and aortic aneurysms. *J Clin Invest* 104, 1191-1197.
- Solomon, R. (1998). Contrast-medium-induced acute renal failure. *Kidney Int* 53, 230-242.
- Solomon, R., Briguori, C., and Bettmann, M. (2006). Selection of contrast media. *Kidney Int Suppl*, S39-45.
- Solomon, R., Werner, C., Mann, D., D'Elia, J., and Silva, P. (1994). Effects of saline, mannitol, and furosemide to prevent acute decreases in renal function induced by radiocontrast agents. *N Engl J Med* 331, 1416-1420.
- Speck, O., Chang, L., Itti, L., Itti, E., and Ernst, T. (1999). Comparison of static and dynamic MRI techniques for the measurement of regional cerebral blood volume. *Magn Reson Med* 41, 1264-1268.
- Spennemann, B. (2002). Harnuntersuchung beim Heimtierkaninchen. Freie Universität Berlin, Berlin.
- Star, R.A. (1998). Treatment of acute renal failure. *Kidney Int* 54, 1817-1831.
- Stevens, M.A., McCullough, P.A., Tobin, K.J., Speck, J.P., Westveer, D.C., Guido-Allen, D.A., Timmis, G.C., and O'Neill, W.W. (1999). A prospective randomized trial of prevention measures in patients at high risk for contrast nephropathy: results of the P.R.I.N.C.E. Study. Prevention of Radiocontrast Induced Nephropathy Clinical Evaluation. *J Am Coll Cardiol* 33, 403-411.
- Takahashi, T., Morita, K., Akagi, R., and Sassa, S. (2004). Protective role of heme oxygenase-1 in renal ischemia. *Antioxid Redox Signal* 6, 867-877.
- Takase, O., Minto, A.W., Puri, T.S., Cunningham, P.N., Jacob, A., Hayashi, M., and Quigg, R.J. (2008). Inhibition of NF-kappaB-dependent Bcl-xL expression by clusterin promotes albumin-induced tubular cell apoptosis. *Kidney Int* 73, 567-577.
- Taylor, A.J., Hotchkiss, D., Morse, R.W., and McCabe, J. (1998). PREPARED: Preparation for Angiography in Renal Dysfunction: a randomized trial of inpatient vs outpatient hydration

protocols for cardiac catheterization in mild-to-moderate renal dysfunction. *Chest* 114, 1570-1574.

Tenhunen, R., Marver, H.S., and Schmid, R. (1968). The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 61, 748-755.

Tepel, M., van der Giet, M., Schwarzfeld, C., Laufer, U., Liermann, D., and Zidek, W. (2000). Prevention of radiographic-contrast-agent-induced reductions in renal function by acetylcysteine. *N Engl J Med* 343, 180-184.

Tervahartiala, P., Kivisaari, L., Kivisaari, R., and Virtanen, I. (1993). Contrast media-induced renal morphologic lesions in diabetic rats. *Acta Radiol* 34, 220-225.

Teschan, P.E., Baxter, C.R., O'Brien, T.F., Freyhof, J.N., and Hall, W.H. (1960). Prophylactic hemodialysis in the treatment of acute renal failure. *Ann Intern Med* 53, 992-1016.

Tofovic, S.P., and Jackson, E.K. (2003). Rat models of the metabolic syndrome. *Methods Mol Med* 86, 29-46.

Tofovic, S.P., Kusaka, H., Kost, C.K., Jr., and Bastacky, S. (2000). Renal function and structure in diabetic, hypertensive, obese ZDFxSHHF-hybrid rats. *Ren Fail* 22, 387-406.

Trivedi, H.S., Moore, H., Nasr, S., Aggarwal, K., Agrawal, A., Goel, P., and Hewett, J. (2003). A randomized prospective trial to assess the role of saline hydration on the development of contrast nephrotoxicity. *Nephron Clin Pract* 93, C29-34.

