

Aus der Radiologischen Universitätsklinik Tübingen
Abteilung Diagnostische und Interventionelle Radiologie
Ärztlicher Direktor Professor Dr. C. D. Claussen

Die Wirkung von MR-Kontrastmitteln
auf Wachstumsverhalten,
klonogene Aktivität,
Zellzyklus,
Apoptose
und zellstrukturelle Charakteristika
humaner embryonaler Lungenfibroblasten
und Nabelschnur-Endothelzellen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Julie Jasmin Anna Gwenaëlle Rénata Bébin
aus Saarbrücken

2013

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. med. J. Wiskirchen

2. Berichterstatter: Professor Dr. H. R. Salih

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	- 9 -
1.1. Magnetresonanantomographie – Technische Grundlagen und neue Einsatzgebiete	- 10 -
1.2. Einsatz von MR-Kontrastmitteln	- 12 -
1.2.1. In Zahlen	- 12 -
1.2.2. Klassifizierung der KM	- 13 -
1.2.2.1. Nach ihrer chemischen Zusammensetzung	- 13 -
1.2.2.2. Nach der Konfiguration des Chelatkomplexes	- 14 -
1.2.2.3. Nach ihrem Anreicherungsverhalten und ihrer Pharmakokinetik	- 15 -
1.2.3. Nebenwirkungsprofil von MR-Kontrastmitteln	- 17 -
1.2.4. Die drei untersuchten KM: Chemische Struktur, Indikationen, Kontraindikationen	- 17 -
1.2.5. Neue Einsatzgebiete von MR-KM	- 20 -
1.3. Evidenz bezüglich Toxizität	- 21 -
1.3.1. Toxizität in vitro	- 21 -
1.3.2. Nephrogene systemische Fibrose	- 21 -
1.3.3. Gabe von MR-KM in der Schwangerschaft und Toxizität für den Feten	- 24 -
1.4. Fragestellung der Dissertation	- 26 -
2. Material und Methodik	- 27 -
2.1. Materialien	- 27 -
2.1.1. Zellen	- 27 -
2.1.2. MR-Kontrastmittel	- 27 -
2.1.3. Kulturmedium	- 28 -
2.1.4. PBS	- 29 -
2.1.5. Trypsin	- 29 -
2.2. Methoden	- 30 -
2.2.1. Messungen zu Wachstumsverhalten und klonogener Aktivität	- 30 -
2.2.1.1. Zellkultur	- 30 -
2.2.1.2. Proliferationskinetik (PK)	- 31 -
2.2.1.3. Koloniebildungs-Assay (KoBi)	- 32 -
2.2.2. Durchflusszytometrie	- 33 -
2.2.2.1. Zellzyklus einer Säugetierzelle	- 33 -
2.2.2.2. Prinzip der Durchflusszytometrie	- 34 -
2.2.2.3. Grundlagen der Färbung	- 35 -
2.2.2.4. Versuchsdurchführung	- 35 -
2.2.2.5. Mitochondriales Transmembranpotential	- 36 -
2.2.3. Immunfluoreszenz-Mikroskopie	- 37 -
2.3. Statistik	- 38 -
3. Ergebnisse	- 40 -
3.1. Proliferationskinetik	- 40 -
3.1.1. Beschreibung des Kurvenverlaufs	- 40 -
3.1.2. HEL	- 41 -
3.1.2.1. Zellzahl	- 41 -

3.1.2.2.	Viabilität	- 49 -
3.1.3.	HUVEC	- 56 -
3.1.3.1.	Zellzahl	- 56 -
3.1.3.2.	Viabilität	- 58 -
3.2.	Koloniebildungsassay	- 60 -
3.2.1.	Aussage des KoBi.....	- 60 -
3.2.2.	HEL.....	- 60 -
3.2.3.	HUVEC	- 67 -
3.3.	Zellzyklus	- 69 -
3.4.	Mitochondriales Transmembranpotential	- 73 -
3.5.	Immunfluoreszenz.....	- 74 -
3.5.1.	HEL.....	- 75 -
3.5.2.	Exemplarische Darstellung von Endothelzellen in der Immunfluoreszenz.....	- 80 -
4.	Diskussion.....	- 83 -
4.1.	Einsatz von MR-KM in der Schwangerschaft.....	- 83 -
4.1.1.	Diaplazentärer Transfer, Darstellung der Plazenta, fetale KM- Mengen	- 83 -
4.1.2.	Mutagenität und Teratogenität von MR-Kontrastmitteln.....	- 84 -
4.1.3.	Indikationen zur MRT mit KM in der Schwangerschaft	- 86 -
4.1.4.	Richtlinien und Empfehlungen	- 88 -
4.2.	Diskussion der NSF im Kontext	- 89 -
4.2.1.	Überlegungen zur Epidemiologie.....	- 89 -
4.2.2.	Gadolinium-Pharmakokinetik in Abhängigkeit von der Nierenfunktion, Dialysierbarkeit und Nephrotoxizität.....	- 92 -
4.2.3.	Systemische Manifestationen der NSF	- 93 -
4.2.4.	Beurteilung der Stabilität der Chelate	- 93 -
4.2.4.1.	Stabilität der Gadolinium-Komplexe und Risiko der Transmetallierung.....	- 93 -
4.2.4.2.	Evidenz für Gadolinium-Dissoziation	- 96 -
4.2.4.3.	NSF im Tiermodell	- 99 -
4.2.5.	Pathophysiologie der NSF	- 101 -
4.2.5.1.	Fibrosemechanismus und involvierte Mediatoren.....	- 101 -
4.2.5.2.	NSF: Histologie, Rolle der CF, Rolle des TGF β , weitere Fibrosemediatoren.....	- 103 -
4.2.6.	NSF- Konsequenzen im klinischen Alltag	- 107 -
4.3.	Eigene Untersuchung.....	- 108 -
4.3.1.	Beurteilung der Methode.....	- 108 -
4.3.2.	Diskussion der eigenen Ergebnisse.....	- 110 -
4.3.3.	Diskussion der Ergebnisse im Kontext.....	- 115 -
4.4.	Abschließende Beurteilung und Perspektive.....	- 116 -
5.	Zusammenfassung.....	- 119 -
	Literaturverzeichnis	- 122 -
	Danksagung	- 136 -
	Curriculum vitae	- 137 -

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1.1: Strukturformel Magnevist	- 18 -
Abb. 1.2: Strukturformel Gadovist	- 19 -
Abb. 2.1: Zellzyklus einer Säugetierzelle	- 34 -
Abb. 3.1: Zellzahlmittelwerte HEL 4h im Liniendiagramm	- 43 -
Abb. 3.2: Zellzahlmittelwerte HEL 4h im Säulendiagramm	- 43 -
Abb. 3.3: Zellzahlmittelwerte HEL 4h Resovist im Liniendiagramm	- 44 -
Abb. 3.4: Zellzahlmittelwerte HEL 4h Gadovist im Liniendiagramm	- 44 -
Abb. 3.5: Zellzahlmittelwerte HEL 4h Magnevist im Liniendiagramm	- 45 -
Abb. 3.6: Zellzahlmittelwerte HEL 24h im Liniendiagramm	- 47 -
Abb. 3.7: Zellzahlmittelwerte HEL 24h im Säulendiagramm	- 47 -
Abb. 3.8: Zellzahlmittelwerte HEL 24h Resovist im Liniendiagramm	- 48 -
Abb. 3.9: Zellzahlmittelwerte HEL 24h Gadovist im Liniendiagramm	- 48 -
Abb. 3.10: Zellzahlmittelwerte HEL 24h Magnevist im Liniendiagramm	- 49 -
Abb. 3.11: Viabilitätsmittelwerte HEL 4h im Säulendiagramm	- 50 -
Abb. 3.12: Viabilitätsmittelwerte HEL 24h im Säulendiagramm.....	- 52 -
Abb. 3.13: Viabilitätsmittelwerte Resovist Vergleich 4h-24h	- 53 -
Abb. 3.14: Viabilitätsmittelwerte Gadovist Vergleich 4h-24h	- 54 -
Abb. 3.15: Viabilitätsmittelwerte Magnevist Vergleich 4h-24h	- 56 -
Abb. 3.16: Zellzahlmittelwerte HUVEC im Liniendiagramm	- 57 -
Abb. 3.17: Zellzahlmittelwerte HUVEC im Säulendiagramm	- 58 -
Abb. 3.18: Viabilitätsmittelwerte HUVEC im Säulendiagramm	- 59 -
Abb.3.19: KoBi HEL 4h Kolonienmittelwerte im Säulendiagramm	- 61 -
Abb. 3.20: KoBi HEL 4h Mittelwert Bedingung/Mittelwert Kontrolle	- 62 -
Abb. 3.21: KoBi HEL 24h: Photographie der 6-Well-Platten nach Magnevist- Inkubation.....	- 63-65 -
Abb.3.22: KoBi HEL 24h Kolonienmittelwerte im Säulendiagramm	- 66 -
Abb. 3.23: KoBi HEL 24h Mittelwert Bedingung/Mittelwert Kontrolle	- 66 -
Abb.3.24: KoBi HUVEC Kolonienmittelwerte im Säulendiagramm	- 68 -
Abb. 3.25: KoBi HUVEC Mittelwert Bedingung/Mittelwert Kontrolle	- 68 -
Abb. 3.26: Gating der Zellzyklusanteile mit dem FACSort	- 70 -

Abb. 3.27: Zellzyklusanteile direkt nach Ende der KM-Inkubation	- 71 -
Abb. 3.28: Zellzyklusanteile 24h nach Ende der KM-Inkubation	- 73 -
Abb. 3.29: Mitochondriales Transmembranpotential nach KM-Inkubation .	- 74 -
Abb. 3.30: Immunfluoreszenz HEL Kontrolle 200x, Vimentin u. DAPI	- 76 -
Abb. 3.31: Immunfluoreszenz HEL Kontrolle 400x, Vimentin u. DAPI	- 76 -
Abb. 3.32: Immunfluoreszenz HEL Gadovist 200x, Vimentin u. DAPI	- 77 -
Abb. 3.33: Immunfluoreszenz HEL Gadovist 400x, Vimentin u. DAPI	- 77 -
Abb. 3.34: Immunfluoreszenz HEL Magnevist 400x, Vimentin u. DAPI	- 78 -
Abb. 3.35: Immunfluoreszenz HEL Resovist 200x, Vimentin u. DAPI	- 79 -
Abb. 3.36: Immunfluoreszenz HEL Resovist 400x, Vimentin u. DAPI	- 79 -
Abb. 3.37: Immunfluoreszenz EC 400x, Vimentin u. DAPI	- 80 -
Abb. 3.38: Immunfluoreszenz Kokultur EC/SMC, 400x, Vimentin u. vWF ..	- 81 -
Abb. 3.39: Immunfluoreszenz EC 400x, vWF	- 81 -

Tabelle 1.1: Übersicht der MR-Kontrastmittel: Chemische Grundsubstanz, Handelsname und generischer Name	- 13 -
Tabelle 2.1: Schema für die Kalkulation der Kontrastmitteldosis	- 28 -
Tabelle 3.1: Zellzahlmittelwerte HEL 4h-Inkubation	- 42 -
Tabelle 3.2: Zellzahlmittelwerte HEL 24h-Inkubation	- 46 -
Tabelle 3.3: Viabilitätsmittelwerte HEL 4h-Inkubation	- 50 -
Tabelle 3.4: Viabilitätsmittelwerte HEL 24h-Inkubation	- 51 -
Tabelle 3.5: Vergleich der Viabilitätsmittelwerte 4h-24h Resovist	- 53 -
Tabelle 3.6: Vergleich der Viabilitätsmittelwerte 4h-24h Gadovist.....	- 54 -
Tabelle 3.7: Vergleich der Viabilitätsmittelwerte 4h-24h Magnevist.....	- 55 -
Tabelle 3.8: Zellzahlmittelwerte HUVEC	- 57 -
Tabelle 3.9: Viabilitätsmittelwerte HUVEC	- 59 -
Tabelle 3.10: KoBi HEL 4h: Mittelwerte, Standardabweichung, Ratio	- 61 -
Tabelle 3.11: KoBi HEL 24h: Mittelwerte, Standardabweichung, Ratio	- 65 -
Tabelle 3.12: KoBi HUVEC: Mittelwerte, Standardabweichung, Ratio	- 67 -
Tabelle 3.13: Zellzyklusanteile direkt nach Ende der KM-Inkubation	- 71 -
Tabelle 3.14: Zellzyklusanteile 24h nach Ende der KM-Inkubation	- 72 -

Abkürzungsverzeichnis

AK	=	Antikörper
BrdU	=	Bromodesoxyuridin
CASY	=	Cell Analyzing System
CCCP	=	Carbonyl cyanid 3-chlorophenylhydrazon
CF	=	Zirkulierender Fibrozyt
CIN	=	Contrast-induced nephropathy
CKD	=	Chronic kidney disease
d	=	Tag nach Aussaat
EC	=	Endothelzellen
ECGS	=	Endothelial cell growth supplement
ECM	=	Extrazelluläre Matrix
FACS	=	Fluorescence-activated cell sorting
FCS	=	Fetales Kalbsserum
FITC	=	Fluorescein Isothiozyanat
fMRT	=	funktionelle Magnetresonanztomographie
G	=	Gadovist
Gd	=	Gadolinium
Gd-DOTA	=	Gadoterat-Meglumin, Dotarem ®
Gd-DTPA	=	Gadopentetat-Dimeglumin, Magnevist ®
Gd-DTPA-BMA	=	Gadodiamid, Omniscan ®
Gd-HP-DO3A	=	Gadoteridol, Prohance ®
GFR	=	Glomeruläre Filtrationsrate
HEL	=	Humane embryonale Lungenfibroblasten
HUVEC	=	Humane Nabelschnur-Endothelzellen
IF	=	Intermediärfilamente
IFN- α	=	Interferon-alpha
IL	=	Interleukin
IU	=	Internationale Einheit
KG	=	Körpergewicht
KM	=	Kontrastmittel

Ko	=	Kontrolle
KoBi	=	Koloniebildungsassay
Ma	=	Magnevist
MMP	=	Matrixmetalloproteinase
MR	=	Magnetresonanz
MRA	=	Magnetresonanzangiographie
MW	=	Mittelwert
n	=	Anzahl der Versuchsdurchläufe
NFD	=	Nephrogene fibrosierende Dermopathie
NSF	=	Nephrogene systemische Fibrose
PBS	=	Phosphate buffered saline
PI	=	Propidiumiodid
p.i.	=	post injectionem
PK	=	Proliferationskinetik
R	=	Resovist
RES	=	Retikuloendotheliales System
SMC	=	Glatte Muskelzellen
SD	=	Standardabweichung
SPIO	=	Superparamagnetic particles of iron oxide
SSFSE	=	Single Shot Fast Spin Echo
TGF β	=	Transforming growth factor beta
TIMP	=	Tissue inhibitors of metalloproteinases
TMRE	=	Tetramethylrhodamin ethyl ester
USPIO	=	Ultrasmall superparamagnetic particles of iron oxide
vWF	=	vonWillebrandt Faktor

1. Einleitung

Die Magnetresonanztomographie ist als bildgebende Methode aus der modernen Medizin nicht mehr wegzudenken. Gegenüber der Computertomographie ermöglicht sie gleichermaßen die Erstellung von 3D-Rekonstruktionen und bietet hierbei einen deutlicheren Weichteilkontrast bei Verzicht auf ionisierende Strahlung. Im Vergleich zur Sonographie stellt sie eine untersucherunabhängige Methode dar, die auch valide Ergebnisse liefert, wo erstere an ihre Grenzen stößt, z.B. bei schlechten Schallbedingungen durch Gasüberlagerung oder bei Patienten mit Adipositas.

Kontrastmittel in der MRT kommen zum Einsatz, um den unterschiedlichen Signalcharakter zwischen gesundem und pathologisch verändertem Gewebe noch zu verstärken, beispielsweise in der Einordnung malignomverdächtiger oder entzündlicher Läsionen. Eine weitere Indikation ist die Darstellung von Gefäß-Stenosen oder Gefäßmalformationen in der MR-Angiographie.

Eine besondere Herausforderung bedeutet die Wahl der angemessenen Bildgebung bei Fragestellungen während der Schwangerschaft. Sie soll eine Entscheidung über das weitere Procedere herbeiführen ohne dabei die Schwangere oder den Fetus einem Risiko auszusetzen, was den Einsatz der CT aufgrund der Teratogenität ionisierender Strahlung einschränkt. Nach dem Einsatz der Sonographie bleibt die MRT denjenigen Fällen vorbehalten, bei denen durch erstere keine ausreichende Klärung der Fragestellung erreicht werden kann. Primär erfolgt bei diesen Konstellationen die Bildgebung mittels nativer MRT, allerdings ist der Einsatz von MR-Kontrastmitteln zum Teil notwendig.

Erfahrungswerte zu den Auswirkungen von MR-Kontrastmitteln auf den fetalen Organismus liegen bisher nur begrenzt vor, die sehr geringen Fallzahlen lassen das tatsächliche Gefahrenpotential der MR-Kontrastmittel für den Feten ungeklärt. Toxizitätsstudien während der Schwangerschaft sind aufgrund ethischer Bedenklichkeit nicht durchführbar. Umso wertvoller sind demnach

Erkenntnisse, die man aus der in vitro-Exposition fetaler Zellen und Nabelschnurzellen gegenüber den MR-Kontrastmitteln gewinnen kann.

1.1. Magnetresonantomographie – Technische Grundlagen und neue Einsatzgebiete

Bei der Erstellung eines Bildkontrastes macht man sich die physikalische Gegebenheit zu Nutze, dass Wasserstoff als Atom mit ungerader Kernladungszahl einen Eigendrehimpuls besitzt. Man kann jeden Kern als magnetischen Dipol betrachten. In einer Ursprungssituation im Gewebeverband liegen die magnetischen Momente der H^+ -Ionen ungeordnet vor, sodass sie sich gegenseitig ausgleichen und die Summe der Vektoren null ergibt.

Im ersten Schritt erzeugt man durch einen Permanentmagneten, im klinischen Alltag mit einer Feldstärke von 0,5-3 Tesla, ein statisches magnetisches Hauptfeld, das B_0 -Feld. Hierdurch richten sich die magnetischen Dipole entsprechend dem für sie günstigsten Energiezustand zu einem größeren Anteil parallel und zu einem kleineren Anteil antiparallel zum äußeren Magnetfeld aus. Die Dipole werden zu einer Präzessionsbewegung angeregt um die Achse des magnetischen Hauptfeldes in Z-Richtung mit einer für die Feldstärke charakteristischen Larmorfrequenz.

Im zweiten Schritt wird ein Radiofrequenzpuls B_1 in der Larmorfrequenz eingestrahlt, dadurch kommt es zur Energieübertragung auf die magnetischen Einzelmomente, was als Phänomen der Resonanz bezeichnet wird. Das Summationsmoment wird ausgelenkt aus der Z-Richtung um einen Winkel, der abhängig ist von Dauer und Amplitude des Radiofrequenzpulses.

Liegt das magnetische Wechselfeld nicht mehr weiter an, fällt die Ausrichtung der H^+ -Ionen in ihren Ausgangszustand unter B_0 zurück (Relaxation). Relaxation bedeutet mathematisch, dass der Anteil des Gesamtvektors in der x-y-Ebene abnimmt.

Sie besteht aus 2 Komponenten:

1. Die **Longitudinale Relaxationszeit T1** oder Spin-Gitter-Relaxationszeit entspricht der Zeit, bis zu der die Z-Komponente des Summationsvektors zu einem bestimmten Anteil ($1-1/e \approx 63\%$) ihren Ausgangswert angenommen hat.

Sie ist abhängig von der Beweglichkeit des Kerns im Molekülgefüge oder Gitter.

2. Die **Transversale Relaxationszeit T2** oder Spin-Spin-Relaxationszeit bezieht sich auf die Zeit, bis zu der die X-Y-Komponente auf $1/e$ ($\approx 37\%$) ihres Ausgangswertes unmittelbar nach Anregung gefallen ist.

Sie beruht auf dem Entropieeffekt, der zunehmenden Desynchronisierung der präzedierenden Spins, und zu einem kleineren Anteil auf Inhomogenitäten des magnetischen Hauptfelds.

T1 und T2 sind nicht unmittelbar voneinander abhängig, aber T1 ist immer kleiner als T2.

Ziel der **Ortkodierung** ist es, dass jedes emittierte Signal seinem Ursprungsort zugeordnet werden kann. Man erreicht dies durch Überlagerung des magnetischen Hauptfelds durch 3 zueinander senkrecht stehende, ansteigende Magnetfelder, die sogenannten Gradientenfelder.

- Durch Einwirken eines Gradienten in Z-Richtung, werden nur die in dieser Schicht befindlichen Spins definiert.

- Wirkt ein weiterer Gradient in X-Richtung ein, erhält jeder Spin entlang der x-Achse ein spezifisches Resonanzsignal.

- Entsprechend wird mit der Charakterisierung der Spins entlang der y-Achse verfahren.

Die Registrierung der Signale mit Frequenz- und Phaseninformation für jede Schicht ermöglicht mithilfe der Fourier-Transformation die Rekonstruktion zu einem Bild.

Kontrastbestimmende Parameter in der MRT kann man gliedern in intrinsische und extrinsische Parameter. Zu den wesentlichen intrinsischen Parametern zählen die T1- und T2-Relaxationszeiten und die Protonendichte im untersuchten Gewebe, desweiteren spielen Blutfluss und Diffusionsvorgänge eine Rolle. Als extrinsische Faktoren bezeichnet man gerätespezifische Komponenten, wie z.B. Stärke und Homogenität des Magnetfelds oder Suszeptibilität der Empfangsspulen. MR-Kontrastmittel werden zu den extrinsischen Faktoren gerechnet.

Schnellere Sequenzen ermöglichen die Registrierung von Echtzeit-MRT-Bildern, die sich zu dreidimensionalen bewegten Bildern rekonstruieren lassen. Ein Einsatzgebiet dieser Technik stellt die EKG-getriggerte Kardio-MRT dar.

Bei der funktionellen MRT (fMRT) entsteht der Kontrast durch die Differenz des Bildsignals von zuvor aktivierten Gehirnarealen im Vergleich zum Signal ohne Aktivierung. Auf diese Weise können gezielt die Verarbeitungskreise eines äußeren Reizes im Gehirn dargestellt werden.

1.2. Einsatz von MR-Kontrastmitteln

1.2.1. In Zahlen

MR-Kontrastmittel werden seit 1988 in der bildgebenden Diagnostik verwendet. Seitdem wurden diese Substanzen weltweit bei mehr als 145 Mio. Patienten eingesetzt, davon bei mehr als 80 Mio. Gadopentetat-Dimeglumine (Magnevist®) und bei mehr als 33 Mio. Gadodiamid (Omniscan®).

1.2.2. Klassifizierung der KM

1.2.2.1. Nach ihrer chemischen Zusammensetzung

MR-KM basieren auf verschiedenen chemischen Grundsubstanzen, über die Tabelle 1.1 einen Überblick verschafft (die in der Dissertation untersuchten Kontrastmittel sind hervorgehoben).

Basierend auf	Kontrastmittel	Generischer Name
Gadolinium	Magnevist ®	Gadopentetat-Dimeglumin=Gd-DTPA
	Gadovist ®	Gadobutrol=Gd-BT-DO3A
	Dotarem ®	Gadoterat-Meglumin=Gd-DOTA
	Multihance ®	Gadobenat-Dimeglumin=Gd-BOPTA
	Omniscan ®	Gadodiamid=Gd-DTPA-BMA
	Primovist ®	Gadoxetsäure disodium=Gd-EOB-DTPA
	Prohance ®	Gadoteridol=Gd-HP-DO3A
	Vasovist ®	Gadofosveset trisodium
Eisen	Resovist ®	Ferucarbotran
	Endorem ®	Ferumoxtran
Mangan	Teslascan ®	Mangafodipir

Tabelle 1.1: Übersicht der MR-Kontrastmittel: Chemische Grundsubstanz, Handelsname, generischer Name

Als paramagnetische Substanzen eignen sich neben dem im klinischen Alltag am häufigsten eingesetzten Gadoliniumionen Metallionen der Übergangsmetalle (Mn, Cu, Ni, Cr). Durch die ungepaarten Elektronen im Molekül wird ein starkes magnetisches Wechselfeld erzeugt, das zu einer Beschleunigung der Relaxation der Protonen in unmittelbarer Nähe führt. Gd, das zur Gruppe der Lanthanoide („seltene Erdmetalle“) gerechnet wird, besitzt mit seinen 7 ungepaarten Elektronen einen hohen paramagnetischen Effekt.

In einfacher Dosis rufen paramagnetische Substanzen eine Verkürzung der T1-Relaxationszeit und damit eine Hyperintensität im Vergleich zur nativen Aufnahme hervor, man spricht von positiven Signalverstärkern. Bei höheren

Konzentrationen zeigt sich auch ein Effekt auf die T2-Relaxationszeit, der sich als Hypointensität äußert.

Neben den paramagnetischen KM existiert eine zweite Gruppe der superparamagnetischen Kontrastmittel. Sie bestehen aus Eisenoxidpartikeln, die zur besseren Löslichkeit und Verträglichkeit von Dextran oder Stärke umhüllt sind. Durch die Anordnung der Atome im Kristallgitter ist eine Verstärkung des magnetischen Moments um den Faktor 10-1000 erreichbar. In Abhängigkeit von der Partikelgröße werden die Substanzen unterteilt in SPIO (superparamagnetic particles of iron oxide) und USPIO (ultra-small superparamagnetic particles of iron oxide), woraus sich ihr unterschiedliches Anreicherungsverhalten und ihre spezifischen Indikationen ergeben.

Die Potenz eines Kontrastmittels lässt sich mithilfe der Relaxivität ($1/T$) erfassen, die definiert ist als Steigung der Relaxationsrate in Bezug auf die Konzentration des KM.

1.2.2.2. Nach der Konfiguration des Chelatkomplexes

Die Gadolinium-Chelate lassen sich untergliedern nach der Art, wie das Gadolinium-Ion gebunden ist in lineare und makrozyklische Chelate. Innerhalb der linearen Verbindungen kann unterschieden werden zwischen ionischen und nichtionischen Gd-Chelaten.

-Linear nicht-ionisch: Omniscan ®

-Linear-ionisch: Magnevist ®, Multihance ®, Primovist ®, Vasovist ®

-Zyklisch: Gadovist ®, Dotarem ®, Prohance ®

Die chemische Struktur beeinflusst die Stabilität der Bindung des Gd^{3+} -Ions.

1.2.2.3. Nach ihrem Anreicherungsverhalten und ihrer Pharmakokinetik

Nach intravenöser Bolusapplikation zeichnen sich die KM durch unterschiedliche Anreicherungsweisen im Gewebe aus.

- Extrazelluläre KM: Der Großteil der Gadolinium-Chelate wird als extrazellulär bezeichnet, da sie nicht von Zellen spezifisch aufgenommen werden.