Ueda, J., Nygren, A., Sjoquist, M., Jacobsson, E., Ulfendahl, H.R., and Araki, Y. (1998). Iodine concentrations in the rat kidney measured by X-ray microanalysis. Comparison of concentrations and viscosities in the proximal tubules and renal pelvis after intravenous injections of contrast media. *Acta Radiol* 39, 90-95.

Uhlendorf, V., Scholle, F.D., and Reinhardt, M. (2000). Acoustic behaviour of current ultrasound contrast agents. *Ultrasonics* 38, 81-86.

Vaidya, V.S., Ramirez, V., Ichimura, T., Bobadilla, N.A., and Bonventre, J.V. (2006). Urinary kidney injury molecule-1: a sensitive quantitative biomarker for early detection of kidney tubular injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 290, F517-529.

VanZee, B.E., Hoy, W.E., Talley, T.E., and Jaenike, J.R. (1978). Renal injury associated with intravenous pyelography in nondiabetic and diabetic patients. *Ann Intern Med* 89, 51-54.

von Engelhardt Wolfgang, B.G. (2004). *Physiologie der Haustiere*. Enke Verlag: Stuttgart.

Wacker, F.K., Reither, K., Ebert, W., Wendt, M., Lewin, J.S., and Wolf, K.J. (2003). MR image-guided endovascular procedures with the ultrasmall superparamagnetic iron oxide SH U 555 C as an intravascular contrast agent: study in pigs. *Radiology* 226, 459-464.

Walday, P., Heglund, I.F., Golman, K., Cornacoff, J., and Holtz, E. (1995). Renal effects of iodixanol in experimental animals. *Acta Radiol Suppl* 399, 204-212.

- Weinstein, J.M., Heyman, S., and Brezis, M. (1992). Potential deleterious effect of furosemide in radiocontrast nephropathy. *Nephron* 62, 413-415.
- Weisberg, L.S., Kurnik, P.B., and Kurnik, B.R. (1992). Radiocontrast-induced nephropathy in humans: role of renal vasoconstriction. *Kidney Int* 41, 1408-1415.
- Wiesner E., R.R. (2000). *Lexikon der Veterinärmedizin*. Enke im Hippokrates Verlag GmbH, Stuttgart 2000: Stuttgart
- Witzgall, R., Brown, D., Schwarz, C., and Bonventre, J.V. (1994). Localization of proliferating cell nuclear antigen, vimentin, c-Fos, and clusterin in the postischemic kidney. Evidence for a heterogenous genetic response among nephron segments, and a large pool of mitotically active and dedifferentiated cells. *J Clin Invest* 93, 2175-2188.
- Wolf, G.L., Arenson, R.L., and Cross, A.P. (1989). A prospective trial of ionic vs nonionic contrast agents in routine clinical practice: comparison of adverse effects. *AJR Am J Roentgenol* 152, 939-944.
- Yamazaki, H., Oi, H., Matsushita, M., Inoue, T., Murayama, S., Koizumi, M., Nose, T., Tanaka, E., Teshima, T., Kagawa, K., and Inoue, T. (1996a). Renal cortical retention of contrast medium after angiography as assessed by delayed CT: a multivariate analysis. *Radiat Med* 14, 247-250.
- Yamazaki, H., Oi, H., Matsushita, M., Inoue, T., Teshima, T., Koizumi, M., Nose, T., Tanaka, E., Nakamura, H., Inoue, T., Kim, T., and Elbaradie, M.M. (1997). Renal cortical retention on delayed CT after angiography and contrast associated nephropathy. *Br J Radiol* 70, 897-902.
- Yamazaki, H., Oi, H., Matsushita, M., Koizumi, M., Kagawa, K., Tanaka, E., Murayama, S., Nose, T., Teshima, T., Inoue, T.A., and Inoue, T.O. (1996b). Focal residual contrast media in the kidney 24 hours after angiography. *Acta Radiol* 37, 348-351.
- Yoshida, T., Kurella, M., Beato, F., Min, H., Ingelfinger, J.R., Stears, R.L., Swinford, R.D., Gullans, S.R., and Tang, S.S. (2002). Monitoring changes in gene expression in renal ischemia-reperfusion in the rat. *Kidney Int* 61, 1646-1654.
- Yoshioka, T., Fogo, A., and Beckman, J.K. (1992). Reduced activity of antioxidant enzymes underlies contrast media-induced renal injury in volume depletion. *Kidney Int* 41, 1008-1015.
- Zhou, Y., Vaidya, V.S., Brown, R.P., Zhang, J., Rosenzweig, B.A., Thompson, K.L., Miller, T.J., Bonventre, J.V., and Goering, P.L. (2008). Comparison of kidney injury molecule-1 and other nephrotoxicity biomarkers in urine and kidney following acute exposure to gentamicin, mercury, and chromium. *Toxicol Sci* 101, 159-170.