Pharmakokinetik: Die Elimination erfolgt renal, das Gadolinium wird im Komplex gebunden glomerulär filtriert und nicht resorbiert. Beispielsweise beträgt die Plasmahalbwertszeit von Gd-DTPA bei Nierengesunden 1,5h. Entsprechend der herabgesetzten GFR besitzt das Chelat bei Niereninsuffizienten eine verlängerte Verweildauer im Körper, wodurch sich das höhere Risiko der Dissoziation erklärt. In ungebundener Form zeigen Gd-Ionen eine toxische Wirkung. Durch wiederholte Hämodialyse kann die Elimination des Chelatkomplexes beschleunigt werden.

Unter den extrazellulären KM gibt es niedermolekulare Chelate (0,5M), deren klassischer Vertreter das Gd-DTPA darstellt, und höherkonzentrierte Gd-Chelate wie z.B. Gadobutrol. Letzteres besitzt im Vergleich zu Gd-DTPA eine verbesserte Relaxivität bei geringerer Osmolalität und Viskosität.

- Hepatobiliäre KM: Vertreter dieser Substanzgruppe führen zur spezifischen Kontrastierung der Leber. Sie werden in die Hepatozyten aufgenommen, unterliegen größtenteils einer aktiven biliären Exkretion und darauffolgenden enteralen Elimination.

Primovist ® besitzt eine hepatobiliäre Metabolisierung. Das Mangan-basierende Mangafodipir (Teslascan ®) ist zugelassen zur Bildgebung von Leber und Pankreas. Gadobenat dimeglumin (Multihance ®) besitzt sowohl

Charakteristika eines extrazellulären KM als auch solche eines hepatobiliären, es findet Anwendung in der Bildgebung von Leber und ZNS.

- Retikuloendotheliale KM: Kontrastmittel auf der Basis von Eisenoxidpartikeln werden in den Zellen des retikuloendothelialen Systems von Leber und Milz angereichert. Dort führen sie durch eine Störung des lokalen Magnetfelds zur Verkürzung der T2-Relaxationszeit. Es resultiert eine Signalauslöschung, retikuloendotheliale KM gehören damit zu den negativen Signalverstärkern. Wenig ausdifferenzierte Raumforderungen der Leber enthalten in Abhängigkeit von ihrer Herkunft (lebereigener Tumor oder Metastase) wenig bis gar keine Zellen des RES und können auf diese Weise gut vom restlichen Lebergewebe abgegrenzt werden. Ferucarbotran (Resovist ®) besitzt Eigenschaften eines retikuloendothelialen KM.

- Blutpool-Kontrastmittel: Diese KM besitzen die Eigenschaft, verhältnismäßig länger im Blutkreislauf zu zirkulieren, wodurch sie sich besonders zur Gefäßkontrastierung eignen. Es handelt sich um eine heterogene Stoffgruppe. Die lange intravasale Verweildauer ist bei einigen KM zurückzuführen auf ihre reversible Bindung an Albumin, zum Beispiel im Falle von Vasovist ®, das seit 2005 in Deutschland für die MRA zugelassen ist. Gd-BOPTA (Multihance®) , das in erster Linie zu den hepatobiliären KM zählt, weist ebenfalls einen verstärkten Signaleffekt im Gefäßsystem auf, die sich durch seine schwache Proteinbindung erklärt. Vasovist ® besitzt bezüglich der Proteinbindung ähnliche Eigenschaften.

Aus einem kleinen Durchmesser der Eisenpartikel der superparamagnetischen Kontrastmittel resultiert eine verzögerte Aufnahme in die Zellen des RES und dementsprechend auch eine intravasale Kontrastierung.

1.2.3. Nebenwirkungsprofil von MR-Kontrastmitteln

Gd-Chelate gelten als sehr nebenwirkungsarme Substanzen. Für das sich am längsten auf dem Markt befindliche Gd-DTPA werden Unverträglichkeitsreaktionen in 1-2,4% der Fälle angegeben, in der Mehrzahl handelt es sich um Übelkeit und Erbrechen oder lokale Veränderungen um die Injektionsstelle ^[83]. Aber auch wenige Zwischenfälle von anaphylaktischem Schock (55 Fälle nach über 20 Mio. Anwendungen Gd-DTPA, Ergebnisse der „Postmarketing surveillance“) bis zum Tode des Patienten (9 Fälle) wurden beschrieben. Das Auftreten einer Nephrogenen Systemischen Fibrose (NSF) bei Niereninsuffizienz wird mit Ziffern zwischen 3,5% und 18% angegeben, die Schwankungen erklären sich in Abhängigkeit von der Art des eingesetzten KM, dessen Dosis und dem Grad der Niereninsuffizienz. Im Vergleich zu nichtionischem Röntgenkontrastmittel, das in der CT oder der Koronarangiographie seinen Einsatz findet, ist die Nebenwirkungsrate laut dem Japanese Committee on safety of Contrast Media um den Faktor 2-3 geringer ^[83].

1.2.4. Die drei untersuchten KM: Chemische Struktur, Indikationen, Kontraindikationen

- Magnevist®:

Bei Gd-DTPA handelt es sich um das weltweit erste zugelassene MR-Kontrastmittel, es kam 1988 auf den Markt. Es wird zur Gruppe der niedermolekularen Gd-Chelate gerechnet, die Einbindung des Gadoliniums im Komplex ist linear ionisch. Gd-DTPA besitzt die umfassendste Zulassung, welche die gesamte Körperregion und damit auch indirekt den Einsatz in der MRA einschließt. Die Substanz wird intravenös als Bolus appliziert, wobei die Dosis vom Hersteller mit <0,3mmol angegeben wird.

Nach dem Auftreten einiger Fälle von Nephrogener Systemischer Fibrose nach Anwendung von Gd-DTPA besteht eine Kontraindikation bei schwerer Niereninsuffizienz mit einer $GFR < 30\text{ml/min/1,73m}^2$.

Der Einsatz während der Schwangerschaft ist umstritten, in jedem Fall wird zu einer kritischen Nutzen-Risiko-Abwägung geraten. Da es bezüglich des Anteils, der in die Muttermilch übergeht, von Seiten des Herstellers oft keine Angaben gibt, wird eine Stillpause von 24h nach der Applikation empfohlen.

Gadopentetate (Magnevist®)
MRI Contrast Medium: Linear Complex

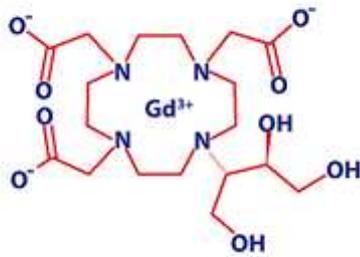


Abb. 1.1: Strukturformel Magnevist (Quelle: Bayer Schering Pharma)

- Gadovist®:

Gadobutrol als Vertreter der höher konzentrierten Gd-Chelate besitzt den Vorteil einer höheren Relaxivität bei geringerer Osmolalität und Viskosität. Durch dieses Profil ist die Substanz besonders geeignet für die MRA, ein weiteres Einsatzgebiet stellt die ZNS-Bildgebung dar. Auch die höherkonzentrierten Gd-KM können intravenös als Bolus verabreicht werden, wobei für beide oben genannten Bereiche eine Dosis von 0,3mmol angegeben wird. Die Gd-Einbindung in den Komplex ist makrozyklisch, das Gadolinium liegt im nicht-ionischen Zustand vor.

Gadobutrol (Gadovist®)
MRI Contrast Medium: Macrocyclic Complex



 Bayer HealthCare
Bayer Schering Pharma

Abb. 1.2: Strukturformel Gadovist (Quelle: Bayer Schering Pharma)

Gadobutrol ist auch bei Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion zugelassen, bei stark eingeschränkter GFR kann die Ausscheidung durch Dialyse beschleunigt werden. Es wurden bisher keine Fälle von nephrogener systemischer Fibrose nach Anwendung der Substanz beschrieben.

Zum Einsatz in der Schwangerschaft existieren von Seiten des Herstellers keine klaren Angaben, es gilt ähnliches wie bei Gd-DTPA, wobei für letzteres aufgrund der längeren Zulassung mehr Erfahrungswerte vorliegen.

Um ein Übertreten in den kindlichen Organismus zu verhindern sollte nach Anwendung bei stillenden Patientinnen eine Stillpause von 24h eingehalten werden.

Der Einsatz von Gadobutrol bei pädiatrischen Patienten ist sicher und wurde gut toleriert, abgesehen vom Körpergewicht ist keine weitere Dosisanpassung nötig ^[36].

Resovist ®:

Ferucarbotran besteht aus superparamagnetischen Eisenoxid-Partikeln, die mit Dextranen ummantelt in Suspension gehalten werden.

Da es spezifisch von Zellen des RES vor allem in der Leber (und zu kleinerem Teil auch der Milz) aufgenommen wird, eignet es sich zur Detektion und Charakterisierung hepatischer Raumforderungen. Es führt nach Kontrastmittelgabe auf T1-gewichteten Aufnahmen im normalen Leberparenchym zu einer Signalverstärkung, ein Effekt, der bei leberfremden Malignomen aufgrund ihrer Entdifferenzierung und der Abwesenheit von RES-Zellen oft ausbleibt. Im Vergleich zu seinen Vorgängern unter den SPIO bietet es die Möglichkeit der i.v. Bolus-Applikation ohne Nebenwirkungen wie kardiovaskuläre Symptome oder Rückenschmerzen hervorzurufen. Dadurch eignet es sich auch zur Aufnahme dynamischer Aufnahmeserien, die wichtige Zusatzinformationen zur Läsionscharakterisierung liefern können.

Durch den kleinen Durchmesser der Eisenoxidpartikel verlängert sich die Verweildauer im Blutkreislauf. Daraus ergibt sich, dass die Substanz gleichzeitig der Gruppe der Blutpool-KM zugerechnet werden kann ^[83], was in Zukunft zu einer Erweiterung ihres Zulassungsbereichs führen kann.

Es gelten keine Einschränkungen für die Anwendung bei Niereninsuffizienz oder Leberinsuffizienz. Es gibt keine klaren Angaben bezüglich des Einsatzes in der Schwangerschaft, nach Kontrastmittelgabe in der Stillzeit sollte einige Tage nicht gestillt werden.

1.2.5. Neue Einsatzgebiete von MR-KM

Die Stammzelltherapie ist eine Methode, von der man sich in der Zukunft eine Verbesserung der Prognose bei einer Vielzahl von Krankheitsbildern verspricht, beispielsweise bei Z.n. Myokardinfarkt. Hill et al. gelang es, durch Eisenoxid-Markierung die Migration und Implantation mesenchymaler Stammzellen im Myokard kernspintomographisch und somit noninvasiv sichtbar zu machen ^[42].

In Abhängigkeit von der Zellpopulation lassen sich durch Inkubation mit Eisenoxid und verschiedenen Transfecting agents beispielsweise das

Migrationsverhalten von Tumorzellen im Organismus erfassen oder die Neovaskularisation eines Malignoms darstellen ^[5, 29, 79].

Zum aktuellen Zeitpunkt kommt das Zell-Labeling in experimentellen Settings zum Einsatz, es verspricht aber ein wichtiges diagnostisches und therapeutisches Instrument bei klinischen Fragestellungen zu werden.

1.3. Evidenz bezüglich Toxizität

1.3.1. Toxizität in vitro

Es liegen Hinweise für die Toxizität Gadolinium-haltiger Kontrastmittel auf renale Tubuluszellen und Chondrozyten vor ^[34, 40].

1.3.2. Nephrogene systemische Fibrose

Bei der Nephrogenen Systemischen Fibrose (NSF) handelt es sich um ein Krankheitsbild, das erstmals im Jahr 2000 bei Dialysepatienten, damals noch unter dem Namen der Nephrogenen Fibrosierenden Dermopathie (NFD) beschrieben wurde. Es ist gekennzeichnet durch das Auftreten subkutaner symmetrischer Plaques besonders an Beinen, Unterarmen und am Stamm mit Aussparung des Gesichts, das von Schmerzen und Pruritus begleitet sein kann und differentialdiagnostisch an Skleromyxödem oder Systemische Sklerose denken lässt. Im weiteren Verlauf kommt es zu Hyperpigmentierung und Hautindurationen, die Ausbildung von bewegungseinschränkenden Kontrakturen ist möglich. Die Mortalität der NSF beträgt 5%, bei 30% der Betroffenen führt die Krankheit zu schwerer Behinderung in Form von Kontrakturen und Hautulzerationen ^[64]. Die Bezeichnung „systemisch“ bezieht sich darauf, das entgegen anfänglicher Annahmen auch weitere Organsysteme

wie Herz, Lunge oder Skelettmuskulatur am Fibroseprozess beteiligt sein können, wie sich erst in Autopsien Betroffener zeigte ^[20, 33, 68, 102].

Die Anwendung von Gd-Chelaten als auslösendes Agens wurde 2006 in zwei Publikationen postuliert ^[35, 60], in beiden Studien waren Symptome nach Gabe von Gadodiamid (Omniscan ®) aufgetreten. Bei einer Kontrastmittelart, die bis zu diesem Zeitpunkt als vergleichsweise unbedenklich galt, lösten die Veröffentlichungen ein Aufhorchen in der Fachwelt aus. Mittlerweile gelten ca. 250 Fälle von NSF als gesichert ^[64], von denen 177 mit der Gabe von Gadodiamid (Omniscan ®) und 78 mit der Gabe von Gadopentetat-Dimeglumine (Magnevist ®) assoziiert wurden. Somit ist der kausale Zusammenhang hochwahrscheinlich, wobei die pathophysiologischen Einzelschritte weiterhin Fragen aufwerfen.

Die Tatsache, dass man freies Gd^{3+} in Hautbiopsien von NSF-Patienten nachwies ^[1], beweist, dass zuvor eine Freisetzung von Gadolinium aus dem Chelatkomplex stattgefunden hat. Dieser als in vivo-Transmetallierung bezeichnete Prozess ist dadurch gekennzeichnet, dass endogene Metalle wie Cu und Zn mit dem Gd^{3+} um die Bindung konkurrieren. Das dabei entstehende freie Gadolinium ist toxisch und kann sich in Knochen und Geweben ablagern. Die Wahrscheinlichkeit der Gd-Dissoziation erhöht sich bei verlängerter KM-Halbwertszeit, wie es bei herabgesetzter GFR der Fall ist. Sie ist abhängig von der individuellen Stabilität des Chelatkomplexes. Aufgrund der unterschiedlichen Marktanteile ist das individuelle NSF-Risiko eines Kontrastmittels schwer zu bewerten. Quellen bestätigen, dass die Assoziation von NSF mit Gadodiamid auch in Anbetracht des breiten Einsatzes überproportional hoch ist ^[50].

Als besonders brisant stellt sich das Krankheitsbild dar, da zu den Betroffenen nicht nur chronisch niereninsuffiziente Patienten zählen (i.d.R mit $eGFR < 30\text{ml/min/1,73m}^2$) sondern auch Personen, die zum Zeitpunkt der KM-Applikation an akutem Nierenversagen litten.

Die Diagnosestellung basiert auf dem klinischen Erscheinungsbild, der Exposition gegenüber MR-Kontrastmitteln sowie der histologischen Sicherung.

Reaktionen auf die NSF-Fälle von Seiten nationaler und internationaler Pharmakovigilanz-Zentren blieben nicht aus. Die amerikanische FDA versah im Mai 2007 alle auf dem Markt befindlichen Gd-Chelate mit einem „Black Box Warning“, also einer Empfehlung diese Substanzgruppe nicht einzusetzen bei Patienten mit einer $GFR < 30 \text{ ml/min/1,73m}^2$. Ausgeweitet wurde die Einschränkung auf Patienten mit Z.n.Lebertransplantation und solche mit hepatorenalem Syndrom .

Der Ausschuss für Humanarzneimittel (CHMP) der europäischen Arzneimittelbehörde (EMA) leitete 2009 ein Risikobewertungsverfahren der Gadolinium-haltigen Kontrastmittel ein. Bei der Risikostratifizierung wurden sowohl das NSF-Risiko als auch thermodynamische und kinetische Eigenschaften des jeweiligen Kontrastmittels berücksichtigt. Zur Hochrisikogruppe gehören Omniscan ®, Magnevist ® und OptiMARK ®, die Gruppe mit mittlerem Risiko bilden Vasovist ®, Primovist ® und MultiHance ®, das geringste Risiko besteht bei Gadovist ®, ProHance ® und Dotarem ®. Es wird eine Bestimmung der eGFR vor der Gd-KM-Anwendung empfohlen, vor allem bei Patienten die älter als 65 Jahre sind. Bei einer Clearance $< 30 \text{ ml/min/1,73m}^2$ sind Chelate der Hochrisikogruppe kontraindiziert, für die anderen beiden Gruppen wurden Warnhinweise verhängt. Ist der Einsatz erforderlich, muss die Dosis auf ein Minimum beschränkt werden und ein Intervall von mindestens 7 Tagen bis zur nächsten KM-Gabe eingehalten werden. Eine Dokumentation von KM-Name und Dosis soll der besseren Rückverfolgung dienen. Die Arzneimittelhersteller verpflichten sich, die Warnhinweise in ihre Produktinformation aufzunehmen und weitere Studien zur Gadolinium-Retention in menschlichem Gewebe durchzuführen ^[12].

Da die angewandten therapeutischen Maßnahmen (u.a. Extrakorporale Photopherese, Plasmapherese, Gabe von IFN- α , Cyclophosphamid oder Prednisolon) nur in Einzelfällen eine Wirksamkeit zeigten, stellt die Verbesserung der Nierenfunktion den einzigen gesicherten therapeutischen

Ansatz dar. Bei Patienten, bei denen die NSF im Rahmen eines akuten Nierenversagens aufgetreten war, und im Falle einer Nierentransplantation zeigten sich die kutanen Läsionen bei Wiedererlangen der Nierenfunktion als reversibel.

Zur Prävention weiterer NSF-Fälle eignen sich Fragebögen zum Screening auf eine vorbestehende Niereninsuffizienz und eine Kalkulation der GFR mithilfe der Cockcroft-Gault- oder der MDRD-Formel bei Verdacht auf eine Niereninsuffizienz. In Fällen, bei denen trotz stark eingeschränkter Nierenfunktion nicht auf eine Gd-KM-Gabe verzichtet werden kann, sollte auf makrozyklische Verbindungen als thermodynamisch stabilste Vertreter zurückgegriffen werden und auf Gd-Chelate, bei denen Zwischenfälle bisher ausgeblieben sind (Vasovist ®, Gadovist ®, Primovist ®, Multihance ®) ^[64]. Eine Dosisabhängigkeit von Auftreten und Ausprägung der NSF konnten verschiedentlich nachgewiesen werden ^[10, 89], weshalb die geringstmögliche KM-Konzentration empfohlen wird. Ein guter Bildkontrast lässt sich auch erreichen durch die Verwendung hochsensibler Empfangsspulen und das Einwirken eines höheren statischen Magnetfelds (3T).

Auch wenn eine Dialyse das Auftreten einer NSF nicht verhindern kann, ist ihre Durchführung sinnvoll, um die Kontrastmittel-Halbwertszeit in vivo zu verringern und so das Risiko einer Transmetallierung möglichst niedrig zu halten.

1.3.3. Gabe von MR-KM in der Schwangerschaft und Toxizität für den Feten

Der Einsatz von Kontrastmitteln für die Magnetresonanztomographie in der Schwangerschaft ist ein Thema, das der kritischen Betrachtung bedarf.

Erfahrungen auf tierexperimenteller Ebene gelangen zu gegensätzlichen Ergebnissen. In der Mehrzahl der Untersuchungen lassen sich weder

teratogene noch mutagene Einflüsse der Gadolinium-Derivate bestätigen, postpartale Wachstumsdefizite wurden ebenfalls nicht dokumentiert [87, 96, 115]. Novak dagegen weist aufgrund der Chelat-Anreicherung in fetalen Nieren darauf hin, dass eine Nephrotoxizität nicht ausgeschlossen werden kann [70]. Dies gilt insbesondere aufgrund der wenig erforschten Pharmakokinetik im fetalen Organismus. Eine orale Resorption nach Exkretion über die fetalen Nieren ist denkbar. Zusammen mit der unbekanntem Verweildauer im Fruchtwasser macht dies eine deutlich verlängerte Halbwertszeit im Vergleich zum erwachsenen Organismus wahrscheinlich. In einer Studie ergaben sich neben intrauteriner Wachstumsbeeinträchtigung auch ein vermehrtes Auftreten von Spontanaborten und kongenitalen Malformationen [73]. Darüber hinaus ist denkbar, dass fetale Zellen gegenüber Toxizität grundsätzlich eine höhere Empfindlichkeit besitzen.

Beim Einsatz von MR-Kontrastmitteln aus medizinischer Indikation in der menschlichen Schwangerschaft traten bislang keine Komplikationen für den Feten oder kongenitale Malformationen auf [22, 61, 100]. Aufgrund der sehr geringen Fallzahlen berechtigt dies allerdings nicht zu der Schlussfolgerung, dass eine fetale Toxizität ausgeschlossen ist.

Wie auch der Sonographie kommt der Magnetresonanztomographie für die Bildgebung in der Schwangerschaft eine Rolle zu. Wird der Verdacht auf eine fetale Malformation im Ultraschall geäußert, so ist die MRT geeignet, diesen zu verifizieren. Bei der Diagnose intrakranieller Fehlbildungen ist sie der Sonographie deutlich überlegen [95]. Schwangerschaftskomplikationen, die diagnostische Einordnung eines akuten Abdomens, der Verdacht auf ein thrombembolisches Geschehen oder onkologische Fragestellungen können den Einsatz der Kernspintomographie aus mütterlicher Indikation rechtfertigen. Die Entscheidung für eine Kontrastmittelgabe muss von Fall zu Fall getroffen werden und erfordert das schriftliche Einverständnis der Patientin, da eine Unbedenklichkeit für den Feten weiterhin nicht garantiert werden kann.

1.4. Fragestellung der Dissertation

Da humantoxikologische Studien in der SS ethisch nicht vertretbar sind und die aufgetretenen NSF-Fälle bezüglich des Nebenwirkungsprofils von Gd-KM neue Fragen aufgeworfen haben, erscheint es notwendig, eine systematische Untersuchung der in vitro-Toxizität mit Bezug auf die Schwangerschaft durchzuführen. Humane embryonale Lungenfibroblasten und Nabelschnur-Endothelzellen wurden zu diesem Zweck mit den Kontrastmitteln Gadovist®, Magnevist® und Resovist® inkubiert und in der Folge der Einfluss auf Wachstumsverhalten, klonogene Aktivität, Zellzyklus, Apoptose und Zytomorphologie beurteilt. Die Fragen, die es zu beantworten gilt, lauten:

- Besteht eine Toxizität bei einem spezifischem KM?
- Lässt sich ein Grenzwert der KM-Konzentration erkennen, ab dem eine Toxizität besteht oder verhält sich die Zellzahl umgekehrt proportional zur KM-Konzentration?
- Besteht die Toxizität in Abhängigkeit von der Dauer der Inkubation mit dem KM? Vergleich zwischen 4h- und 24h-Expositionsdauer.

2. Material und Methodik

2.1. Materialien

2.1.1. Zellen

Humane embryonale Lungenfibroblasten (HEL):

Die Untersuchungen wurden an humanen embryonalen Lungenfibroblasten HEL 299 (CCL-137, ATCC, Manassas, VA, USA) durchgeführt, diese liegen kryokonserviert vor. Alle Experimente fanden an Zellen der Passage 11 und 12 statt.

Nabelschnur-Endothelzellen (HUVEC):

Bei der zweiten Zellpopulation handelte es sich um Nabelschnur-Endothelzellen (Promocell, Heidelberg, Germany) , für die Untersuchungen wurden Zellen der Passage 7 verwendet.

2.1.2. MR-Kontrastmittel

In den Versuchsreihen wurde die Wirkung von 3 verschiedenen gängigen Kontrastmitteln untersucht:

- Gadovist® (Gadobutrol, Bayer Schering AG, Berlin, Germany)
- Magnevist® (Gadopentetate-Dimeglumine, Bayer Schering AG, Berlin, Germany)
- Resovist® (Ferucarbotran, Bayer Schering AG, Berlin, Germany)

Dabei handelt es sich bei Gadovist und Magnevist um Gadolinium-Derivate und bei Resovist um ein KM auf der Basis von Eisen.

Die verwendeten Konzentrationen wurden ermittelt, indem man von einem menschlichen Modell mit 70 kg Körpergewicht und 5l zirkulierendem Blut ausgeht, daraus ergibt sich die einfache Konzentration (1x). Entsprechend wurde verfahren mit der 5-fachen, 10-fachen und 20-fachen Konzentration, der der Organismus ausgesetzt wäre. Die molare Konzentration ist durch den Hersteller angegeben.

	1x	5x	10x	20x
Gadovist: 1,0M →0,1mM/kg KG	7µl	35µl	70µl	140µl
Magnevist: 0,5M →0,1mM/kg KG	14µl	70µl	140µl	280µl
Resovist: Fe →1,4ml/ >60kg KG [2,8mg] = 0,5M Fe/ml Blut	14µl	70µl	140µl	280µl

Tabelle 2.1: Schema für die Kalkulation der Kontrastmitteldosis

Um die Wirkung eines KM in Abhängigkeit von der Expositionsdauer zu berücksichtigen, wurden bei jeder KM-Konzentration ein Zellpool mit 4h-Exposition und einer mit 24h-Exposition angesetzt.

2.1.3. Kulturmedium

Das Kulturmedium für die HEL bestand aus DMEM (Invitrogen, Karlsruhe, Germany), dem bei Ansätzen für PK 10% und bei solchen für KoBi 20% fetales Kalbsserum (FCS, PAA, Cölbe, Germany) hinzugefügt wurde. Das fetale Kalbsserum dient der Bereitstellung von wachstumsfördernden Faktoren, Nährstoffen und Vitaminen.

Das Medium für die Kultivierung der HUVEC enthielt 64% HAM's F-12 (Invitrogen, Karlsruhe, Germany), 16% DMEM (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) und 20% FCS (PAA, Cölbe, Germany). Desweiteren wurden pro ml Medium 30µg ECGS (Endothelial cell growth supplement, Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) und 50 µg Heparin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) hinzugefügt.

Zusätzlich enthielten beide Medien Penicillin/Streptomycin (Biochrom, Berlin, Germany) in den üblichen Dosen: 100IU Penicillin/ ml Medium und 100 µg Streptomycin/ ml Medium.

2.1.4. PBS

PBS (Phosphate buffered Saline) (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) dient dem Auswaschen von in der Zellsuspension befindlichen abgestorbenen Zellen und zellulären Abfallprodukten ehe der Zellrasen von den Kulturgefäßen abgelöst wird. Desweiteren wird durch das Waschen der Zellen verhindert, dass Reste des Kulturmediums das Trypsin inaktivieren.