11. Danksagung

Mein Dank gilt Frau Univ.-Prof. Dr. Johanna Plendl vom Institut für Veterinär-Anatomie der Freien Universität Berlin und Herrn Prof. Dr. Matthias Bräutigam für die freundliche Betreuung.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Herrn Dr. Hubertus Pietsch und Herrn Dr. Martin Sieber vom Bereich Contrast Media Research, Diagnostic Imaging der Bayer Schering Pharma AG für die Bereitstellung des Themas und die engagierte Betreuung während meiner Dissertation bedanken. Insbesondere danke ich Herrn Dr. Sieber für die konzeptionelle und wissenschaftliche Unterstützung.

Des Weiteren möchte ich mich sehr herzlich bei Herrn Michael Reinhardt für seine Unterstützung bedanken. Er hat mir durch sein umfangreiches Wissen im Bereich der Sonographie sehr geholfen. Herrn Scholle möchte ich für die Auswertung der Ultraschalldaten danken.

Im Besonderen danke ich den Mitarbeitern der Abteilung für Contrast Media Research der Bayer Schering Pharma AG, Berlin, für Ihre große Hilfsbereitschaft. Insbesondere gilt mein Dank Stefanie Runge, Ines Heinzelmann und Claudia Heyer für die technische Hilfe bei der Versuchsdurchführung.

Bei Herrn Dr. Stephan Lehr von Bayer Schering Pharma AG bedanke ich mich für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

Ich danke der Bayer Schering Pharma AG, Berlin, vielmals für das Promotionsstipendium. Ebenso möchte ich mich für das Bereitstellen der Materialien und des Arbeitsplatzes recht herzlich bedanken.

Ich danke meinem Repetitor Dr. Dr. Christoph Hinterseher, Leitung des Wissenschaftsrepetitoriums VET.MED.R., für die Hilfe bei der Dissertation sowie für die Unterstützung während des Studiums.

Ich möchte die Möglichkeit nutzen vor allem meinen geliebten Eltern zu danken, die es mir ermöglicht haben, die Schule und das Studium erfolgreich zu absolvieren und zu promovieren.

Ich danke ihnen und meinen Schwestern Chiara und Denise dafür, dass ich mich mit jedem Problem an sie wenden konnte und dass sie mir immer eine große Stütze waren.

Ich danke Tevi dafür, dass er mich durch mein halbes Leben und mein gesamtes Studium begleitet hat.

Des Weiteren danke ich meinen Freundinnen Isi und Caro für die schöne Studienzeit und Inis, Melanie, Mani, Iris W., Rianne, Robin, Benita, Martin, Channah, Nathalie, Jenny, Steven und Iris H. für die sensationelle Unterstützung während des Studiums.

Ich danke meinem Freund Dani für seine Hilfe und seine große Geduld während meiner Promotionsarbeit.

12. Publikationsverzeichnis

Retention of Iodine and Expression of Biomarkers for Renal Damage in the Kidney After Application of Iodinated Contrast Media in Rats

13. Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe.

Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen
in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 01.12.2010

Janine Sommer