2.1.5. Trypsin

Humane Lungenfibroblasten und Nabelschnur-Endothelzellen wachsen adhärent am Boden der 25 cm² Zellkulturgefäße (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) und müssen daher zur Passagierung und Aussaat für die Versuche mithilfe des Enzyms Trypsin (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) vom Boden der Fläschchen abgelöst werden. Ebenso werden durch Trypsin die Zell-Zell-Kontakte gelöst und es entsteht eine Einzelzellsuspension.

2.2. Methoden

2.2.1. Messungen zu Wachstumsverhalten und klonogener Aktivität

2.2.1.1. Zellkultur

Sämtliche Arbeitsschritte der Zellkultur fanden unter einer Laminar-flow-Sterilbank statt, die vor und nach Benutzung 30 Minuten mit UV-Licht bestrahlt wurde und deren Oberflächen mit 70% Ethanol gereinigt wurden. An Tag 1 nach Auftauen der kryokonservierten Zellen fand ein Medienwechsel und eine Bestimmung der Anwachsrate statt, wobei nur Kulturen mit einer Anwachsrate von $\geq 90\%$ ausgewählt wurden. Der zweite Medienwechsel erfolgte an Tag 4, das Passagieren der Zellen an Tag 7. Hierzu wurde zunächst das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen, um zu verhindern, dass im Medium befindliche Faktoren das Trypsin inaktivieren. Nach Hinzugabe von 1ml Trypsin wurden die Kulturflaschen 2-5 Minuten je nach Zelldichte im Brutschrank inkubiert und der schwimmende Zustand der Zellen unter dem Lichtmikroskop (Zeiss, Göttingen, Germany) kontrolliert. Der Zellrasen wurde daraufhin in 5ml Kulturmedium resuspendiert, aus der Suspension wurden kleine Proben (100 μ l) entnommen und deren Zellzahl unter Zuhilfenahme eines elektronischen Zellzählers (CASY[®]2 Cell Counter and Analyser System, Model TT, Roche AG, Switzerland) gemessen .

Der Zellzähler bestimmt desweiteren Viabilität, durchschnittlichen Durchmesser und der Aggregationsgrad der Zellen.

Für die Passage wurden 200.000 Zellen suspendiert in 5ml Medium in 25cm² Kulturflaschen ausgesät.

Besonderheiten bei HUVEC:

Da sich in den zuvor durchgeführten Untersuchungen mit den HEL nur eine Wachstumsbeeinträchtigung bei höheren KM-Konzentrationen zeigte und die Kultivierung der HUVEC einen höheren finanziellen Aufwand bedeutet, wurden bei den Nabelschnur-Endothelzellen lediglich die 24h-Exposition mit 10- und 20-facher Konzentration im Vergleich zur Kontrolle betrachtet.

Proliferationskinetik und Koloniebildungs-Assay erfordern den Gebrauch von Kollagen-I-beschichteten Kulturflaschen bzw. 6-Well-Platten (beides Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg, Germany).

2.2.1.2. Proliferationskinetik (PK)

In der Proliferationskinetik wird das Wachstumsverhalten (Wachstumsgeschwindigkeit, höchste Zellzahl und Tag, an dem sie erreicht wurde) der mit den KM inkubierten Zellpopulation im Vergleich zu einer nur mit Nährmedium inkubierten Kontrolle erfasst.

Nach Auftauen und Passagieren wurden die Zellen bei beginnender Konfluenz für 4 bzw. 24h mit dem entsprechenden Kontrastmittel inkubiert. Nach Beendigung der Expositionsdauer fand ein Medienwechsel statt. Es folgte die Aussaat der Zellen in 25cm² Kulturflaschen à 30.000 Zellen. Im Folgenden bezieht sich d0 auf den Tag der Aussaat mit den Kontrastmitteln, d4 auf die Zellzahl am 4.Tag nach Aussaat etc. Am Tag der jeweiligen Zellzahl-Bestimmung, also an d4, d7, d11, d14, d18, d21, für die HEL und d3, d7, d10, d14, d17 für die HUVEC wurde pro Bedingung eine Kulturflasche entnommen, mit PBS gewaschen und daraufhin vom Flaschenboden abtrypsiniert. Bei allen anderen Kulturflaschen wurde an jedem Stopp-Tag ein Medienwechsel durchgeführt. Aus dem mit 5ml Medium resuspendierten Flascheninhalt (Gesamtmenge 6ml = 1ml Trypsin + 5ml Medium) wurde 1ml entnommen und daraus Zellzahl, Viabilität, durchschnittlicher Durchmesser und Aggregationsgrad bestimmt. Die gemessene Zellzahl wurde zum Erhalt der Gesamtzellzahl mit 6 multipliziert.

Aus der Zusammenschau der über die Zeit bestimmten Zellzahlen ergibt sich für jede Bedingung eine Wachstumskurve.

Die Anzahl der Versuchsdurchläufe betrug $n=3$

2.2.1.3. Koloniebildungs-Assay (KoBi)

Im Kolonie-Bildungs-Assay wird die klonogene Aktivität einer Zellpopulation erfasst. Als Kolonie wird bezeichnet, wenn aus einer der 500 pro Well ausgesäten Zellen ein Konglomerat von mindestens 50 Zellen hervorgeht. Die Auszählung erfolgt nach Fixierung und Färbung unter dem Lichtmikroskop. Hierbei ist hervorzuheben, dass diese Methode, was das Widerspiegeln einer Schädigung durch äußere toxische Einflüsse betrifft, als sensibler gilt als die zuvor beschriebene Proliferationskinetik.

Für den Koloniebildungs-Assay erfolgte die Aussaat der Zellen mit 20% FCS-Zusatz zum Medium aus mehreren Gründen: es wurde hier zum späteren Zeitpunkt kein Medienwechsel mehr durchgeführt und die Zellen des KoBi durchlaufen mehr Teilungsschritte als die der PK.

Nach Ende der Inkubation mit dem Kontrastmittel wurden die Zellen abtrypsiniert und entsprechend der Zellzahlbestimmung pro Well je 500 Zellen in 2ml Nährmedium in 6-Well-Platten (Multiwell TM, FALCON, Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) ausgesät. Pro Bedingung und Versuchsdurchlauf wurden dabei zwei 6-Well-Platten (entspricht 12 Wells) angelegt, die zunächst für 10 Tage im Brutschrank inkubiert wurden. In der Folge wurden die Zellen nach Waschen mit PBS für 10 Minuten mit 3,7% Formaldehydlösung und daraufhin für weitere 10 Minuten mit 70% Ethanol fixiert. Zum Sichtbarmachen der Kolonien wurden sie zuletzt mit Coomassie-Blau gefärbt.

Die Anzahl der gebildeten Kolonien wurde unter dem Lichtmikroskop (Zeiss, Göttingen, Germany) ausgezählt.

Die Anzahl der Versuchsdurchläufe betrug $n=3$.

2.2.2. Durchflusszytometrie

2.2.2.1. Zellzyklus einer Säugetierzelle

Die Zeitspanne zwischen zwei Zellteilungen, die von Gewebe zu Gewebe stark variiert, wird als Zellzykluszeit bezeichnet. Im Durchschnitt durchläuft eine Säugetierzelle den Zellzyklus in etwa 22 Stunden. Von dieser Dauer befindet sich die Zelle nur 10% der Zeit in der Mitosephase (M-Phase), die restlichen 90% fallen auf die Intermitosephasen, also G₁-Phase, S-Phase und G₂-Phase.

In der G₁-Phase (G=gap, Lücke) erfüllt die Zelle ihre für sie charakteristischen Funktionen. Es erfolgt hier die Enzymsynthese für die bevorstehende S-Phase, weswegen man auch von präsynthetischem Intervall spricht. Ausdifferenzierte Zellen können in einen Zustand der Teilungsrue übergehen, die als G₀-Phase bezeichnet wird.

Sind die notwendigen Arbeitsschritte der G₁-Phase durchlaufen und an Kontrollpunkten bestätigt, folgt der Übergang in die S-Phase (S=Synthese). Der DNA-Doppelstrang wird enzymatisch aufgespalten und die DNA repliziert. Es resultiert daraus die Entstehung von zwei Schwesterchromatiden.

Als nächsten Schritt gelangt die Zelle in die G₂-Phase. Das Produkt der Replikation durchläuft Kontroll- und Reparaturvorgänge, um zu verhindern, dass fehlerhaft repliziertes Erbmateriale an Tochterzellen weitergegeben wird. Auch findet die Synthese von Proteinen und RNA für die bevorstehende Zellteilung statt.

Nach Beenden der Kontrollvorgänge werden Enzyme phosphoryliert, die das Signal geben zum Eintritt in die M-Phase (M=Mitose). In Vorbereitung auf die Zellteilung kondensieren die Chromosomen und reihen sich entlang der

Äquatorialebene auf. Es erfolgt die Spaltung in 2 Tochterzellen, von denen jede einen diploiden Ein-Chromatid-Chromosomensatz besitzt.

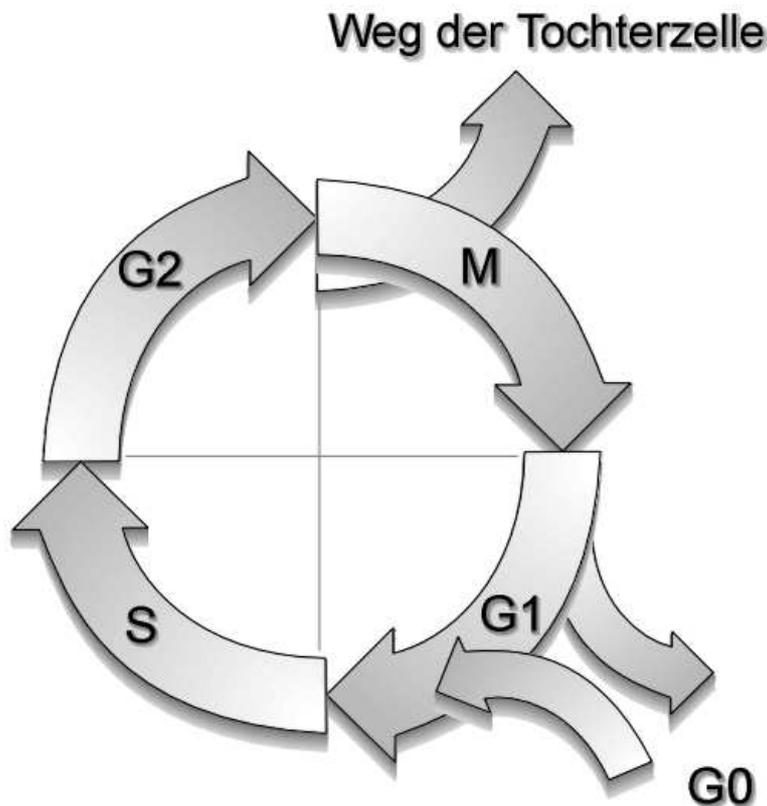


Abb. 2.1: Zellzyklus einer Säugetierzelle

2.2.2.2. Prinzip der Durchflusszytometrie

Die bereits 1975 von Crissman et al. beschriebene Methode dient dem Zweck, Säugetierzellen entsprechend ihrer spezifischen physikalischen oder chemischen Charakteristika aufzutrennen und so quantitativ messbar zu machen ^[18]. Zellen in Suspension werden entlang einer Kapillare einzeln an einer Lichtquelle vorbeigeleitet. Durch die Lichtquelle werden innerhalb der Zellen chemische Verbindungen angeregt selbst Licht einer bestimmten Wellenlänge zu emittieren, was als Prinzip der Fluoreszenz bezeichnet wird. Das Fluoreszenzlicht wird über Bandenfilter entsprechend seiner Wellenlänge aufgetrennt und von verschiedenen Photodetektoren gemessen. Entsprechend der zuvor fluoreszenzmarkierten zellulären Anteile ergeben sich quantitative

und qualitative Aussagen zur untersuchten Zellzusammensetzung, z.B. was den DNA-Gehalt betrifft.

2.2.2.3. Grundlagen der Färbung

Propidiumiodid (PI) interkaliert unspezifisch mit der DNA und ist daher ein Marker für den Gesamtgehalt an zellulärer DNA. Es ist charakterisiert durch eine rote Fluoreszenz der Wellenlänge $578/\pm 30\text{nm}$, welche über Bandenfilter gesammelt wird.

BrdU (Bromodesoxyuridin) ist ein Thymidin-Analogon, das den Gehalt an neusynthetisierter DNA widerspiegelt. Im Versuch wurde BrdU mit FITC markiert, einer Verbindung, die nach Anregung Licht der Wellenlänge $530/\pm 30\text{nm}$ emittiert.

2.2.2.4. Versuchsdurchführung

Die Zellanteile in den einzelnen Zyklusphasen wurden bei Inkubation mit der 20-fachen KM-Konzentration zu zwei Zeitpunkten bestimmt :

- direkt nach Ende der KM-Exposition
- 24h nach Ende der KM-Exposition.

Tag der Vorbereitung: Die Fibroblasten wurden für eine Stunde mit 20mM BrdU-Lösung im Medium im Brutschrank inkubiert. Der Überstand wurde abpipettiert und die Zellen abtrypsiniert. Es folgten zwei Waschschrte mit 2ml PBS. Die HEL wurden mit je 250 μl 70% Ethanol resuspendiert und bis zum Tag der Messung bei -20°C gelagert.

Tag der Durchflusszytometrie: Die Zellen wurden mit 3ml PBS resuspendiert und in Messröhrchen überführt, daraufhin zentrifugiert und dekantiert. Der Inkubation mit 0,5ml RNase (0,1mg/ml) für 10 Minuten im Wasserbad folgte erneutes Waschen und Zentrifugieren. Durch die RNase wird möglicherweise

vorhandene doppelsträngige RNA zerstört, da diese sich sonst auch durch PI anfärben ließe und das Ergebnis der Messung verfälschen würde. Der Überstand wurde verworfen und dem Zellpellet je 1ml Pepsin beigefügt, das 10 Minuten im Wasserbad seine Wirkung entfaltet. Durch das Pepsin werden die Zellkerne isoliert, was die Messung verfeinert. Die enzymatische Verdauung wurde angehalten, indem die Zellen 5 Minuten auf Eis gelagert wurden. Dem Waschen, Zentrifugieren und Dekantieren folgte die Inkubation mit je 1ml 2M HCl für 10 Minuten bei Raumtemperatur, welches die DNA denaturiert und das BrdU zugänglich macht für die AK-Färbung. Überschüssiges HCl wurde durch zweimaliges Waschen entfernt. Als nächstes wurden die Fibroblasten mit der anti-BrdU Maus- Antikörper-Lösung (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) à 200µl inkubiert, dies erfolgte bei Raumtemperatur und unter Lichtabschluss für 30 Minuten. Als Negativkontrolle erfolgte die Markierung mit einem unspezifischen Antikörper. Im folgenden Schritt wurden 200µl des sekundären Antikörpers hinzugegeben, ein monoklonaler Kaninchen-AntiMaus-IgG-Antikörper (Fa. DAKO, Hamburg, Germany), der mit FITC (Fluorescein Isothiozyanat) markiert war. Daraufhin wurden die Zellen mit je 500µl Propidiumiodid (PI) inkubiert, zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Zuletzt wurde Propidiumiodid-RNase für 30 Minuten bei 4°C unter Lichtabschluss einwirken gelassen. Die Zellzyklusanalyse erfolgte am Durchflusszytometer (FACSort, Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA) unter Zuhilfenahme der Cell Quest Pro Computersoftware (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany). Es wurden 10.000 Kerne pro Bedingung ausgewertet.

Die Anzahl der Versuchsdurchläufe betrug n=3.

2.2.2.5. Mitochondriales Transmembranpotential

Die Messung der Veränderung des mitochondrialen Transmembranpotentials ($\Delta\Psi_m$) erlaubt eine Aussage über den Anteil der apoptotischen Zellen nach Inkubation mit den Kontrastmitteln. Bei vitalen Zellen ist die Atmungskette aktiv, das Membranpotential intakt und der applizierte Farbstoff TMRE wird zum

fluoreszieren angeregt. Im Falle von apoptotischen Zellen oder Inkubation mit CCCP bricht das Transmembranpotential zusammen und die Zellen „strahlen“ nicht mehr.

Die Messungen wurden mit HEL nach 24-stündiger KM-Exposition mit der 20-fachen Konzentration durchgeführt.

Procedere: Nach Beendigung der KM-Inkubation erfolgte das Ablösen der Zellen von den Zellkulturflaschen und die Zellzahlbestimmung mittels CASY, wobei pro Bedingung 500.000 Zellen vorgelegt wurden. Die HEL wurden zunächst zweimal mit je 2ml PBS gewaschen, dann zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Es schloss sich eine Inkubation mit 300 µl 25nM TMRE-Suspension (tetramethylrhodamin ethyl ester; Invitrogen) für 30 Minuten im Brutschrank an. Als Positivkontrolle wurde einer Probe zusätzlich 1µl Carbonyl-Cyanid-3-chlorophenylhydrazon (CCCP; Sigma, St. Louis, MO, USA) zugegeben, das zu einem Zusammenbruch des Transmembranpotentials und damit zu fehlender Fluoreszenz führt. Darauf folgte erneutes zweimaliges Waschen. Die HEL wurden in 500µl PBS resuspendiert. Die Messung des mitochondrialen Transmembranpotentials fand am FACSort Durchflusszytometer (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) mithilfe der Cell Quest Pro Software (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) statt. Es wurden 10^4 Ereignisse ausgezählt.

Die Anzahl der Versuchsdurchläufe betrug n=3.

2.2.3. Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Die Immunfluoreszenz-Mikroskopie dient dem Erfassen von zytoskelettalen Veränderungen nach Exposition gegenüber den Kontrastmitteln. Zu diesem Zweck wurde die maximale 20-fache KM-Konzentration gewählt.

Procedere: Die HEL wurden auf 4-Kammer-Objektträgern (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) aufgebracht, dabei wurden pro Kammer 5.000 Zellen

ausgesät. Bei Subkonfluenz erfolgte die Beladung mit den Kontrastmitteln und Inkubation für 24h. Die Zellen wurden danach zwei Mal mit PBS gewaschen, es schloss sich das Fixieren durch Hinzugabe von reinem Methanol bei -20°C für 10 Minuten an. Die HEL wurden erneut zweimalig gewaschen. Als nächstes wurde der erste Antikörper aufgetragen und für 30 Minuten im Brutschrank inkubiert, hierbei handelte es sich um einen murinen Anti-Vimentin-AK (DAKO; Hamburg, Germany) à 8µl auf 300µl PBS pro Kammer. Die nicht gebundenen AK-Anteile wurden durch zweimaliges Waschen entfernt. Danach erfolgte die Markierung mit dem sekundären Fluoreszenz-emittierenden anti-Maus-Antikörper (Alexa Fluor 488, Invitrogen, Karlsruhe, Germany), der ebenfalls 30-minütig inkubiert und danach ausgewaschen wurde. Um die Zellkerne darzustellen wurden die Zellen weitere 15 Minuten mit einer 4,6-Diamino-2-Phenylindol-Dihydrochlorid-Lösung (DAPI, Serva, Heidelberg, Germany) in Methanol inkubiert. DAPI ist ein in die DNA interkalierendes Agens, das unter dem Fluoreszenz-Mikroskop sichtbar gemacht wird. Die HEL wurden zuletzt in Mounting Medium eingebettet und konnten nun fluoreszenzmikroskopisch bezüglich Veränderungen der Zellmorphologie beurteilt werden.

2.3. Statistik

Zur statistischen Auswertung der erhobenen Daten verwendeten wir T-Test und Varianzanalyse. Von statistisch signifikanten Abweichungen wurde ausgegangen ab einem Wert von $p < 0,05$. Bei statistisch signifikanten Abweichungen sind die Messwerte entsprechend gekennzeichnet.

Proliferationskinetik:

Die sich ergebende Wachstumskurve lässt sich durch ein mathematisches Modell erfassen:

$$y = c_0 + \frac{c_1 - c_0}{1 + (T/t)^e}$$

Es ermöglicht das Errechnen von Zellzahlen für Zeitpunkte, die zwischen den Messungen liegen. c_1 bezieht sich auf den Ort der Plateaubildung, die Variable T bezeichnet den Wendepunkt der Kurve. e ist für alle Versuche proportional zur Steigung der Kurve im Wendepunkt.

3. Ergebnisse

Die Ergebnisse von Proliferationskinetik, Koloniebildungsassay und Zellzyklusanalyse werden tabellarisch und graphisch dargestellt, bei Vorliegen von statistisch signifikanten Abweichung sind diese entsprechend gekennzeichnet.

Bei der Messung des Transmembranpotentials und der Immunfluoreszenz-Mikroskopie handelt es sich um Methoden, die eine qualitative Aussage erlauben. Daher erfolgt die Analyse der gewonnenen Daten hier rein deskriptiv.

3.1. Proliferationskinetik

In der PK werden Veränderungen der Zellzahl über einen Beobachtungszeitraum von 21 (HEL) bzw. 17 (HUVEC) Tagen erfasst. So kann im Fall einer antiproliferativen Wirkung durch eine Noxe auch bestimmt werden, ob es sich um einen reversiblen oder irreversiblen Effekt handelt. Es wurde das Wachstumsverhalten von zwei Zelllinien (HEL und HUVEC) in Abhängigkeit von Art des KM, Konzentration des KM und Dauer der Exposition untersucht.

3.1.1. Beschreibung des Kurvenverlaufs

Die sich aus den Zellzahlbestimmungen ergebende Wachstumskurve einer Zellpopulation kann in charakteristische Anteile untergliedert werden. Diese Phasen spiegeln die vorherrschenden Bedingungen in der Zellkultur wider. An eine anfängliche Anpassungs-oder Latenzphase nach Aussaat schließt sich die exponentielle Phase an, während der in der Kultur optimale Wachstumsbedingungen herrschen: ausreichendes Angebot an Nährstoffen und genügend Platz. Es kommt zum Erreichen eines Plateaus, welches

gekennzeichnet ist durch Konfluenz der Zellen. Es stellt sich ein Gleichgewicht ein zwischen Zellzuwachs und –verlust ^[31].

Die Dauer und der Verlauf der einzelnen Phasen kann zwischen den Zelllinien variieren.

Abweichungen vom Kurvenverlauf der Kontrolle durch die Kontrastmittelwirkung können auftreten in Form von Veränderungen

- der Steigung
- der Höhe der maximal erreichten Zellzahl
- des Zeitpunktes , an dem diese erreicht wird
- des weiteren Kurvenverlaufs: Plateauphase, steiler Abfall

3.1.2. HEL

Nach Aussaat von je 30.000 Lungenfibroblasten an Tag 0 erfolgt im Abstand von 3-4Tagen für jede Bedingung die Bestimmung von Zellzahl und Viabilität.

3.1.2.1. Zellzahl

a) 4h-Werte

Der Anstieg der Zellzahl verläuft initial langsam, ohne dass Unterschiede zwischen der Kontrolle und den KM-Gruppen auftreten (Tag 4 Kontrolle 361.000, SD 42.790, KM zwischen 290.000, SD 20664 - Resovist 20x und 389.000, SD 41.356 - Resovist 1x). Es folgt ein steil ansteigender Kurvenanteil ab Tag 4, bei dem sich keine der Einzelkurven von denen der anderen Bedingungen abgrenzt. Der Peak wird an Tag 11 erreicht, die höchste Zellzahl liegt in der Kontrollgruppe bei 6.345.667, SD 510.522 und bei Inkubation mit den Kontrastmitteln zwischen 5.795.000, SD 68.563 (Resovist 5x) und 6.676.000, SD 358.514 (Magnevist 5x). Im weiteren Verlauf kommt es zu einem

stetigen Abfall der Zellzahl von Tag 14 an bis zum Ende der Proliferationskinetik an Tag 21. Auch im abfallenden Schenkel der Kurve tritt keine Abgrenzbarkeit der Zellzahlen einer Bedingung im Vergleich zu den restlichen auf.

MW ZZ	d0	d4	d7	d11	d14	d18	d21
Ko	30.000	361.000	2.369.000	6.345.667	5.787.333	4.322.333	3.888.667
R 1x	30.000	389.667	2.244.000	6.053.667	5.487.667	4.307.667	3.619.667
R 5x	30.000	306.667	2.098.667	5.795.000	5.180.333	3.917.667	3.442.000
R 10x	30.000	314.667	2.209.666	6.029.667	5.051.333	4.100.000	3.290.667
R 20x	30.000	290.000	2.026.333	6.083.667	5.897.000	4.190.333	3.661.333
G 1x	30.000	330.667	1.939.000	6.306.000	5.213.333	4.209.000	4.002.333
G 5x	30.000	312.667	2.112.000	5.942.333	5.282.667	4.277.000	3.784.667
G 10x	30.000	332.333	2.305.000	6.267.000	5.087.333	4.375.667	4.013.333
G 20x	30.000	316.000	2.179.333	6.089.333	5.201.333	4.129.333	3.803.333
Ma 1x	30.000	311.000	2.293.000	6.364.000	5.336.667	4.273.333	3.930.000
Ma 5x	30.000	345.667	2.227.333	6.676.000	5.392.667	4.300.333	3.723.667
Ma10x	30.000	282.000	2.072.667	6.301.667	6.310.000	4.439.333	3.819.667
Ma20x	30.000	307.667	2.317.333	6.189.000	5.737.333	4.504.333	3.886.667

Tabelle 3.1 zeigt die Mittelwerte der Zellzahlen der HEL nach 4-stündiger KM-Inkubation

Ko= Kontrolle, R 1x= Resovist 1-fache Konzentration, R 5x= Resovist 5-fache Konzentration, R 10x= Resovist 10-fache Konzentration, R 20x= Resovist 20-fache Konzentration, G 1x= Gadovist 1-fache Konzentration, G 5x= Gadovist 5-fache Konzentration, G 10x= Gadovist 10-fache Konzentration, G 20x= Gadovist 20-fache Konzentration, Ma 1x= Magnevist 1-fache Konzentration, Ma 5x= Magnevist 5-fache Konzentration, Ma 10x= Magnevist 10-fache Konzentration, Ma 20x= Magnevist 20-fache Konzentration

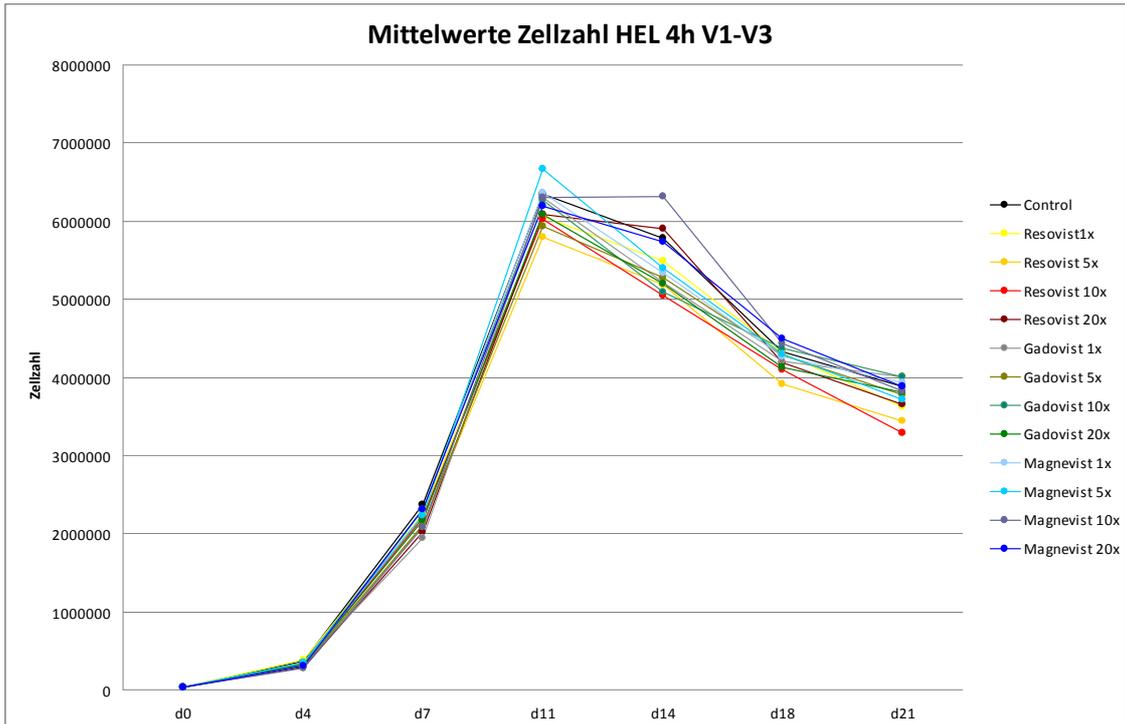


Abb.3.1 stellt für die embryonalen Lungenfibroblasten den Kurvenverlauf der Zellzahlmittelwerte dar

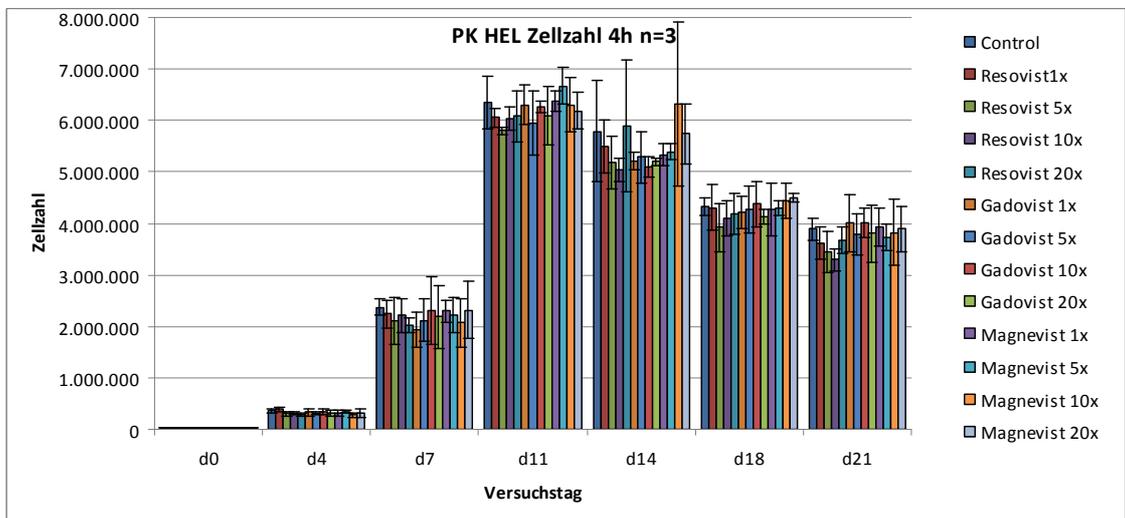


Abb.3.2 Darstellung der Zellzahlen der Proliferationskinetik als Mittelwert der 3 Messungen \pm Standardabweichung im Säulendiagramm

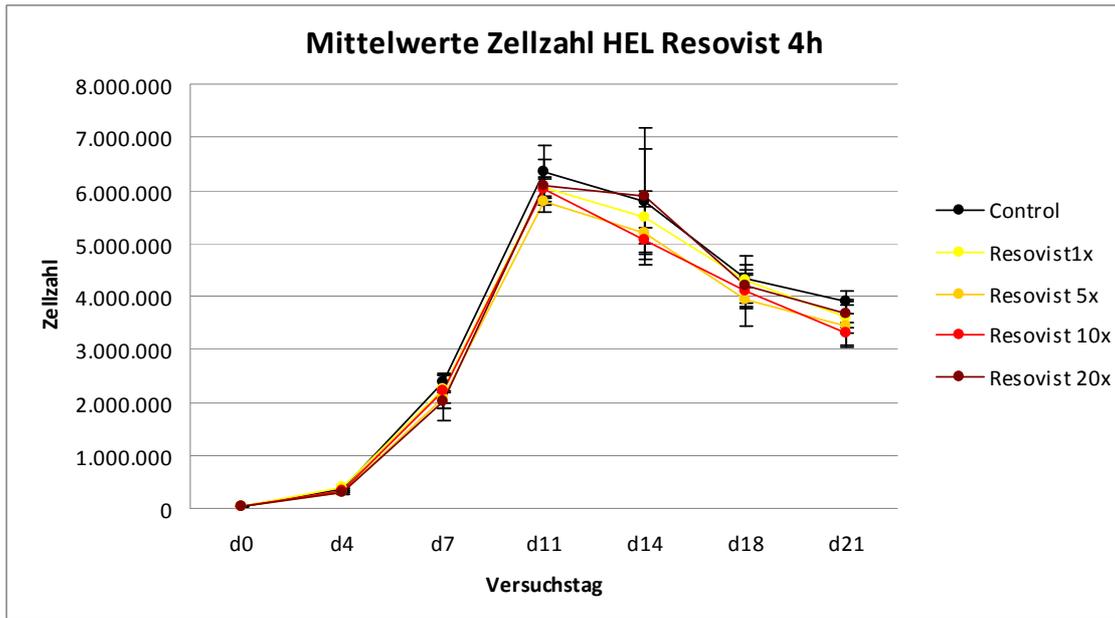


Abb. 3.3 stellt die Zellzahlmittelwerte der HEL \pm eine Standardabweichung nach 4-stündiger Inkubation mit Resovist dar

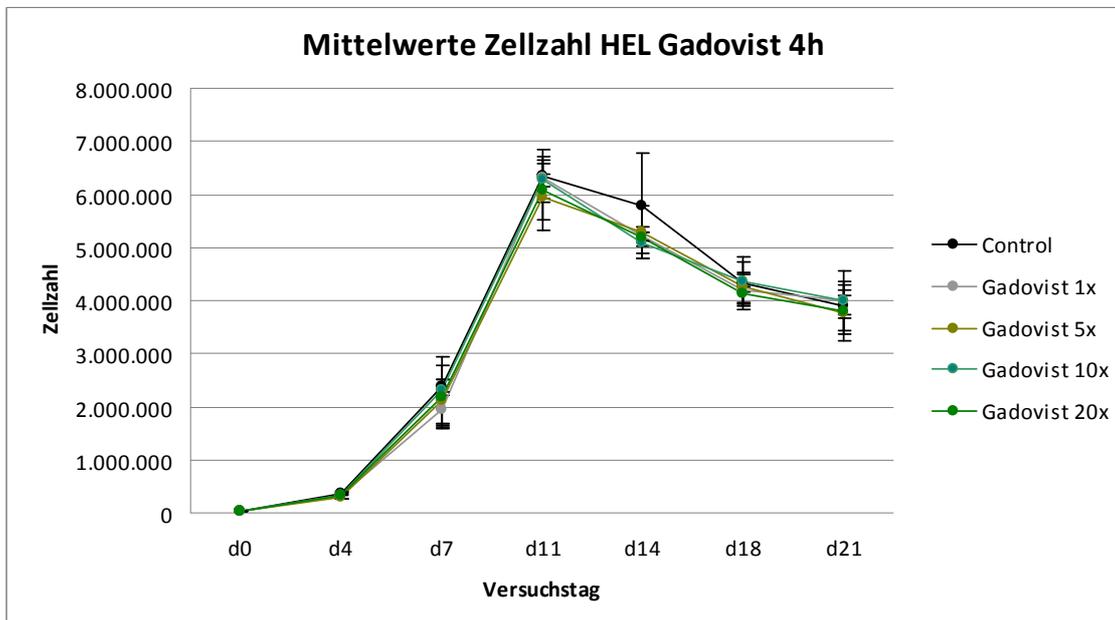


Abb. 3.4: stellt die Zellzahlmittelwerte der HEL \pm eine Standardabweichung nach 4-stündiger Inkubation mit Gadovist dar

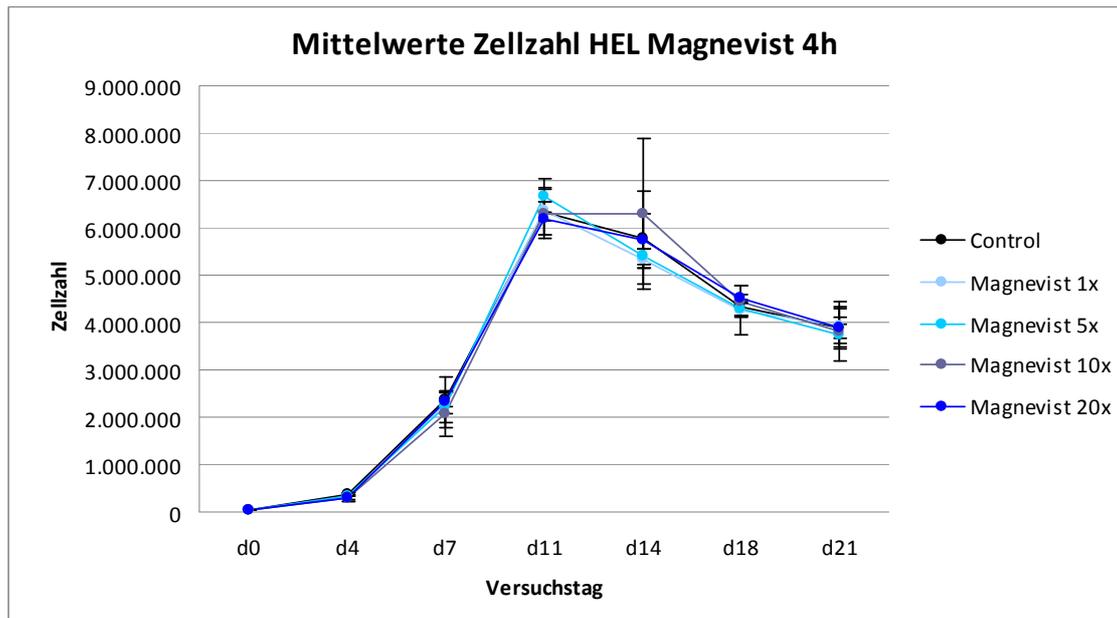


Abb. 3.5 stellt die Zellzahlmittelwerte der HEL \pm eine Standardabweichung nach 4-stündiger Inkubation mit Magnevist dar

b) 24h-Werte

Der Zellanzahlanstieg bis Tag 4 nach Aussaat verläuft langsam, er ist statistisch signifikant verzögert nach Exposition gegenüber Magnevist in der 20-fachen normalen plasmatischen Konzentration: Magnevist 20x 304.667, SD 78.590, Kontrolle 501.000, SD 115.858, restliche KM zwischen 380.000, SD 159.361 (Resovist 10x) und 556.000, SD 141.421 (Gadovist 10x), $p < 0,05$. Auch am folgenden Versuchstag liegt die Magnevist 20x-Kurve deutlich unterhalb der übrigen: Magnevist 20x 1.463.000, SD 561.577; Kontrolle 2.694.333, SD 656.361, $p < 0,05$. Die Kurven erreichen ihre maximale Zellzahl um Tag 11, diese fällt am höchsten aus für die Zellen der Kontrolle (6.579.667, SD 671.458). Bei einer Reihe von Bedingungen zeigt sich ein weniger ausgeprägter Peak (Magnevist 1x-20x, Resovist 5x-20x), die Unterschiede besitzen keine statistische Signifikanz. Ab Tag 11 kommt es in allen Gruppen zu einer stetigen Abnahme der Zellzahl, wobei die Kurve der Kontrolle oberhalb derer der Kontrastmittelgruppen liegt: Tag 18 Kontrolle 4.686.333, SD 674.490, KM-Gruppen zwischen 3.830.333, SD 136.258 (Resovist 20x) und 4.221.000, SD 473.870 (Gadovist 1x), $p > 0,05$.

MW ZZ	d0	d4	d7	d11	d14	d18	d21
Co	30.000	501.000	2.694.333	6.579.667	5.627.000	4.686.333	4.424.667
R 1x	30.000	397.667	2.363.000	6.181.667	5.153.000	3.927.667	3.865.667
R 5x	30.000	408.667	2.409.333	5.645.667	5.095.667	4.093.000	3.874.333
R 10x	30.000	380.000	2.054.333	5.503.667	5.164.667	4.003.000	3.607.667
R 20x	30.000	500.000	2.712.667	5.582.667	5.312.333	3.830.333	3.871.000
G 1x	30.000	488.500	3.049.667	5.971.333	5.172.667	4.221.000	3.938.667
G 5x	30.000	431.500	2.546.667	6.407.667	5.201.667	4.063.000	3.831.000
G 10x	30.000	556.000	2.929.667	6.407.333	5.185.000	3.977.333	3.835.667
G 20x	30.000	531.500	2.806.000	6.134.000	5.232.667	4.092.000	3.952.000
Ma 1x	30.000	446.000	2.218.333	5.530.333	5.237.667	4.157.000	3.946.667
Ma 5x	30.000	407.333	2.031.667	5.648.333	5.451.000	3.981.000	3.946.000
Ma 10x	30.000	391.333	2.127.000	5.584.000	5.342.000	3.977.000	3.669.333
Ma 20x	30.000	304.667	1.463.000	5.484.667	5.265.667	4.050.333	3.641.667

Tabelle 3.2 zeigt die Mittelwerte der HEL-Zellzahlen über den Zeitraum von 21 Tagen nach Inkubation mit den Kontrastmitteln für 24 Stunden

Co= Kontrolle, R 1x= Resovist 1-fache Konzentration, R5x= Resovist 5-fache Konzentration, R10x= Resovist 10-fache Konzentration, R20x= Resovist 20-fache Konzentration, G1x= Gadovist 1-fache Konzentration, G5x= Gadovist 5-fache Konzentration, G10x= Gadovist 10-fache Konzentration, G20x= Gadovist 20-fache Konzentration, Ma1x= Magnevist 1-fache Konzentration, Ma5x= Magnevist 5-fache Konzentration, Ma10x= Magnevist 10-fache Konzentration, Ma20x= Magnevist 20-fache Konzentration

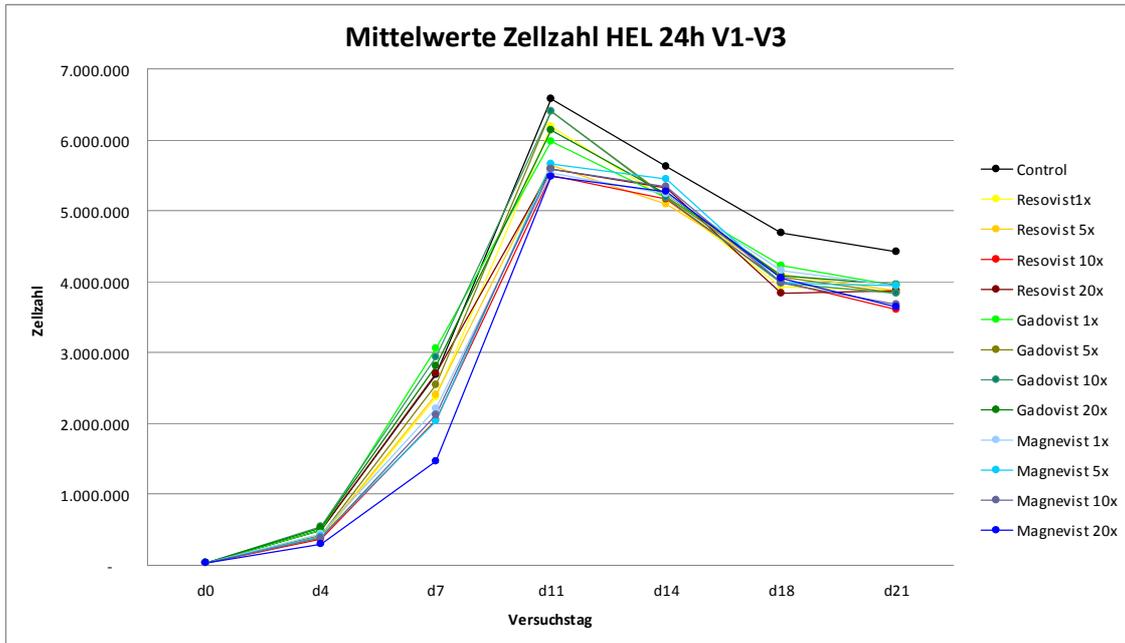


Abb.3.6 zeigt die Mittelwerte der HEL-Zellzahlen im Verlauf nach 24-stündiger Inkubation

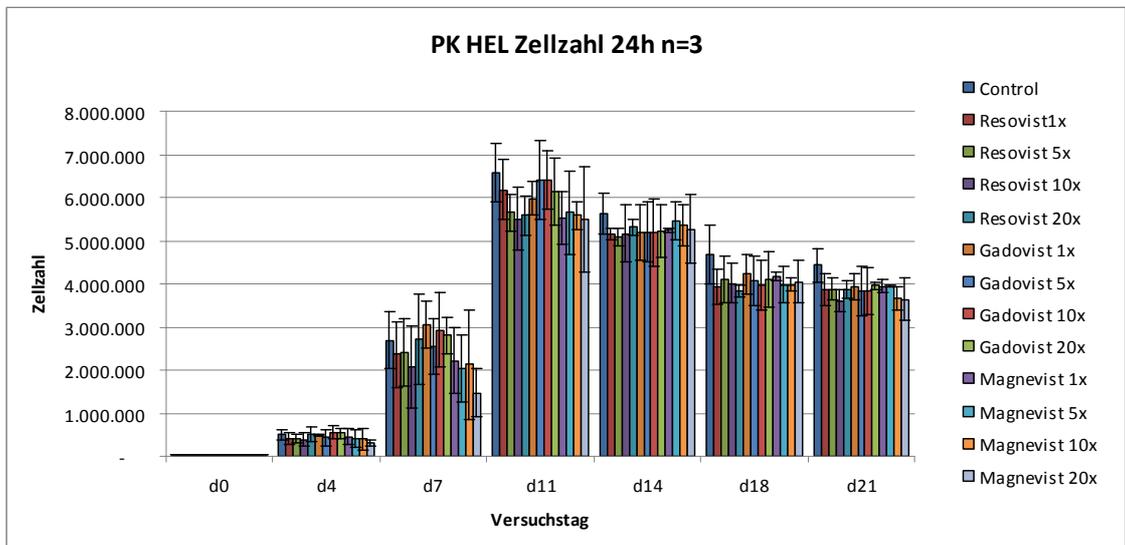


Abb.3.7: Balkendiagramm der HEL-Zellzahlmittelwerte \pm 1 Standardabweichung nach 24-stündiger Inkubation

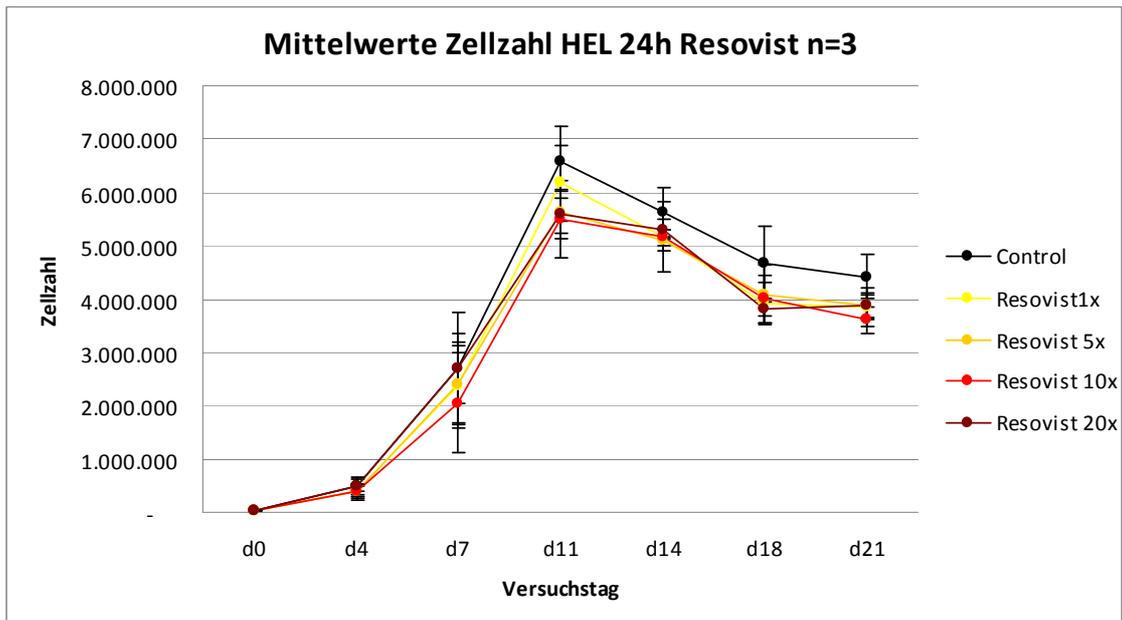


Abb. 3.8 stellt die Zellzahlmittelwerte der HEL \pm eine Standardabweichung nach 24-stündiger Inkubation mit Resovist dar

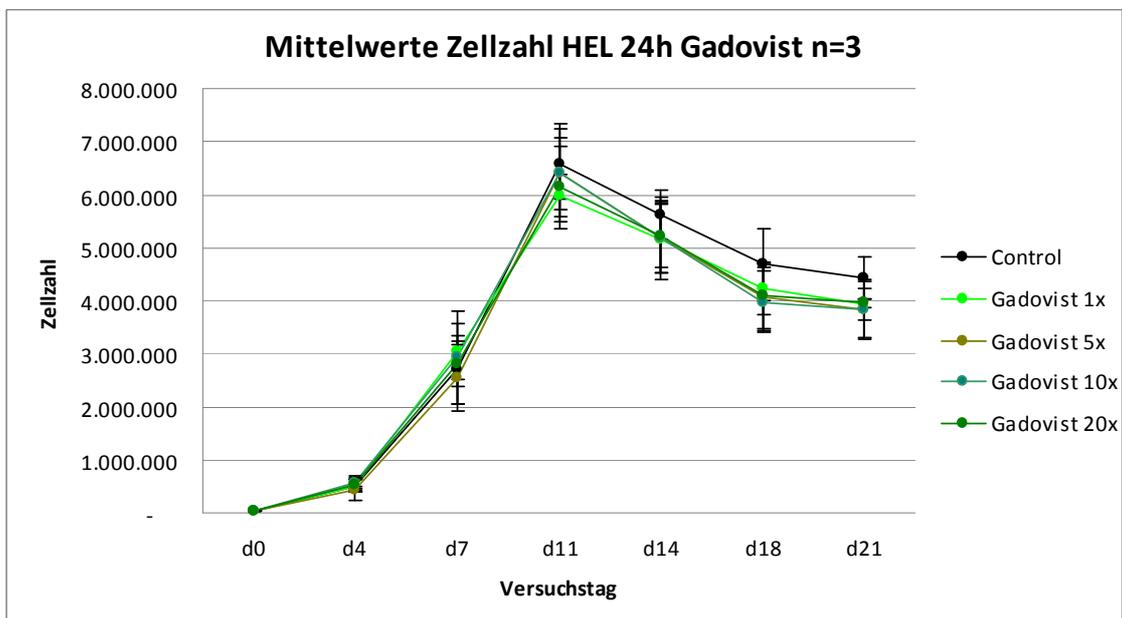


Abb. 3.9 stellt die Zellzahlmittelwerte der HEL \pm eine Standardabweichung nach 24-stündiger Inkubation mit Gadovist dar

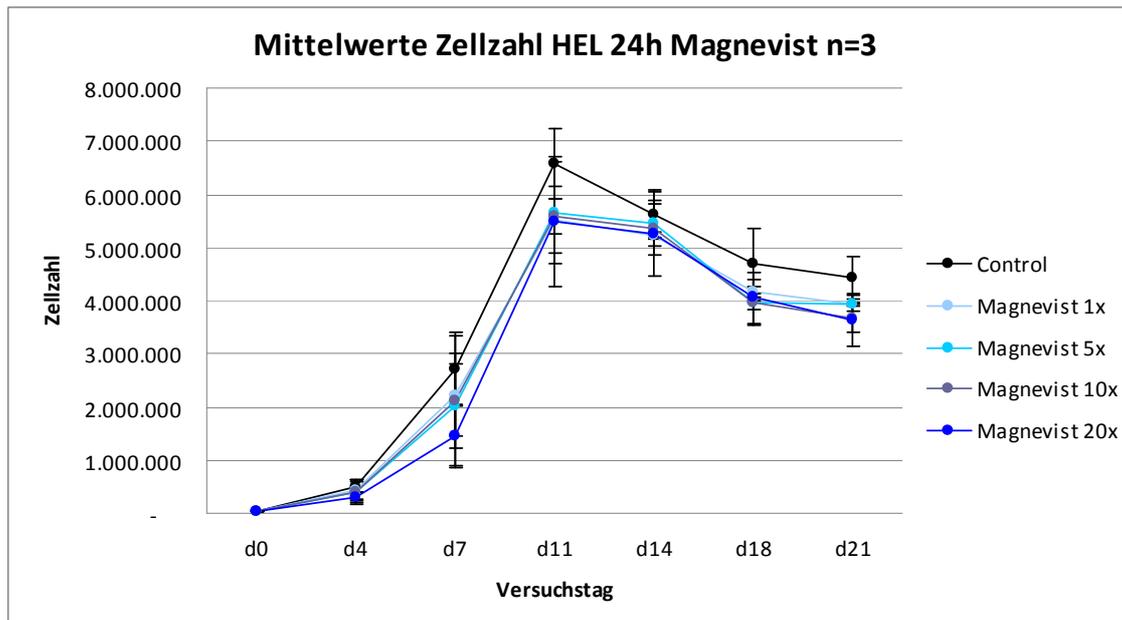


Abb.3.10 stellt die Zellzahlmittelwerte der HEL \pm eine Standardabweichung nach 24-stündiger Inkubation mit Magnevist dar

3.1.2.2. Viabilität

Auf der Basis der gemessenen Zelldurchmesser durch den CASY[®]2 Cell Counter lassen sich durch Anwendung der Methode nach Lindl Aussagen über die Viabilität der ausgezählten Zellen treffen ^[57].

a) 4h

Im Zellpool mit 4-stündiger Kontrastmittelexposition tritt zu keinem Zeitpunkt der Proliferationskinetik eine signifikante Abweichung der Viabilität der Kontrastmittelgruppen von den Werten der Kontrolle auf. Unmittelbar nach Ende der Inkubation beträgt die Viabilität unter Kontrollbedingungen 97,4%, SD 0,07%, bei KM-Exposition beträgt sie zwischen 97,6%, SD 0,03% (Gadovist 1x) und 97,0%, SD 0,54% (Magnevist 1x). Sie bleibt an den beiden darauffolgenden Versuchstagen konstant bei Werten um 97% und fällt ab Tag 11 bis zum Ende der Kinetik leicht ab (Tag 11: Kontrolle 95,1%, SD 0,37%, KM 93,8%, SD 0,99% bis 95,7%, SD 0,41% , Tag 21: Kontrolle 92,2%, SD 0,5%, KM 91,2%, SD 0,92% bis 93%, SD 0,62%).

MW Viabilität	d0	d4	d7	d11	d14	d18	d21
Kontrolle	97,4	97,2	97,0	95,1	93,7	91,8	92,2
Resovist1x	97,4	96,6	97,1	95,2	92,6	91,2	92,3
Resovist 5x	97,5	96,7	97,0	94,9	92,8	92,2	92,3
Resovist10x	97,3	96,8	97,0	94,6	92,5	91,6	91,8
Resovist20x	97,3	96,7	96,5	94,4	92,7	91,2	91,7
Gadovist1x	97,6	97,1	96,9	95,6	95,3	92,0	93,0
Gadovist5x	97,4	96,8	96,8	95,7	94,6	92,1	92,3
Gadovist10x	97,5	96,7	97,2	95,1	94,4	91,6	92,4
Gadovist20x	97,3	96,7	96,9	95,3	95,0	91,9	92,3
Magnevist1x	97,0	97,2	97,5	94,4	93,3	91,7	91,1
Magnevist5x	97,4	97,2	97,9	94,6	93,3	91,8	91,5
Magnevist10x	97,1	96,5	96,6	94,8	94,2	92,5	91,4
Magnevist20x	97,1	96,8	97,1	93,8	93,8	92,6	91,2

Tabelle 3.3 zeigt die Viabilitätsmittelwerte nach 4-Stunden-Exposition mit den Kontrastmitteln

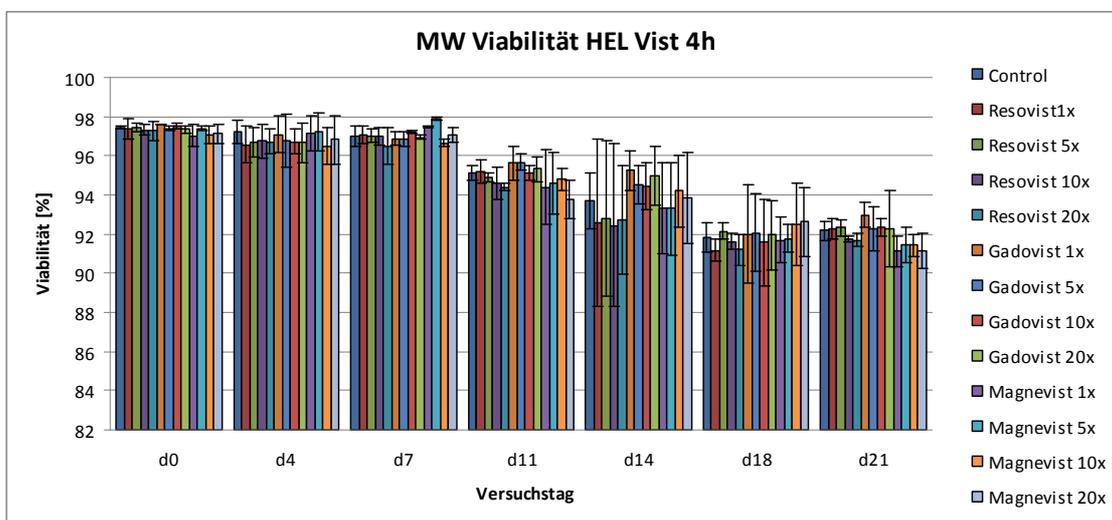


Abb. 3.11 stellt für die 4-Stunden-Gruppe die Viabilitätsmittelwerte ± 1 Standardabweichung graphisch dar

b) 24h

Direkt nach Ende der Inkubation zeigt sich in der 24-Stunden-Gruppe eine verminderte Viabilität bei maximaler KM-Konzentration von Magnevist

(Magnevist 20x 93,7%, SD 0,48% vs. Kontrolle 96,4%, SD 0,42; $p < 0,05$) und in geringerem Maße auch von Resovist ($p > 0,05$). Die Viabilität an den Folgetagen ist annähernd gleichbleibend, wobei sich die Werte der verschiedenen KM-Konzentrationen einander angleichen. Ab Tag 11 nehmen die Messergebnisse langsam ab, es treten keine signifikanten Abweichungen von der Kontrolle auf: Tag 11 Kontrolle 94,9%, SD 0,57%, KM 94,2%, SD 1,69% bis 95,8%, SD 0,79%; Tag 21 Kontrolle 90,1%, SD 2,06%, KM 90,5%, SD 1,46% bis 92,7%, SD 1,5%.

MW Via [%]	d0	d4	d7	d11	d14	d18	d21
Kontrolle	96,4	95,4	97,1	94,9	94,0	90,8	90,1
Resovist1x	96,6	95,7	97,2	95,7	94,6	91,1	91,5
Resovist 5x	96,0	95,3	97,0	95,6	94,6	91,4	91,7
Resovist 10x	95,9	94,5	96,8	95,8	95,0	92,0	91,8
Resovist 20x	95,0	95,0	97,4	95,0	94,9	91,8	91,2
Gadovist 1x	96,2	95,3	97,3	94,3	93,6	91,3	90,5
Gadovist 5x	96,5	96,0	96,8	95,2	93,9	91,5	91,5
Gadovist 10x	95,9	95,6	97,2	95,6	94,7	92,5	92,1
Gadovist 20x	95,5	95,9	97,2	94,2	94,8	92,9	92,7
Magnevist 1x	96,2	96,8	96,6	95,6	94,7	92,2	91,3
Magnevist 5x	96,0	96,3	96,7	95,5	94,6	92,6	91,9
Magnevist10x	94,9	96,4	97,1	95,6	94,3	93,6	92,7
Magnevist20x	93,7	96,0	96,2	95,7	95,1	92,7	92,2

Tabelle 3.4 gibt eine Übersicht über die Mittelwerte der Viabilität nach 24-stündiger Inkubation

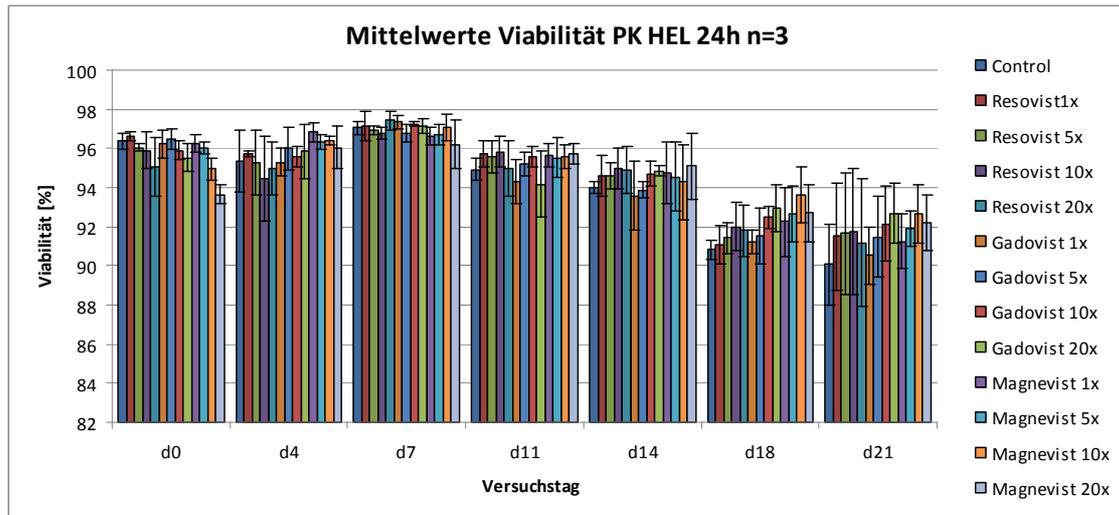


Abb. 3.12 zeigt graphisch die Viabilitätsmittelwerte der 24h-Gruppe über den Beobachtungszeitraum

c) Vergleich der Viabilität 4h vs. 24h

Resovist-Gruppe:

Direkt nach Ende der Inkubation und an Tag 4 sind die Viabilitätswerte nach 4-stündiger Inkubation für alle Konzentrationen höher als die nach 24h-Inkubation, die Unterschiede sind nicht signifikant, $p > 0,05$. Die Differenz in Abhängigkeit von der Expositionsdauer ist bei höherer KM-Konzentration ausgeprägter: Tag 4 Resovist 1x 96,6%, SD 0,92% (4h) vs. 95,7%, SD 0,13% (24h), Resovist 20x 96,7%, SD 0,65% (4h) vs. 95%, SD 1,33% (24h). Ab Tag 7 zeigen sich die Viabilitätsunterschiede zugunsten des 4-Stunden-Zellpools nicht mehr, teilweise liegen die Werte nach 24 Stunden KM-Exposition oberhalb derer nach 4-stündiger Exposition.

MW Via [%]	d0	d4	d7	d11	d14	d18	d21
Ko 4h	97,4	97,2	97,0	95,1	93,7	91,8	92,2
Ko 24h	96,4	95,4	97,1	94,9	94,0	90,8	90,1
R 1x 4h	97,4	96,6	97,1	95,2	92,6	91,2	92,3
R 1x 24h	96,6	95,7	97,2	95,7	94,6	91,1	91,5
R 5x 4h	97,5	96,7	97,0	94,9	92,8	92,2	92,3
R 5x 24h	96,0	95,3	97,0	95,6	94,6	91,4	91,7
R 10x 4h	97,3	96,8	97,0	94,6	92,5	91,6	91,8
R 10x 24h	95,9	94,5	96,8	95,8	95,0	92,0	91,8
R 20x 4h	97,3	96,7	96,5	94,4	92,7	91,2	91,7
R 20x 24h	95,0	95,0	97,4	95,0	94,9	91,8	91,2

Tabelle 3.5: Viabilitätsmittelwerte nach Inkubation mit Resovist, 4h und 24h in Gegenüberstellung

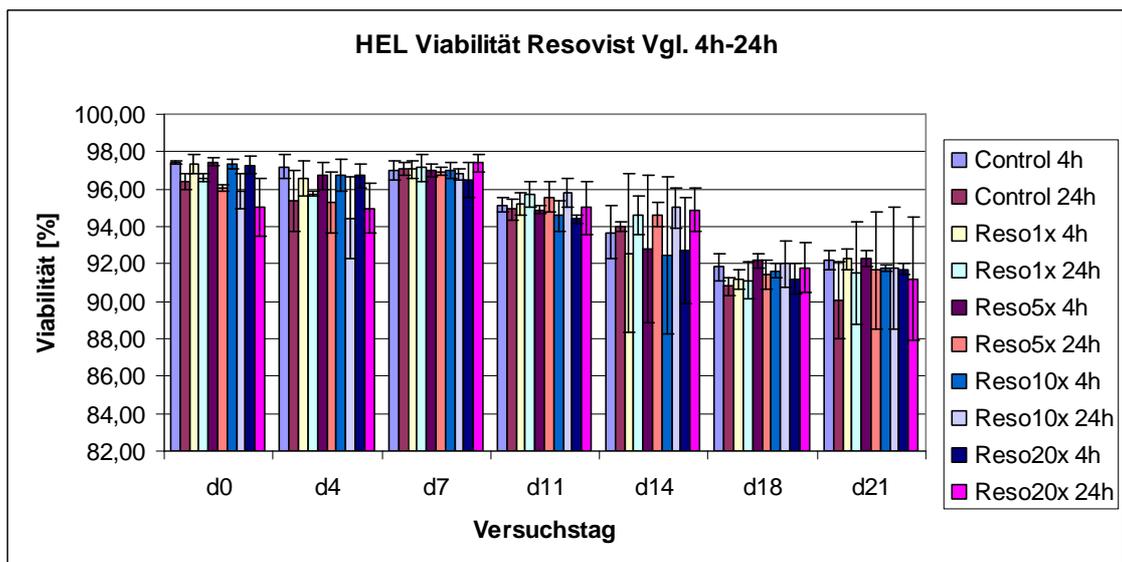


Abb. 3.13: Säulendiagramm der Viabilitätsmittelwerte für Resovist - Vergleich zwischen 4- und 24-stündiger Inkubation

Gadovist-Gruppe:

Auch bei Gadovist treten an den ersten beiden Beobachtungstagen zwischen den Inkubationszeiten Viabilitätsdifferenzen zugunsten des 4h-Zellpools auf.

Die Differenzen verschwinden im weiteren Verlauf. Es kommt zu keiner statistisch relevanten Abweichung der Werte zwischen den beiden Expositionsdauern, $p > 0,05$.

MW Via [%]	d0	d4	d7	d11	d14	d18	d21
Ko 4h	97,4	97,2	97,0	95,1	93,7	91,8	92,2
Ko 24h	96,4	95,4	97,1	94,9	94,0	90,8	90,1
G 1x 4h	97,6	97,1	96,9	95,6	95,3	92,0	93,0
G 1x 24h	96,2	95,3	97,3	94,3	93,6	91,3	90,5
G 5x 4h	97,4	96,8	96,8	95,7	94,6	92,1	92,3
G 5x 24h	96,5	96,0	96,8	95,2	93,9	91,5	91,5
G 10x 4h	97,5	96,7	97,2	95,1	94,4	91,6	92,4
G 10x 24h	95,9	95,6	97,2	95,6	94,7	92,5	92,1
G 20x 4h	97,3	96,7	96,9	95,3	95,0	91,9	92,3
G 20x 24h	95,5	95,9	97,2	94,2	94,8	92,9	92,7

Tabelle 3.6 Viabilitätswerte nach Inkubation mit Gadovist, 4h und 24h in Gegenüberstellung

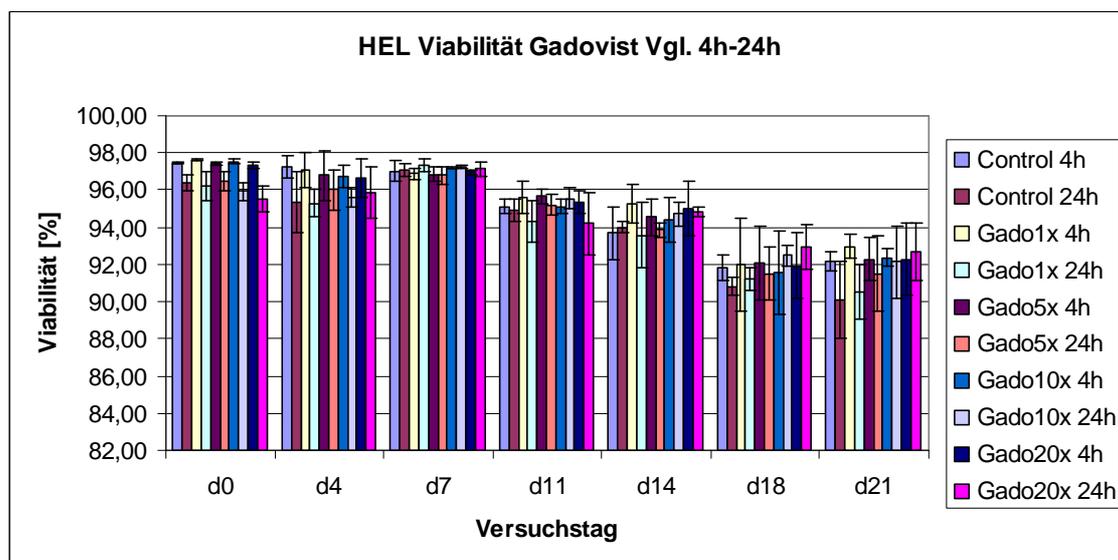


Abb. 3.14 Säulendiagramm der Viabilitätswerte für Gadovist - Vergleich zwischen 4- und 24-stündiger Inkubation

Magnevist-Gruppe:

Während die Viabilitätswerte nach 4-stündiger Inkubation sich um die ihrer Kontrolle bewegen, ist die Viabilität in der 24-Stunden-Gruppe deutlich

konzentrationsabhängig herabgesetzt, wobei die Unterschiede nur unmittelbar nach Inkubationsende mit den Maximalkonzentrationen statistisch signifikant sind ($p < 0,05$): Tag 0 Magnevist 10x 97,1%, SD 0,46% (4h) vs. 94,9%, SD 0,55% (24h), Magnevist 20x 97,1%, SD 0,5% (4h) vs. 93,7%, SD 0,48%.

Die Schwankungen in Abhängigkeit von der Konzentration und der Inkubationsdauer sind ab Tag 7 ausgeglichen. An Tag 11 variieren die 4-Stunden-Werte von 95,1% bis 93,8% und die 24-Stunden-Werte zwischen 95,7% und 95,1%. Ab diesem Zeitpunkt auftretende Differenzen sind eher im Sinne von unterschiedlichen Kulturbedingungen anstatt als Kontrastmittelwirkung zu interpretieren.

MW Via [%]	d0	d4	d7	d11	d14	d18	d21
Ko 4h	97,4	97,2	97,0	95,1	93,7	91,8	92,2
Ko 24h	96,4	95,4	97,1	94,9	94,0	90,8	90,1
Ma1x 4h	97,0	97,2	97,5	94,4	93,3	91,7	91,1
Ma1x24h	96,2	96,8	96,6	95,6	94,7	92,2	91,3
Ma5x 4h	97,4	97,2	97,9	94,6	93,3	91,8	91,5
Ma5x24h	96,0	96,3	96,7	95,5	94,6	92,6	91,9
Ma10x4h	97,1	96,5	96,6	94,8	94,2	92,5	91,4
Ma10x24h	94,9	96,4	97,1	95,6	94,3	93,6	92,7
Ma20x 4h	97,1	96,8	97,1	93,8	93,8	92,6	91,2
Ma20x24h	93,7	96,0	96,2	95,7	95,1	92,7	92,2

Tabelle 3.7 Viabilitätswerte nach Inkubation mit Magnevist, 4h und 24h in Gegenüberstellung

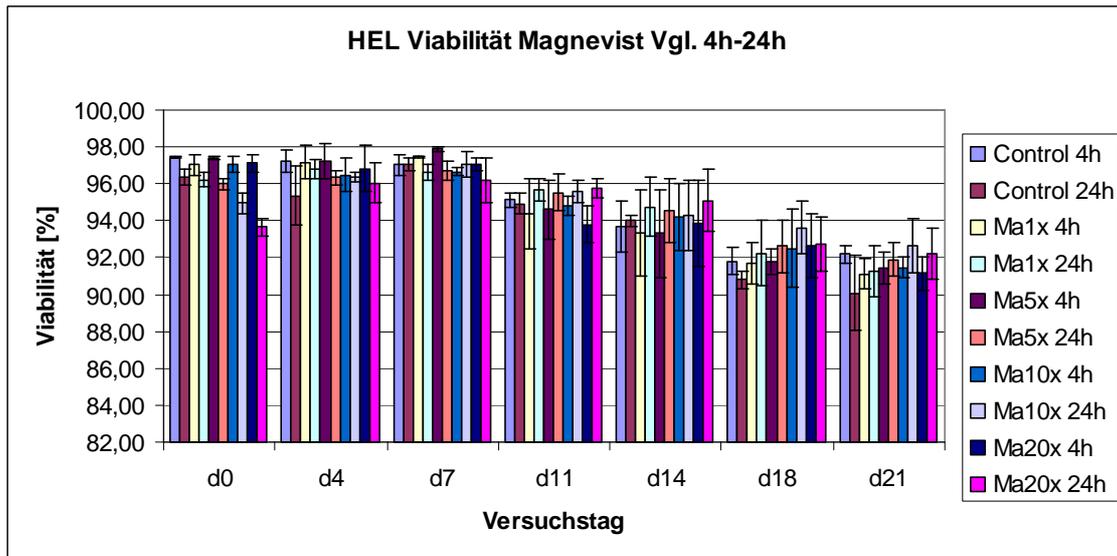


Abb. 3.15 Säulendiagramm der Viabilitätsmittelwerte für Magnevist - Vergleich zwischen 4- und 24-stündiger Inkubation

3.1.3. HUVEC

3.1.3.1. Zellzahl

Die an Tag 0 à 30.000 ausgesäten Nabelschnur-Endothelzellen waren zuvor für einen Zeitraum von 24 Stunden mit den 3 Kontrastmitteln in 10- und 20-facher normaler plasmatischer Konzentration inkubiert worden.

An Tag 3 nach Aussaat ist ein langsamer Anstieg der Zellzahl erfolgt, ohne dass sich zwischen den Bedingungen signifikante Unterschiede zeigen: Kontrolle 116.993, SD 4141; Kontrastmittel-Gruppen zwischen 100.857, SD 15.722 (Magnevist 10x) und 144.220, SD 15.808 (Gadovist 20x). Es folgt ein exponentieller Zuwachs der Werte um Tag 7 (Kontrolle 1.830.833, SD 62.957, KM zwischen 1.676.500, SD 290.095- Magnevist 10x und 2.200.333, SD 184.960-Gadovist 20x), der im Erreichen eines Plateaus um Tag 10 mündet: Kontrolle 3.393.867, SD 114.652, KM zwischen 3.190.733, SD 184.939 (Magnevist 10x) und 3.296.267, SD 272.047 (Gadovist 20x). Ab diesem Zeitpunkt zeigt sich eine Konstanz der Zellzahlen bzw. eine leichte Abflachung in der Kurve.

Zu keinem Zeitpunkt der Proliferationskinetik hebt sich die Kurve einer Bedingung signifikant von den restlichen ab. Dies gilt für den Übergang von langsamem zu exponentiellem Wachstum, der Steigung während der exponentiellen Phase, der Höhe des Peaks und den Zeitpunkt, zu welchem dieser erreicht wird.

MW	d0	d3	d7	d10	d14	d17
Kontrolle	30.000	116.993	1.830.833	3.393.867	3.207.067	3.255.600
Resovist 10x	30.000	118.223	1.919.167	3.194.867	2.990.533	3.240.200
Resovist 20x	30.000	126.523	1.961.933	3.213.867	3.286.533	3.085.400
Gadovist 10x	30.000	140.083	1.994.333	3.189.933	3.110.733	3.329.200
Gadovist 20x	30.000	144.220	2.200.333	3.296.267	3.132.667	3.574.200
Magnevist10x	30.000	100.857	1.676.500	3.190.733	2.968.400	3.152.800
Magnevist20x	30.000	107.557	1.764.000	3.251.667	2.870.600	2.964.600

Tabelle 3.8 zeigt die Zellzahl-Mittelwerte der HUVEC über den Beobachtungszeitraum

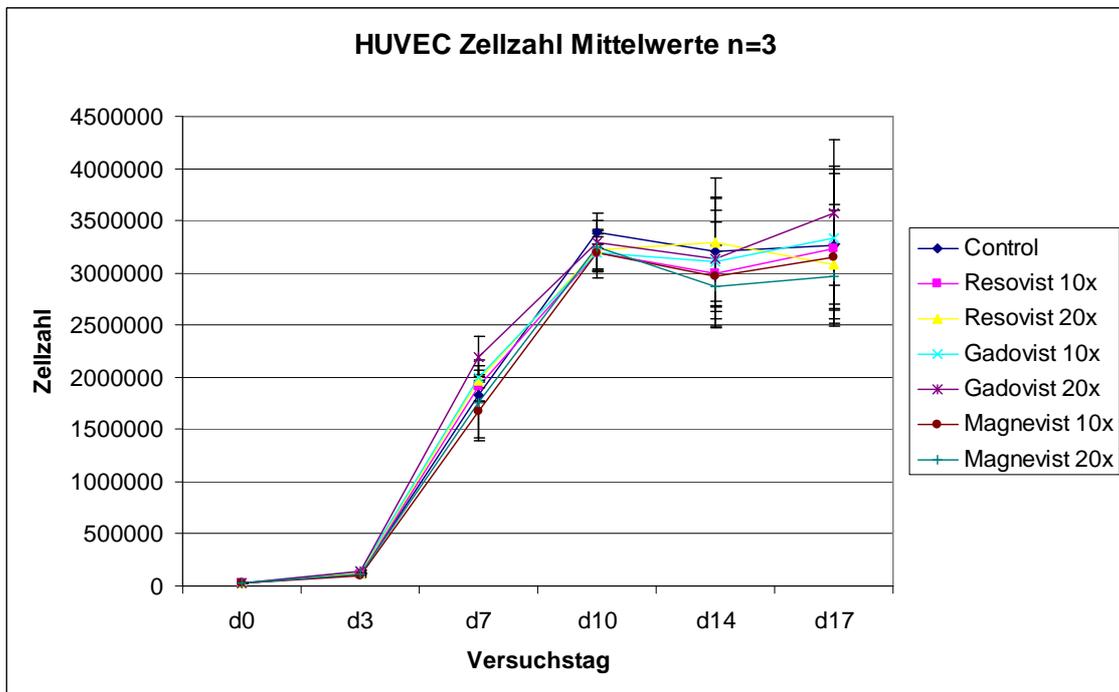


Abb 3.16 stellt die Kurven des Wachstumsverlaufs der Nabelschnur-Endothelzellen ± 1 Standardabweichung dar

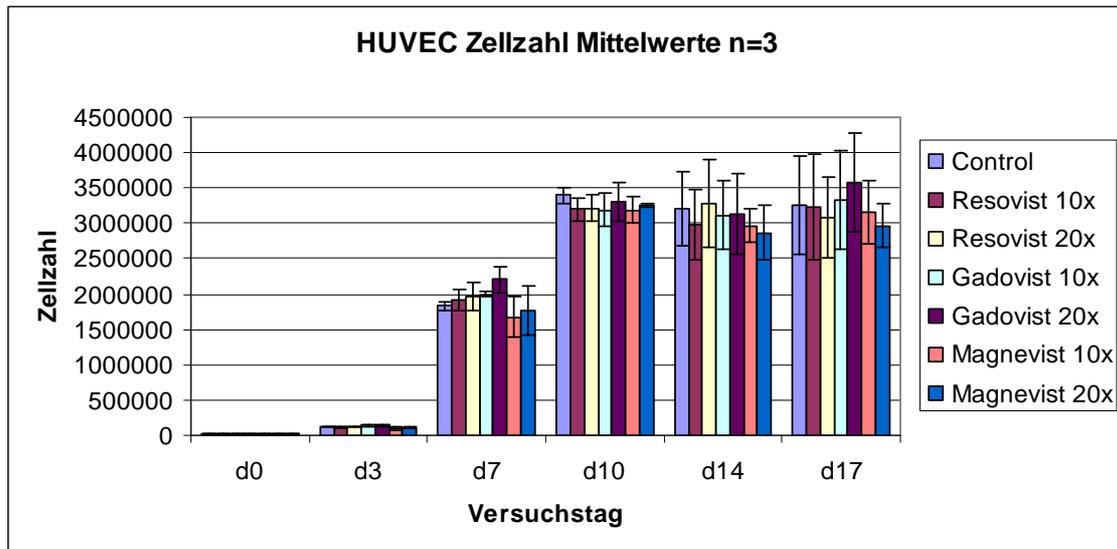


Abb.3.17 zeigt graphisch die Entwicklung der Zellzahlen der HUVEC über den Beobachtungszeitraum von 17 Tagen

3.1.3.2. Viabilität

Die Viabilität der untersuchten Endothelzellen wurde zu jedem Beobachtungszeitpunkt durch den CASY2 Cellcounter nach der ECE-Methode von Lindl. et al. erfasst ^[57]. Das Ziel bestand darin, durch sie eine Aussage über die zelluläre Vitalität nach Exposition gegenüber den Kontrastmitteln im Vergleich zur Kontrolle zu treffen.

Unmittelbar nach Beendigung der Inkubation liegt die Viabilität der Nabelschnur-Endothelzellen zwischen 93,4% (Kontrolle, SD 0,9%) und 92,1% (Resovist 20x, SD 0,4%). Die mit Resovist 10x und Magnevist 10x inkubierten Zellen besitzen im Vergleich zu den anderen Bedingungen eine signifikant verminderte Viabilität (Resovist 10x 90,1%, SD 1,3%; Magnevist 10x 89,2%, SD 1,8%, $p < 0,05$). Auf eine globale Abflachung der Werte an Tag 3 (Kontrolle 85,5%, SD ; KM zwischen 85,1%- Resovist 10x, SD 0,3% und 87,3%-Gadovist 10x, SD 0,4%) folgt ein Wiederanstieg auf das ursprüngliche Niveau zu Tag 7: Kontrolle 93,0%, SD 1,1%, KM zwischen 89,5%, SD 2,2% (Resovist 10x) und 92,3%, SD 1,5% (Magnevist 20x). Im weiteren Verlauf zeigt sich eine Konstanz der Viabilität um die an d7 erreichten Werte, auch gleichen sich die Werte der unterschiedlichen Bedingungen zu einem Beobachtungszeitpunkt einander an.

Die Viabilität in der Kontrollgruppe liegt mit Ausnahme von Tag 3 und Tag 17 nach Aussaat über den Werten der KM-Gruppen, wobei die Unterschiede zwischen den Gruppen nicht signifikant ausfallen ($p > 0,05$).

Viabilität HUVEC	d0	d3	d7	d10	d14	d17
Control	93,4	85,8	93,0	93,2	94,3	93,0
Resovist 10x	90,1	85,1	89,5	90,5	92,5	92,4
Resovist 20x	92,1	85,0	91,0	91,5	93,2	92,4
Gadovist 10x	92,5	87,3	91,2	91,9	93,3	92,5
Gadovist 20x	92,8	86,2	91,9	92,3	93,3	93,4
Magnevist 10x	89,2	85,5	91,1	91,3	93,6	92,0
Magnevist 20x	92,2	85,2	92,3	91,7	94,0	92,2

Tabelle 3.9 stellt die HUVEC-Mittelwerte der Viabilität über den 17-tägigen Beobachtungszeitraum dar

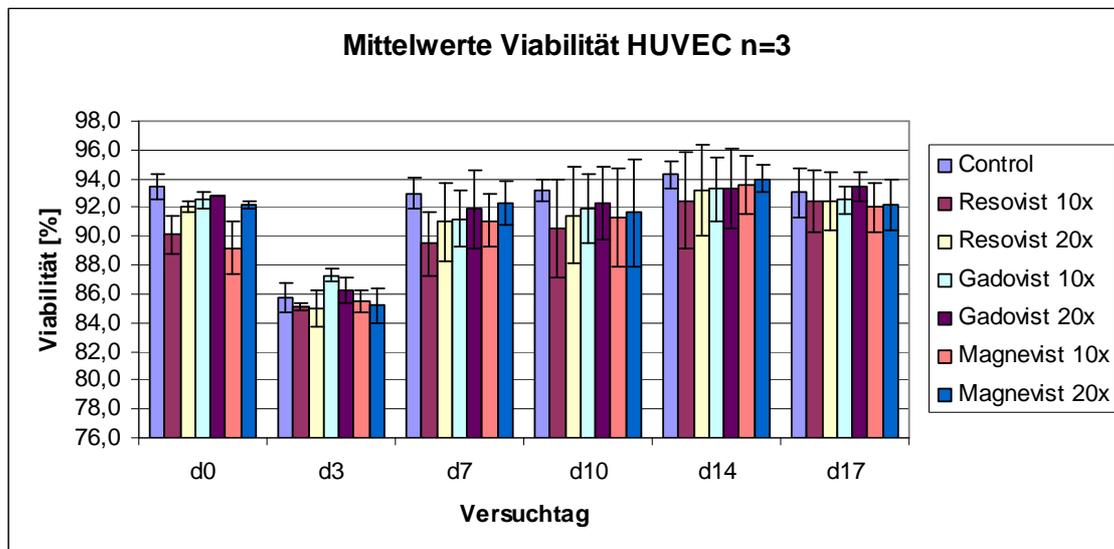


Abb. 3.18 zeigt graphisch die Veränderungen der Viabilität der HUVEC über den Beobachtungszeitraum

3.2. Koloniebildungsassay

3.2.1. Aussage des KoBi

Da es möglich ist, dass eine Noxe in der Proliferationskinetik ihre wachstumshemmende Auswirkung auf die Zellzahl nicht zeigt, gilt die Methode des Koloniebildungs-Assays als ein sensiblerer Parameter bei der Frage der Wachstumshemmung durch das KM. Sie ist ein etabliertes Verfahren in der Zellkultur, von der man sich verspricht, auch diskrete Effekte auf die Proliferation sichtbar zu machen. Als Kolonie werden Konglomerate von mehr als 50 Zellen bezeichnet, dies entspricht dem Durchlaufen von 5-6 Zellteilungen.

3.2.2. HEL

a) 4h

Im Vergleich zur Kontrolle ist die Anzahl der gebildeten Kolonien unter allen Kontrastmittelbedingungen herabgesetzt (Ko: 99,6 Kolonien, SD 15,7; KM-Bedingungen zwischen 92,6-Magnevist 5x und 72,0-Resovist 10x). Aufgrund der breiten Streuung der Werte in den Versuchsdurchläufen kommt es jedoch zu keiner statistisch signifikanten Herabsetzung. Eine Tendenz zur konzentrationsabhängigen Einschränkung der Koloniebildung zeigt sich in der Resovist-Gruppe (R1x 91,3 Kolonien und R5x 86,4 Kolonien Vgl. R10 72,0 Kolonien R20 80,5 Kolonien) und in der Magnevist-Gruppe (Ma1-10x zwischen 92,6 und 88,9 Kolonien vs Ma 20x 80,5 Kolonien). Bei den mit Gadovist inkubierten Lungenfibroblasten ist die Koloniebildung mit Ausnahme von G5 (86,6 Kolonien) einheitlich herabgesetzt (G1x 79,8 – G20x 80,6 Kolonien).

	Co	R1	R5	R10	R20	G1	G5
MW	99,6	91,3	86,4	72,0	80,5	79,8	86,6
Stabw	15,7	14,5	16,1	12,6	15,6	16,8	12,5
KM/Ko [%]	100,0	91,7	86,8	72,3	80,8	80,1	86,9
	G10	G20	Ma1	Ma5	Ma10	Ma20	
MW	80,1	80,6	91,0	92,6	88,9	80,5	
Stabw	12,6	17,4	21,1	20,3	17,8	20,4	
KM/Ko [%]	80,4	80,9	91,4	93,0	89,3	80,8	

Tabelle 3.10 zeigt pro Bedingung Mittelwert der ausgezählten Kolonien, Standardabweichung und Koloniebildungsrate im Vergleich zur Kontrolle

Co= Kontrolle, R1= Resovist 1-fache Konzentration, R5= Resovist 5-fache Konzentration, R10= Resovist 10-fache Konzentration, R20= Resovist 20-fache Konzentration, G1= Gadovist 1-fache Konzentration, G5= Gadovist 5-fache Konzentration, G10= Gadovist 10-fache Konzentration, G20= Gadovist 20-fache Konzentration, Ma1= Magnevist 1-fache Konzentration, Ma5= Magnevist 5-fache Konzentration, Ma10= Magnevist 10-fache Konzentration, Ma20= Magnevist 20-fache Konzentration

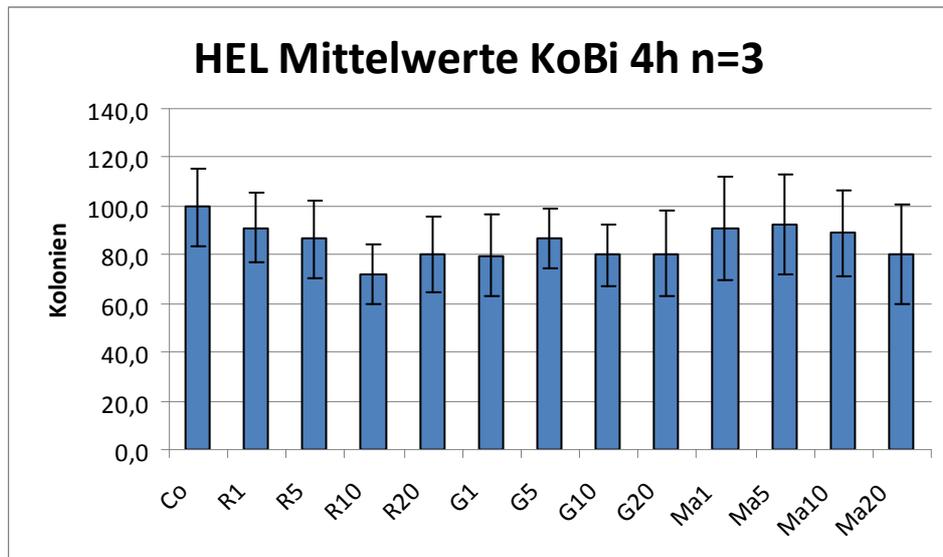


Abb. 3.19 stellt für die HEL die Mittelwerte des Koloniebildungsassays nach 4-stündiger Inkubation dar

Co= Kontrolle, R1= Resovist 1-fache Konzentration, R5= Resovist 5-fache Konzentration, R10= Resovist 10-fache Konzentration, R20= Resovist 20-fache Konzentration, G1= Gadovist 1-fache Konzentration, G5= Gadovist 5-fache Konzentration, G10= Gadovist 10-fache Konzentration, G20= Gadovist 20-fache Konzentration, Ma1= Magnevist 1-fache Konzentration, Ma5= Magnevist 5-fache Konzentration, Ma10= Magnevist 10-fache Konzentration, Ma20= Magnevist 20-fache Konzentration

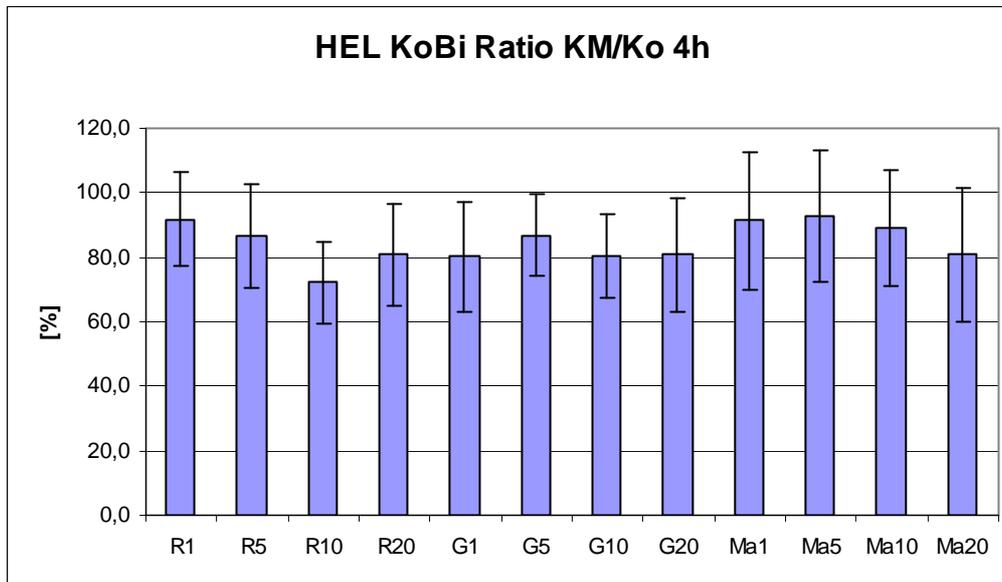


Abb. 3.20 zeigt graphisch die Koloniebildungsrate der HEL im Verhältnis zur Kontrolle bei 4-stündiger KM-Exposition. Die Kontrolle ist auf 100% gesetzt.

R1= Resovist 1-fache Konzentration, R5= Resovist 5-fache Konzentration, R10= Resovist 10-fache Konzentration, R20= Resovist 20-fache Konzentration, G1= Gadovist 1-fache Konzentration, G5= Gadovist 5-fache Konzentration, G10= Gadovist 10-fache Konzentration, G20= Gadovist 20-fache Konzentration, Ma1= Magnevist 1-fache Konzentration, Ma5= Magnevist 5-fache Konzentration, Ma10= Magnevist 10-fache Konzentration, Ma20= Magnevist 20-fache Konzentration

b) 24h

Die HEL-Ansätze, die 24 Stunden inkubiert wurden, oszillieren in ihren Koloniezahlen um den Wert der Kontrolle: Ko 106,2 Kolonien, SD15,0 , KM-Reihen zwischen 108,8 Kolonien, SD 15,5 (Ma 1x) und 95,3, SD 12,8 (Ma 5x).

Eine Ausnahme hierzu bilden die embryonalen Fibroblasten, die mit 10- und 20-facher plasmatischer Magnevist-Konzentration inkubiert wurden. Ihre Koloniebildungsrate ist im Vergleich zur Kontrolle signifikant herabgesetzt: Magnevist 10x/Kontrolle 73,7% und Magnevist 20x / Kontrolle 75,7%., $p < 0,05$.

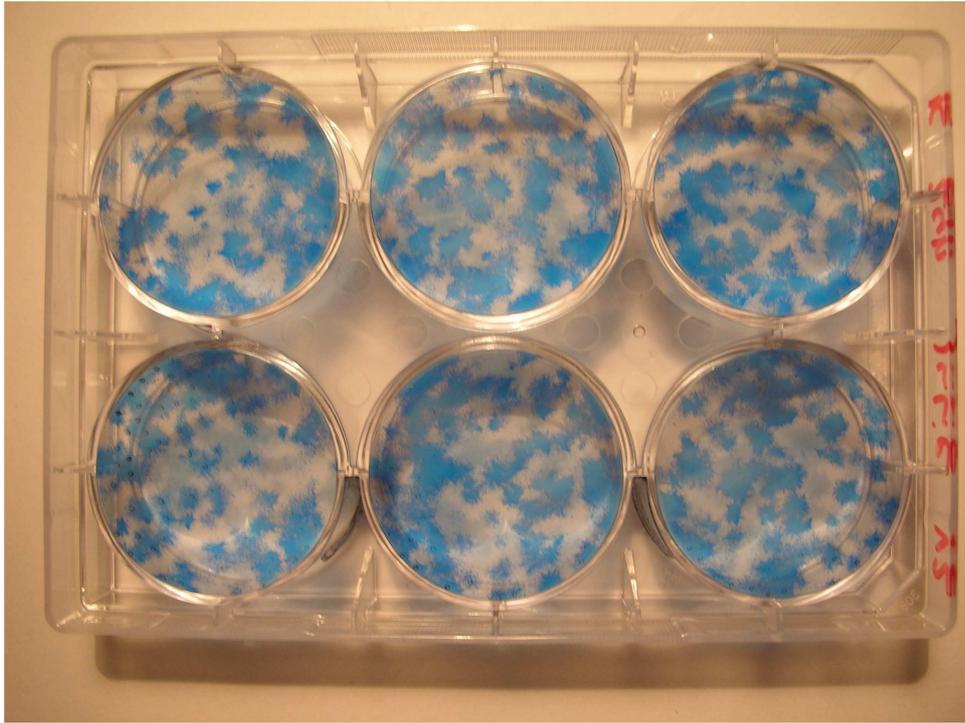


Abb. 3.21a: KoBi HEL Kontrolle 24h

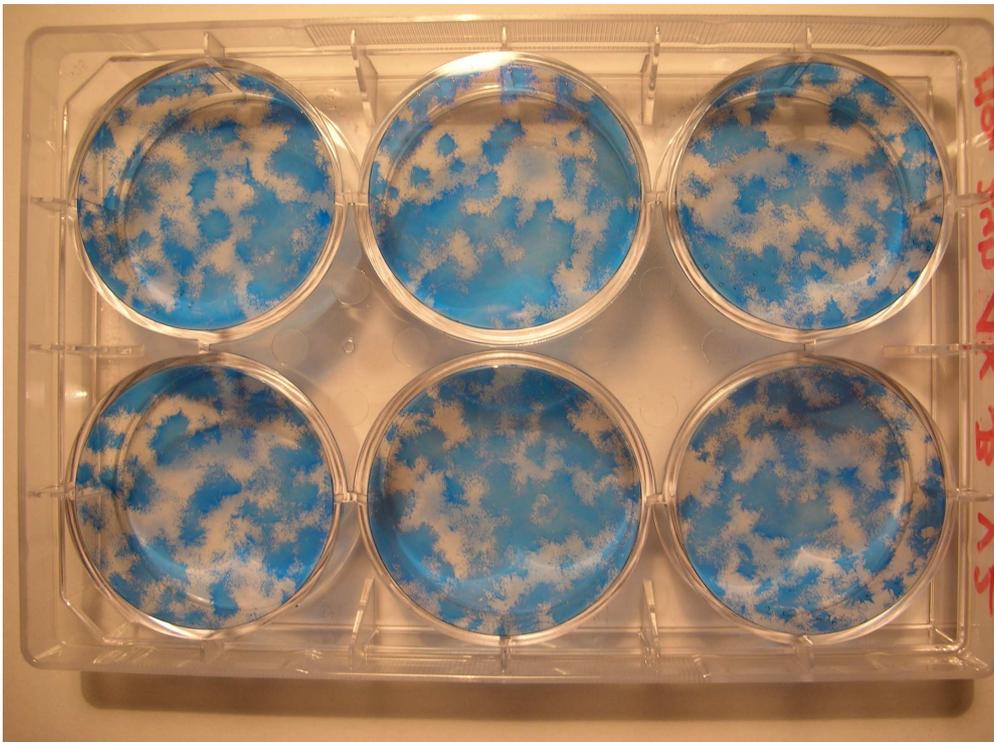


Abb. 3.21b: KoBi HEL 24h Magnevist 1x

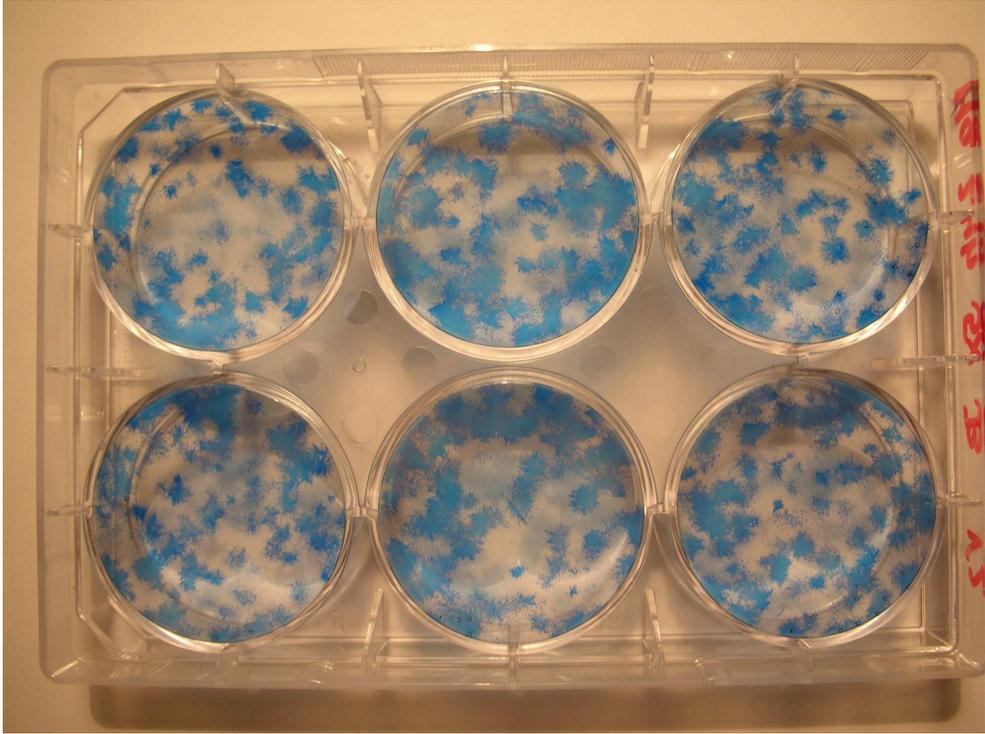


Abb. 3.21c: KoBi HEL 24h Magnevist 5x

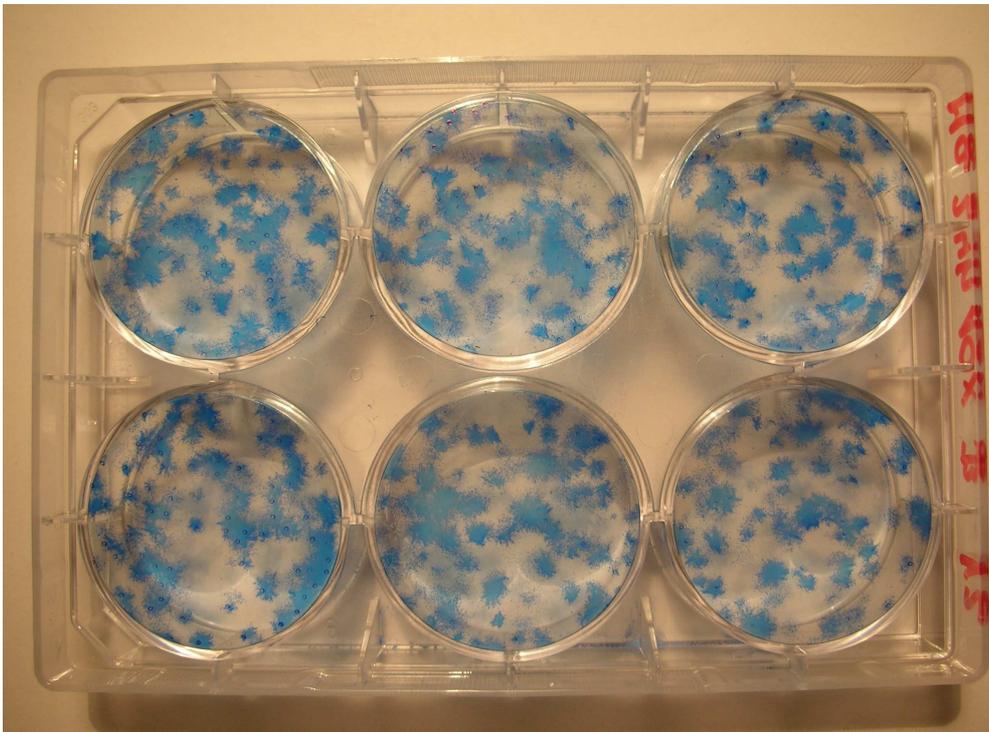


Abb. 3.21d: KoBi HEL 24h Magnevist 10x

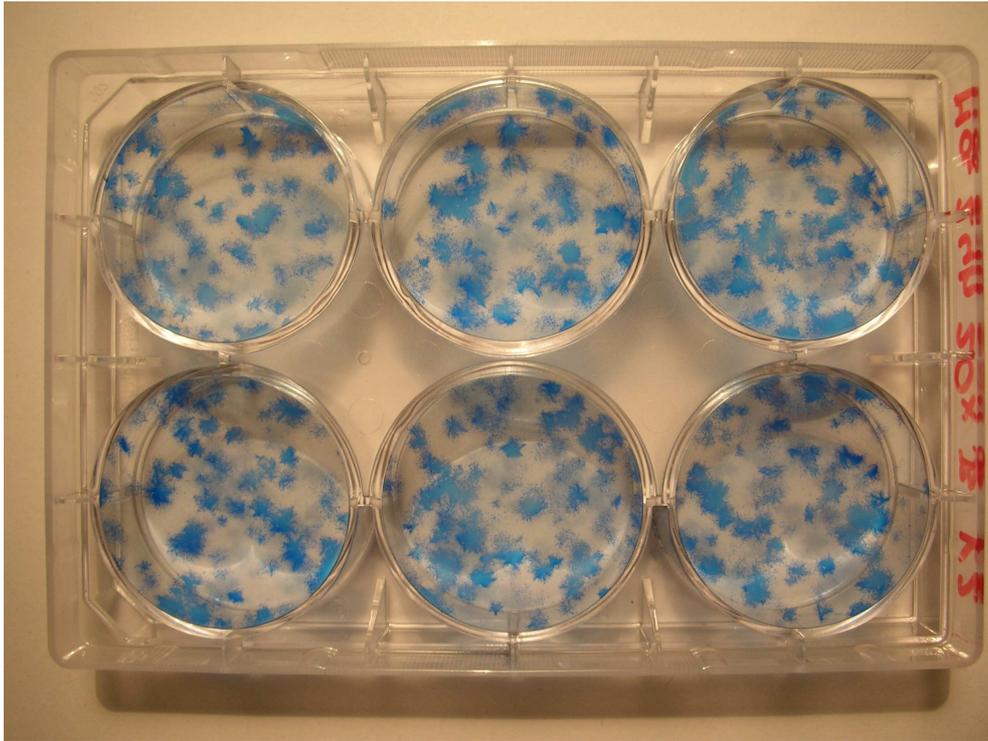


Abb. 3.21e: KoBi HEL 24h Magnevist 20x

Abb. 3.21a-e zeigen die mit Magnevist für 24 Stunden inkubierten Wells in aufsteigender Konzentration im Vergleich zur Kontrolle. Bereits makroskopisch ist eine Abnahme der Koloniebildung mit zunehmender Kontrastmittelkonzentration erkennbar.

	Co	R1	R5	R10	R20	G1	G5
MW	106,2	105,9	104,0	103,1	108,3	98,7	100,3
Stabw	15,0	18,3	15,2	16,4	8,6	15,4	13,9
KM/Ko [%]	100,0	99,7	97,9	97,1	102,0	92,9	94,4
	G10	G20	Ma1	Ma5	Ma10	Ma20	
MW	102,2	95,8	108,8	95,3	78,3	80,4	
Stabw	12,5	18,5	15,5	12,8	20,0	14,2	
KM/Ko [%]	96,2	90,2	102,4	89,7	73,7	75,7	

Tabelle 3.11 zeigt durchschnittliche Kolonienzahl, deren Standardabweichung und Koloniebildungsrate im Vergleich zur Kontrolle der HEL in der 24-Stunden-Gruppe

Co= Kontrolle, R1= Resovist 1-fache Konzentration, R5= Resovist 5-fache Konzentration, R10= Resovist 10-fache Konzentration, R20= Resovist 20-fache Konzentration, G1= Gadovist 1-fache Konzentration, G5= Gadovist 5-fache Konzentration, G10= Gadovist 10-fache Konzentration, G20= Gadovist 20-fache Konzentration, Ma1= Magnevist 1-fache Konzentration, Ma5= Magnevist 5-fache Konzentration, Ma10= Magnevist 10-fache Konzentration, Ma20= Magnevist 20-fache Konzentration

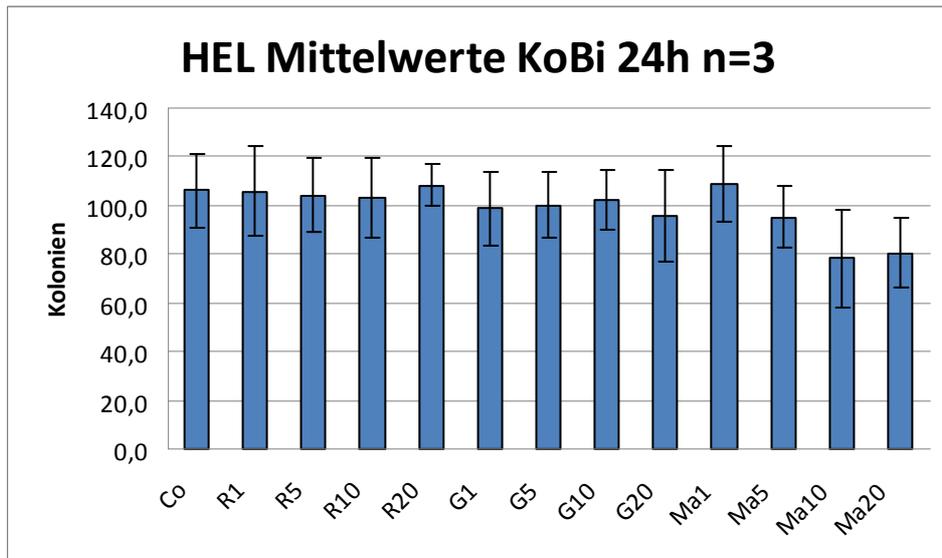


Abb.3.22 zeigt graphisch Kolonienzahl und Standardabweichung der embryonalen Lungenfibroblasten nach 24-stündiger KM-Exposition

Co= Kontrolle, R1= Resovist 1-fache Konzentration, R5= Resovist 5-fache Konzentration, R10= Resovist 10-fache Konzentration, R20= Resovist 20-fache Konzentration, G1= Gadovist 1-fache Konzentration, G5= Gadovist 5-fache Konzentration, G10= Gadovist 10-fache Konzentration, G20= Gadovist 20-fache Konzentration, Ma1= Magnevist 1-fache Konzentration, Ma5= Magnevist 5-fache Konzentration, Ma10= Magnevist 10-fache Konzentration, Ma20= Magnevist 20-fache Konzentration

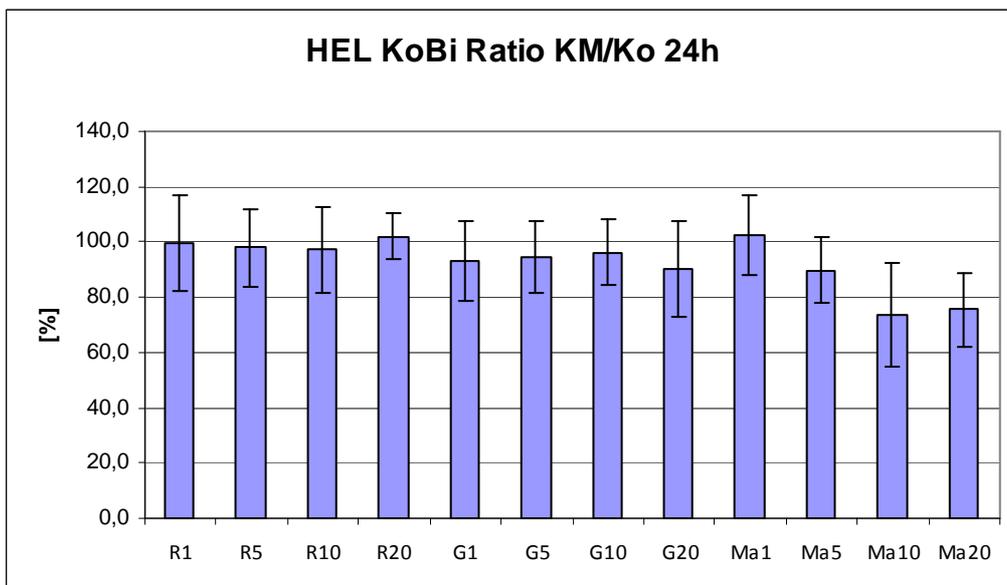


Abb. 3.23 stellt die Koloniebildungsraten der 24-Stunden-Gruppe im Vergleich zur Kontrolle dar, die Kontrolle ist auf 100% gesetzt

Co= Kontrolle, R1= Resovist 1-fache Konzentration, R5= Resovist 5-fache Konzentration, R10= Resovist 10-fache Konzentration, R20= Resovist 20-fache Konzentration, G1= Gadovist 1-fache Konzentration, G5= Gadovist 5-fache Konzentration, G10= Gadovist 10-fache Konzentration, G20= Gadovist 20-fache Konzentration, Ma1= Magnevist 1-fache Konzentration, Ma5= Magnevist 5-fache Konzentration, Ma10= Magnevist 10-fache Konzentration, Ma20= Magnevist 20-fache Konzentration

3.2.3. HUVEC

Da die Koloniebildungsfähigkeit der embryonalen Lungenbindegewebszellen lediglich nach 24-stündiger Exposition unter den beiden Höchstkonzentrationen signifikant alteriert war, konnte man die Untersuchung der Nabelschnur-Endothelzellen auf diese Bedingungen fokussieren. Die Anzahl der gebildeten Kolonien ist vom individuellen Wachstumsverhalten und den Anforderungen einer Zelllinie abhängig, sodass die Absolutzahlen zwischen HEL zu HUVEC nicht verglichen werden können.

Die durchschnittliche Anzahl der gebildeten Kolonien beträgt unter Kontrollbedingungen 58,2, SD 5,4. Bei Inkubation mit Resovist und Gadovist sind die Werte im Vergleich zur Kontrollgruppe leicht erhöht ohne sich signifikant von letzterer zu unterscheiden. Sie liegen zwischen 102,7% (Resovist 10x) und 110,1% (Gadovist 20x) bezogen auf die Kontrolle(100%), $p > 0,05$.

Nach 24-stündiger Inkubation der Nabelschnur-Endothelzellen mit Magnevist ist die Anzahl der ausgezählten Kolonien vermindert: Magnevist 10x 92,1% der Kontrolle und Magnevist 20x 88,8% der Kontrolle. Die Herabsetzung ist nicht statistisch signifikant.

	Co	R10	R20	G10	G20	Ma10	Ma20
MW	58,2	59,8	60,2	60,3	64,1	53,6	51,7
Stabw	5,4	5,9	5,1	5,5	6,7	6,6	7,2
KM/Ko [%]	100	102,7	102,9	103,6	110,1	92,1	88,8

Tabelle 3.12 zeigt die Ergebnisse des Koloniebildungsassays der Nabelschnur-Endothelzellen: Mittelwerte der gebildeten Kolonien, deren Standardabweichung und Bildungsrate in Bezug auf die Kontrolle

Co= Kontrolle, R10= Resovist 10-fache Konzentration, R20= Resovist 20-fache Konzentration, G10= Gadovist 10-fache Konzentration, G20= Gadovist 20-fache Konzentration, Ma10= Magnevist 10-fache Konzentration, Ma20= Magnevist 20-fache Konzentration

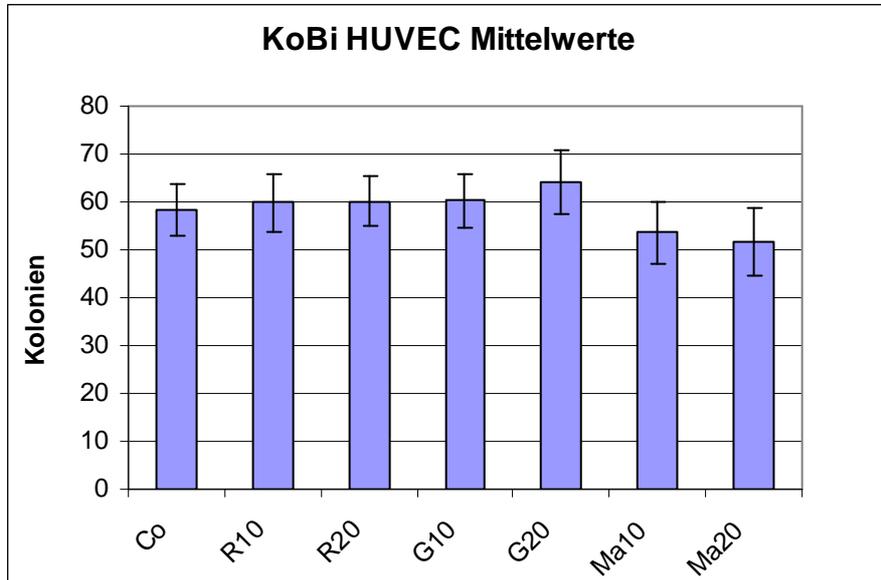


Abb.3.24: graphische Darstellung von Kolonienzahl der HUVEC mit Standardabweichung

Co= Kontrolle, R10= Resovist 10-fache Konzentration, R20= Resovist 20-fache Konzentration, G10= Gadovist 10-fache Konzentration, G20= Gadovist 20-fache Konzentration, Ma10= Magnevist 10-fache Konzentration, Ma20= Magnevist 20-fache Konzentration

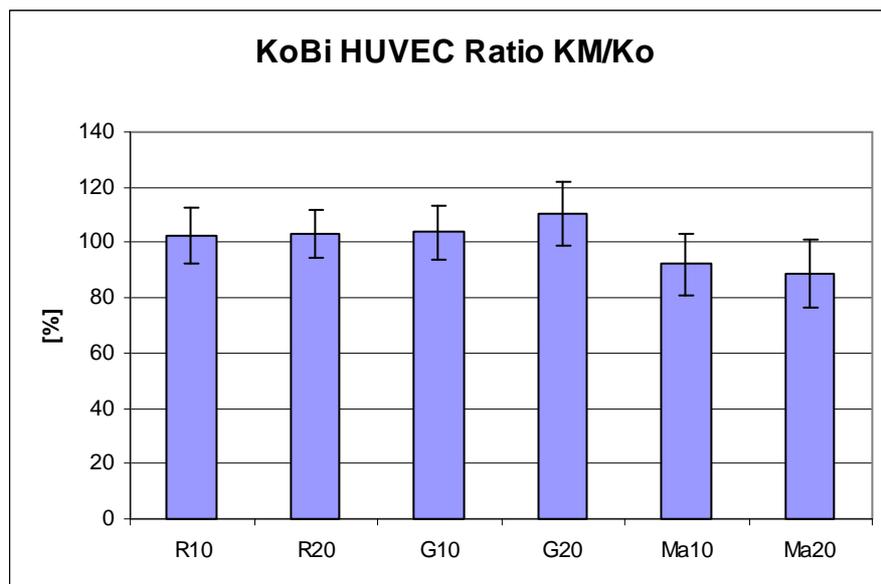


Abb. 3.25 zeigt graphisch die Koloniebildungsrate der HUVEC im Vergleich zur Kontrolle(100%)

Co= Kontrolle, R10= Resovist 10-fache Konzentration, R20= Resovist 20-fache Konzentration, G10= Gadovist 10-fache Konzentration, G20= Gadovist 20-fache Konzentration, Ma10= Magnevist 10-fache Konzentration, Ma20= Magnevist 20-fache Konzentration

3.3. Zellzyklus

Die in der Durchflusszytometrie gemessenen Phasenanteile und deren Verschiebungen im Vergleich zur Kontrolle spiegeln die Bedingungen in der Zellkultur und die Anpassungsmechanismen auf zellulärer Ebene wider.

Ziel der Zellzyklusanalyse war es zu betrachten, inwiefern die Inkubation mit einem der KM eine Veränderung der Anteile in den jeweiligen Zyklusphasen bewirkt. Dazu wurden 2 verschiedene Ansätze gewählt: Die Zellzyklusbestimmung erfolgte zunächst unmittelbar nach Ende der Inkubation mit dem KM. Bei der zweiten Probe fand die Analyse 24 Stunden nach Ende der Inkubation statt. Hierbei sollte erfasst werden, ob und in welchem Maße der potentielle Einfluss der Noxe reversibel ist.

Die Inkubation fand mit dem 20-fachen der normalen plasmatischen KM-Konzentration statt.

Die Aufarbeitung der Durchflusszytometrie durch die Software ergibt folgende Graphik: Auf der Abszisse eingetragen ist der Wert der PI-Fluoreszenz, wodurch der gesamte DNA-Gehalt gemessen wird. Die Werte der Ordinate beziehen sich auf die FITC-Fluoreszenz, sie stellt ein Maß für die neusynthetisierte DNA dar.

Beim Gating werden die ausgezählten Ereignisse einer der drei verschiedenen Punktwolken R3, R4 oder R5 zugeordnet. R3-R5 werden als Prozentwerte bezogen auf die Gesamtzahl der Ereignisse ausgedrückt. Zellkerne, die R3 zugeordnet werden, besitzen einen einfachen DNA-Gehalt (≈ 200 auf der linearen Achse) bei keiner neusynthetisierten DNA, was der G_1 -Phase entspricht. Ereignisse, die zu R4 zugeordnet wurden, zeichnen sich durch eine doppelten DNA-Gehalt (≈ 400) aus, was die G_2/M -Phase charakterisiert. Die

dritte Punktwolke R5 wird gebildet durch Ereignisse mit hoher FITC-Fluoreszenz und entspricht somit der S-Phase.

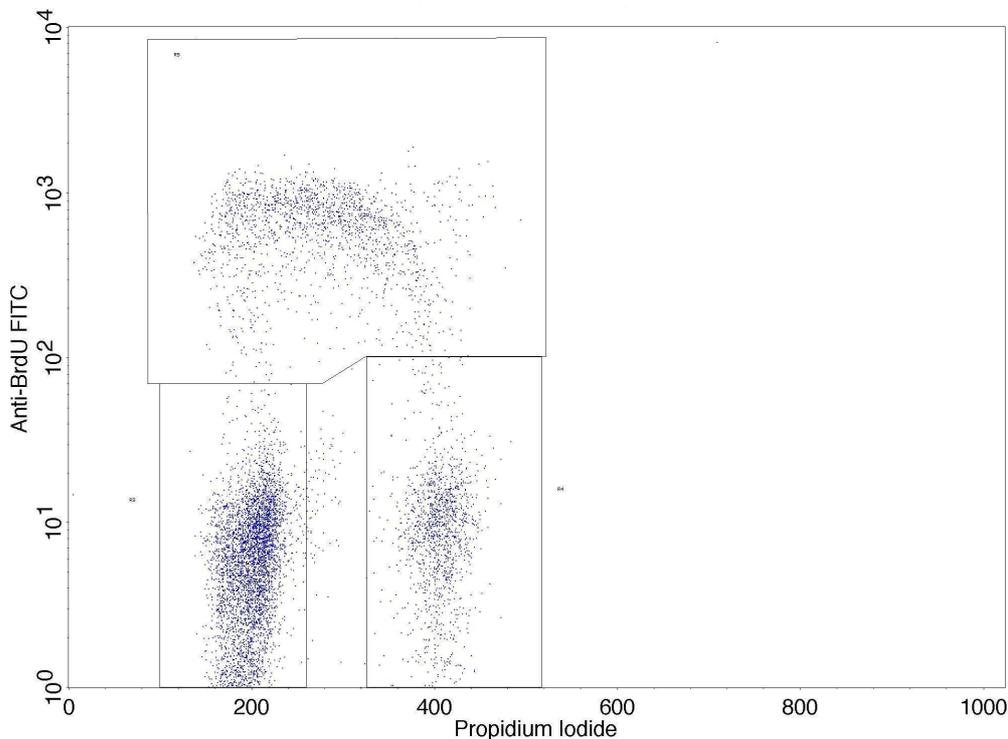


Abb 3.26 Zellzyklusanalyse und Gating mit dem FACSort am Beispiel der 24h-Kontrolle

Zellzyklus direkt nach Ende der KM-Inkubation:

Unter allen Versuchsbedingungen befindet sich der Großteil der Zellen in der G1-Phase.

Der G1-Phasenanteil liegt unter Kontrollbedingungen und bei Resovist- und Gadovist-Exposition relativ einheitlich um 60% (Kontrolle 57,4%, Gadovist 61,9%, Resovist 64,8%) und ist im Vergleich dazu beim Magnevist-Zellpool signifikant erhöht (Magnevist 79,1%), $p < 0,05$.

Nach Inkubation mit Magnevist beträgt der Anteil der Lungenfibroblasten in der S-Phase 2,9%, in den beiden anderen KM-Gruppen und bei der Kontrolle befindet er sich zwischen 16,7% (Gadovist) und 21% (Resovist), $p < 0,05$.

Beim G2/M-Anteil zeigen sich zwischen den Gruppen keine wesentlichen Abweichungen. Er ist am niedrigsten nach Inkubation mit Resovist (13%), unter Kontrollbedingungen am höchsten (23,1%), die Werte für Magnevist (17%) und Resovist bewegen sich dazwischen.

	Kontrolle direkt	Resovist direkt	Gadovist direkt	Magnevist direkt
G1	57,4%	64,8%	61,9%	79,1%
G2/M	23,1%	13%	19,8%	17%
S	18,1%	21%	16,7%	2,9%

Tabelle 3.13: zeigt die durchschnittlichen Zellzyklusanteile direkt nach Ende der Inkubation

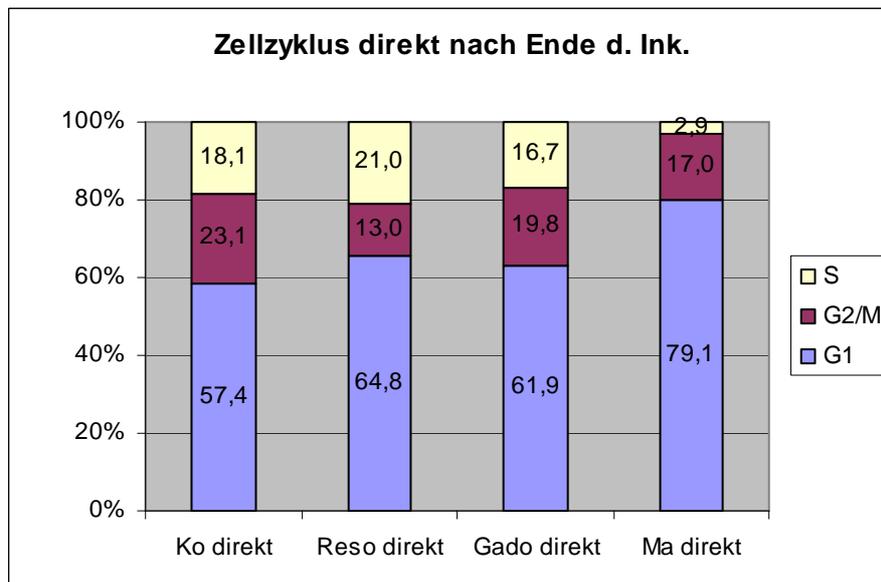


Abb. 3.27 zeigt die Phasenverteilung direkt nach Ende der Inkubation mit dem jeweiligen Kontrastmittel

Zellzyklus 24 Stunden nach Ende der Inkubation:

24 Stunden nach Ende der Inkubation sind die Phasenanteile in der Kontrollgruppe im Vergleich zur Messung unmittelbar nach Inkubationsende weitgehend konstant (G1-Phase direkt 57,4%, 24h post 52%; S-Phase direkt 18,1%, 24h post 25,1%; G2/M-Phase direkt 23,1%, 24h post 18,6%).

Nach Resovist-Inkubation zeigen sich zwischen den beiden Messungen keine signifikanten Veränderungen der Zyklusphasen: G1 direkt 64,8% , 24h post 68,1%; S direkt 21%, 24h post 18,6%; G2/M direkt 13%, 24h post 11,8%.

Im Gadovist-Zellpool ist der S-Phasen-Anteil 24 Stunden nach Ende der Inkubation um 10% angestiegen (S-Phase direkt 16,7%, S-Phase 24h post 26,8%). Der G1-Anteil ist dagegen leicht gesunken (G1 direkt 61,9, G1 24h post 57,2), ebenso der G2/M-Anteil, $p > 0,05$.

Die deutlichsten Verschiebungen ergeben sich in der Magnevist-Gruppe, mit einer Zunahme des S-Phasen-Anteils um 35,6% auf 38,5%, $p < 0,05$. Im Gegenzug dazu ist die G1-Phase prozentual verringert (G1 direkt 79,1%, 24h post 37,8%, $p < 0,05$). Bei der G2/M-Phase sind die Veränderungen nur gering (G2/M direkt 17%, 24h post 21,7%).

Mit Ausnahme von Magnevist macht die G1-Phase weiterhin den größten Phasenanteil aus: G1 zwischen 52% (Kontrolle) und 68% (Resovist) vs. 37,8%(Magnevist).

	Kontrolle 24h	Resovist 24h	Gadovist 24h	Magnevist 24h
G1	52,0%	68,1%	57,2%	37,8%
G2/M	18,6%	11,8%	14,9%	21,7%
S	25,1%	18,6%	26,8%	38,5%

Tabelle 3.14: Zellzyklusanteile 24 Stunden nach Ende der Inkubation

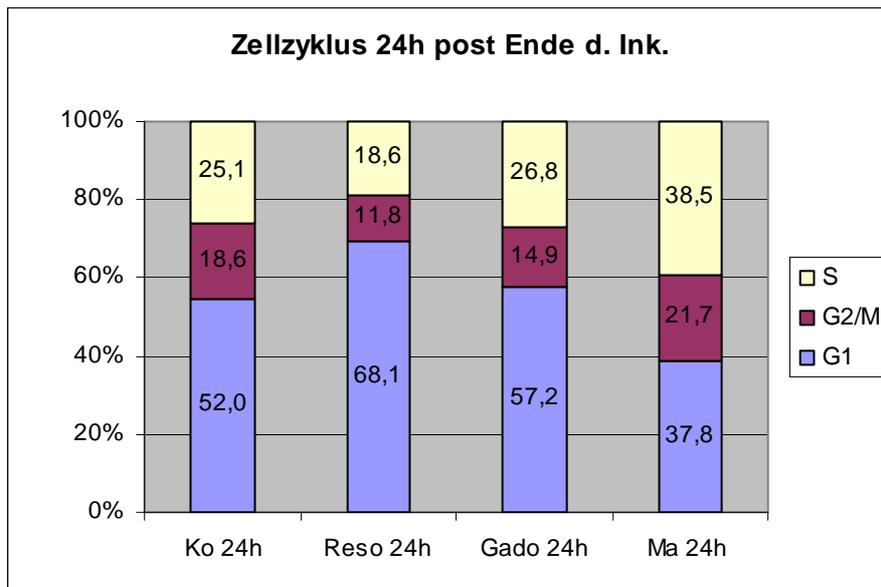


Abb. 3.28 illustriert die Phasenverteilung 24 Stunden nach Ende der KM-Exposition

3.4. Mitochondriales Transmembranpotential

Die Messung des mitochondrialen Transmembranpotentials erlaubt es, Aussagen über die Vitalität der Zellen bzw. eine stattgehabte Induktion von Apoptose durch die Kontrastmittel zu treffen. Im Gegensatz zu Proliferationskinetik, KoBi und Zellzyklusanalyse wurden die Alterationen in der Atmungskette lediglich exemplarisch untersucht. Bei Auftreten von Apoptose sind die Zellen nicht mehr in der Lage, das mitochondriale Transmembranpotential aufrecht zu erhalten und die Atmungskette bricht zusammen. Die entstehende Kurve würde sich derer der Positivkontrolle mit CCCP angleichen.

In unserer Untersuchung besteht für die Kontrolle und die drei Kontrastmittelansätze ein aufrechterhaltenenes Transmembranpotential, das sich in den 4 Kurven rechts um den TMRE Wert von 10^3 zeigt. Die beiden Kurven links stellen die unmarkierte Negativkontrolle und die CCCP-Positivkontrolle dar, bei denen kein Transmembranpotential messbar ist.

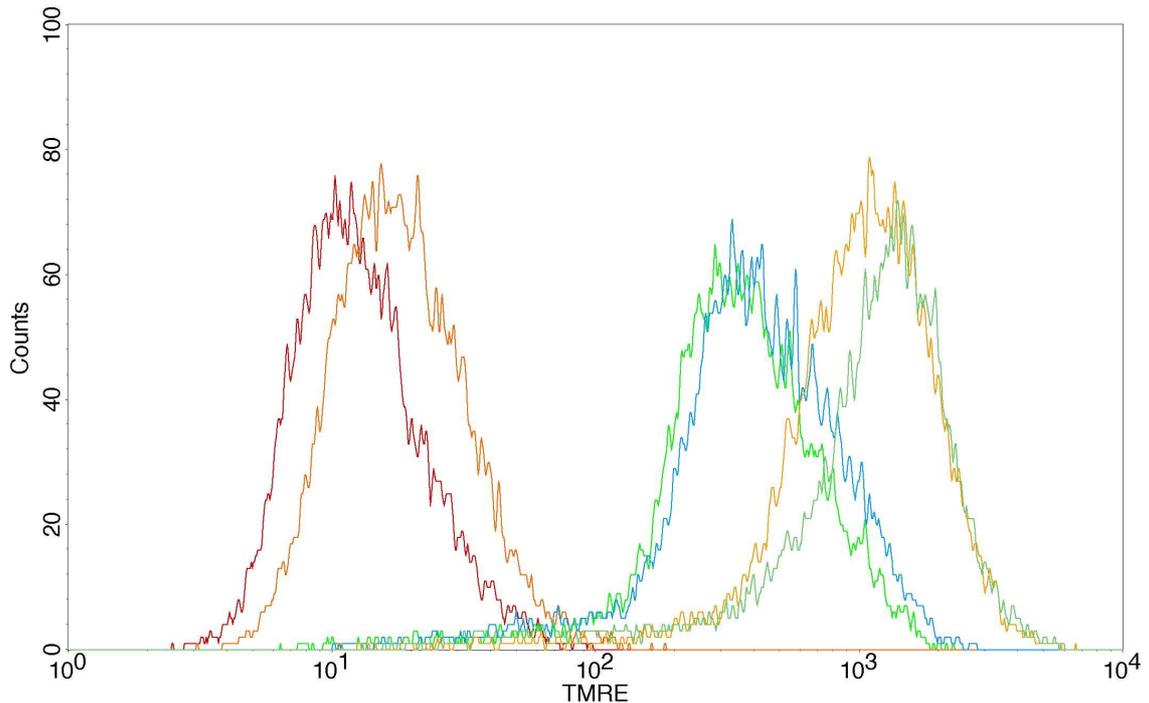


Abb. 3.29: Die graphische Darstellung des mitochondrialen Transmembranpotentials zeigt, dass es bei keinem der Kontrastmittel zu einer Verminderung desselben kommt. Links: Negativkontrolle ohne Applikation von Fluorochromen und Positivkontrolle mit CCCP führt zu Zusammenbruch des Potentials, Gruppe rechts: Kontrolle, Resovist, Gadovist und Magnevist, die keine Veränderung i.S.e. Apoptose induzieren

3.5. Immunfluoreszenz

Im Gegensatz zu Proliferationskinetik, KoBi und Zellzyklusanalyse lassen die Immunfluoreszenz-Aufnahmen der Zellen nur eine qualitative Beurteilung der zellulären Integrität zu. Das Ziel besteht darin, zellmorphologische Veränderungen nach Ende der Inkubation mit der maximalen zwanzigfachen Kontrastmittelkonzentration unter dem Fluoreszenzmikroskop zu erfassen. Die Analyse der ausgesäten Zellen erfolgt unter 200- und 400-facher

Gesamtvergrößerung. Die Kameraergrößerung entspricht nicht exakt der Vergrößerung durch das Okular.

Vimentin ist Bestandteil des Zytoskeletts und als solcher an der Aufrechterhaltung der charakteristischen zellulären Gestalt beteiligt. Es gehört den Intermediärfilamenten an, denen über die Strukturgebung hinaus auch eine Rolle bei der interzellulären Signaltransduktion zukommt. Ein Vorliegen eines zellulären Schadens lässt sich durch eine irreguläre Anfärbung des Vimentingerüsts erkennen, die Grenzen der Zellen gegeneinander sind nicht klar definierbar. Bei Fibroblasten ist ein Verlust der charakteristischen langgestreckten Morphologie mit Ausläufern zu erwarten. Die Vimentin-Färbung charakterisiert Zellen mesenchymalen Ursprungs und ist damit nicht Fibroblasten-spezifisch.

Die Vimentin-Färbung wurde mit einer DAPI-Färbung zur Darstellung der Zellkerne kombiniert. Dadurch können zum einen die Fibroblasten besser gegeneinander abgegrenzt werden, zum anderen werden mögliche Veränderungen in der Kernmorphologie sichtbar gemacht. Inhomogene Anfärbung und unregelmäßige Kernform mit Aussackungen sind Kriterien für einen Schaden auf nukleärer Ebene.

Die kombinierte Färbung wird durch Projektion der Einzelaufnahmen übereinander erzielt.

3.5.1. HEL

HEL-Kontrolle

Unter Kontrollbedingungen mit kombinierter Vimentin- und DAPI-Färbung zeigt sich das für Fibroblasten charakteristische Bild mit feinen gut abgrenzbaren Zellausläufern und homogen ausgebildetem Zytoskelett. Die ovalen Zellkerne sind einheitlich angefärbt.

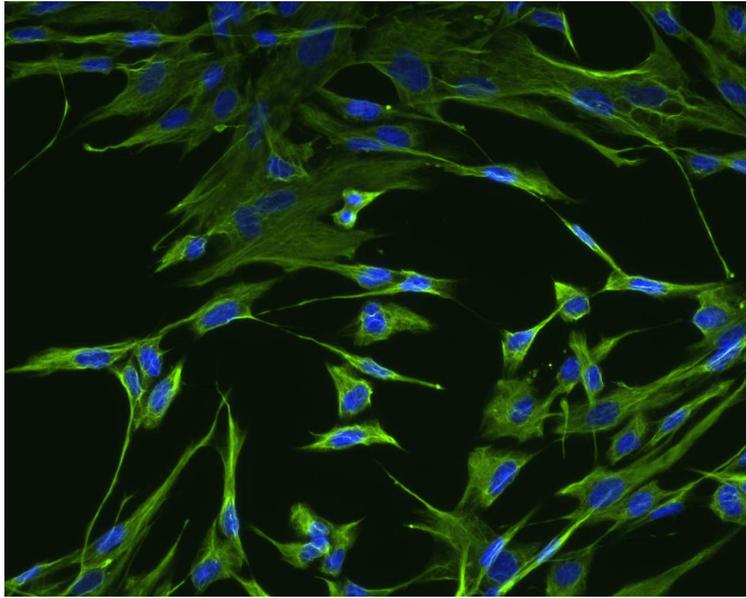


Abb. 3.30: HEL, Kontrolle, Doppelfärbung, 200-fache Vergrößerung, Vimentin = grün, Zellkern = blau

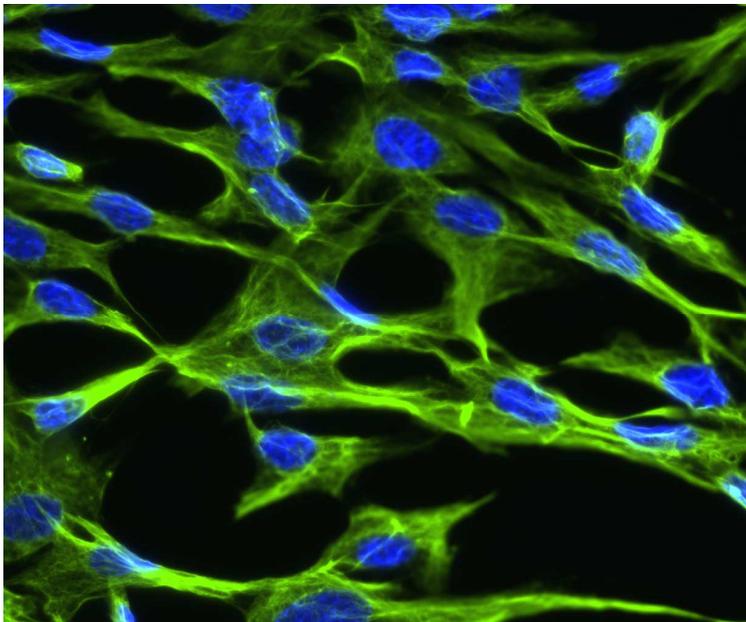


Abb. 3.31: Kontrolle, Doppelfärbung, 400-fache Vergrößerung, Vimentin = grün, Zellkern = blau

HEL- Gadovist, 20-fache Konzentration

Nach Inkubation mit Gadovist sind keine zytoskelettalen Veränderungen im Sinne einer Kontrastmitteltoxizität erkennbar. Die DAPI-Färbung zeigt zentral gelegene ovale Zellkerne ohne Deformitäten.

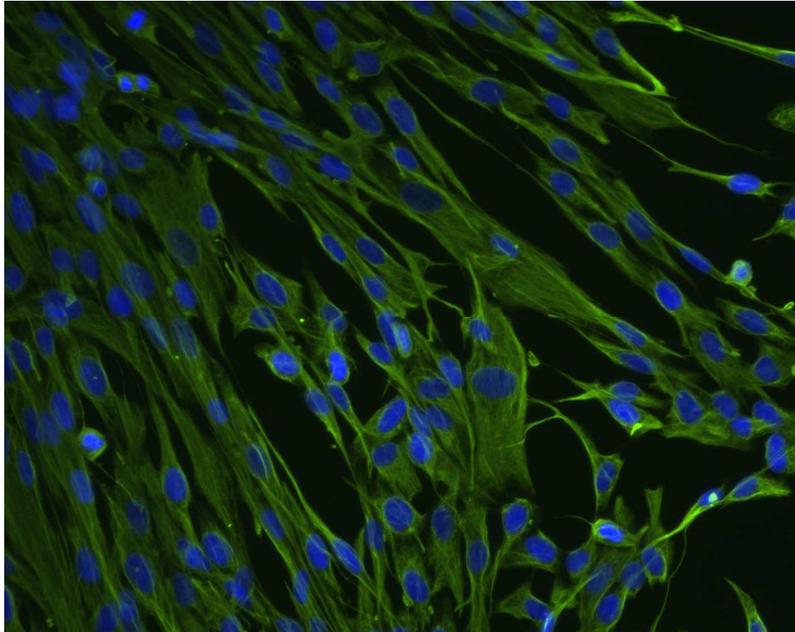


Abb. 3.32: Gadovist, Doppelfärbung, 200-fache Vergrößerung

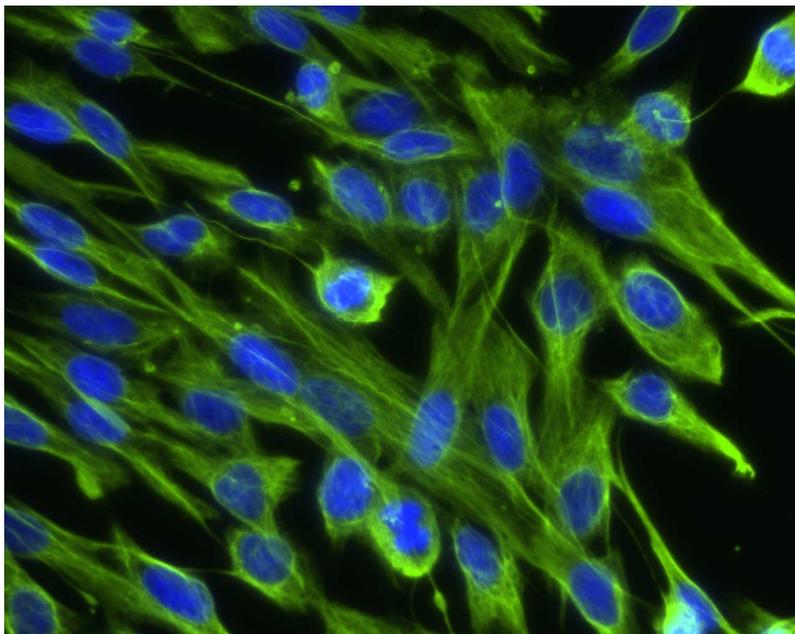


Abb. 3.33: Gadovist, Doppelfärbung, 400-fache Vergrößerung

HEL- Magnevist, 20-fache Konzentration

Auch bei Fibroblasten, die mit Magnevist inkubiert wurden, ist die feingewebige Architektur der Intermediärfilamente erhalten. Veränderungen in der Zellkernmorphologie können nicht festgestellt werden.

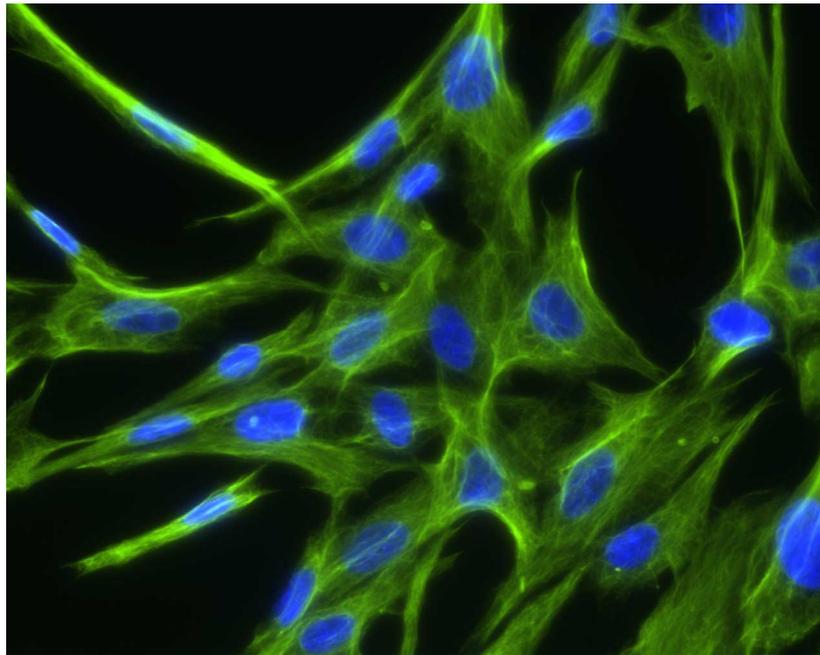


Abb. 3.34: Magnevist, Doppelfärbung, 400-fache Vergrößerung

HEL- Resovist, 20-fache Konzentration

Nach Exposition gegenüber Resovist treten Inhomogenitäten der Färbung auf, die darauf zurückzuführen sind, dass in Fibroblasten eingelagertes Eisenoxid die Fluoreszenz von Vimentin und DAPI überlagert. Ein regelmäßig ausgebildetes zytoskeletales Gerüst und eine normale Kernmorphologie sind erhalten.

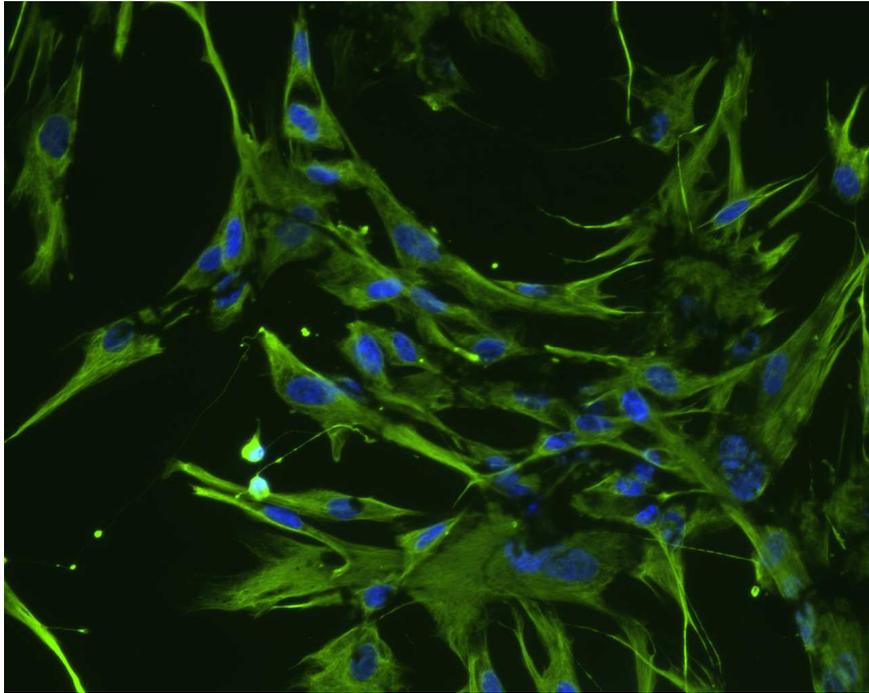


Abb. 3.35: Resovist, Doppelfärbung, 200-fache Vergrößerung

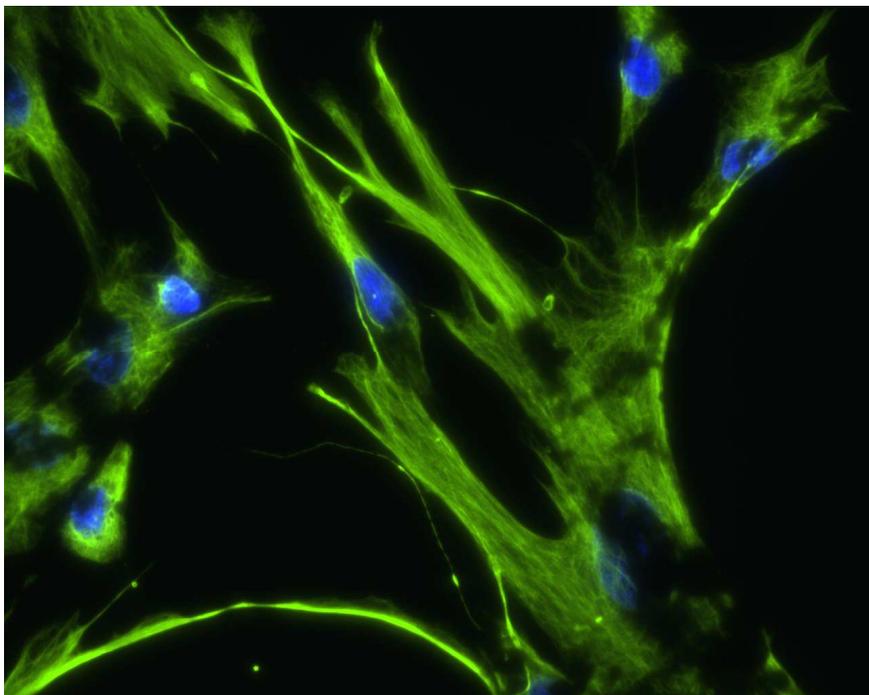


Abb. 3.36: Resovist, Doppelfärbung, 400-fache Vergrößerung

3.5.2. Exemplarische Darstellung von Endothelzellen in der Immunfluoreszenz

Da im Rahmen der Promotionsarbeit keine Untersuchungen an Nabelschnur-Endothelzellen nach KM-Exposition mittels Immunfluoreszenz durchgeführt wurden, soll im Folgenden nur kurz auf Aspekt und Anfärbbarkeit von Endothelzellen eingegangen werden.

Endothelzellen besitzen nach Anfärbung mit Anti-Vimentin-Antikörpern ein polygonales Aussehen in der Monokultur (Abb. 3.37).

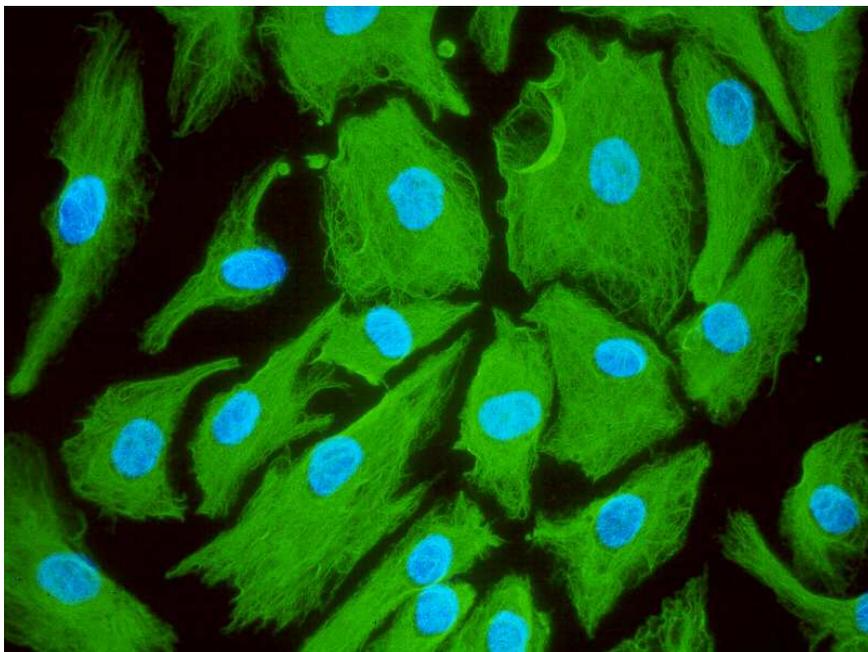


Abb. 3.37: Endothelzellen, kombinierte Vimentin-DAPI-Färbung, 400-fache Vergrößerung

In einer Kokultur bilden die Endothelzellen die Tunica intima, welche die innerste Schicht im Gefäßquerschnitt darstellt, und sind zirkulär angeordnet (Abb. 3.38). Die Lamina elastica interna bildet die Trennung zur Tunica media, die aus glatten Muskelzellen besteht.

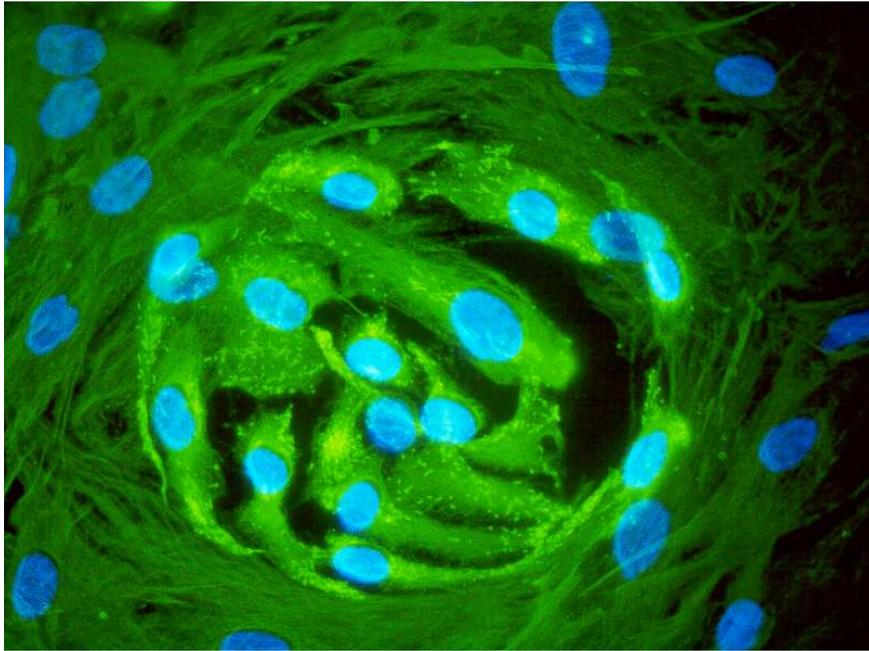


Abb. 3.38: Kokultur aus Endothelzellen (vWF- und Vimentin-Färbung) und glatten Muskelzellen (Vimentin-Färbung), 400-fache Vergrößerung

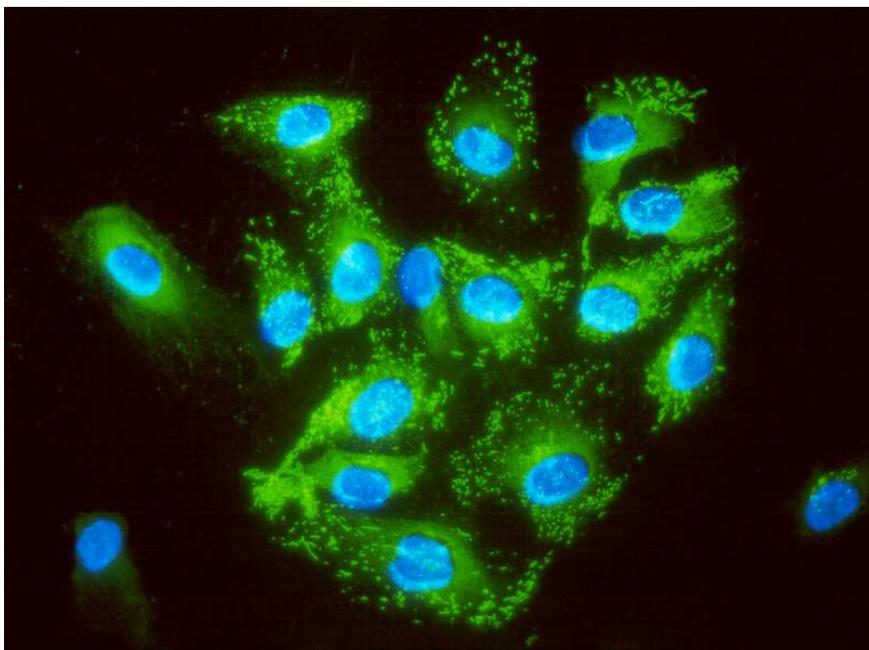


Abb. 3.39: Darstellung von Endothelzellen in vWF-Färbung, 400-fache Vergrößerung

Der von Endothelzellen synthetisierte von Willebrandt Faktor stellt einen weiteren Ansatzpunkt für die Färbung dar (Abb. 3.37, Abb. 3.38). vWF liegt zytoplasmatisch und in Vakuolen , den Weibel-Pallade-Körperchen vor. Durch Antikörper gegen vWF können Endothelzellen und Megakaryozyten spezifisch markiert werden, was in Kokulturen der besseren Abgrenzung gegenüber den anderen Zellreihen dient (s. Abb.3.38).

4. Diskussion

4.1. Einsatz von MR-KM in der Schwangerschaft

4.1.1. Diaplazentärer Transfer, Darstellung der Plazenta, fetale KM-Mengen

a) Prinzip der Plazentagängigkeit

Die Barriere zwischen mütterlicher Zirkulation und fetalen Chorionzotten besteht aus einer Schicht Chorionepithel, das sich wie eine Lipidmembran verhält. Der Transfer eines Agens, z.B. von Medikamenten geschieht über Diffusion, der Grad des Austausches ist abhängig von Molekulargewicht und Fettlöslichkeit der Substanz ^[8]. Im Fall von Gd-KM ist die Diffusion erschwert durch die Wasserlöslichkeit und das hohe Molekulargewicht (500-850 kDa) der Verbindung.

b) Bildgebende Darstellung der Plazenta nach KM-Gabe

Bei Kaninchen wurde die höchste Kontrastmittel-Konzentration in der Plazenta 5 Minuten nach Injektion gemessen ^[70]. Ein Anteil von 18-30% der initialen KM-Menge erreichte bei einer Messung an Ratten die Plazenta, wobei sich der Peak unmittelbar p.i. verzeichnete und die KM-Menge nach 24h auf 1/100 abgesunken war ^[72].

Marcos et al. untersuchten die Darstellbarkeit der Plazenta nach Injektion von 0,1mmol/kg Gadopentetat bei 11 Schwangeren im 2. und 3. Trimenon: Das plazentäre Enhancement war unmittelbar p.i. am stärksten und ging dem myometrialen Enhancement deutlich voraus ^[61]. Tanaka et al. setzten die Kontrastmittel-verstärkte MRT zur Bildgebung bei 6 Patientinnen mit hohem Risikoprofil für Placenta accreta ein ^[100].

c) Kontrastmittelkonzentrationen im fetalen Organismus und Anreicherung
Novak et al. fanden an Kaninchen heraus, dass der Anteil des KM, welcher in den fetalen Organismus übergeht, ausreichend hoch ist, um Nieren und ableitende Harnwege bildgebend darzustellen. Potentiell toxische Effekte von Gadopentetat, insbesondere im Bereich der Nieren, wo eine Anreicherung stattfindet, können nicht ausgeschlossen werden ^[70]. Ein weiteres Problem stellt die unklare Pharmakokinetik im Feten dar. Nach fetaler Exkretion ins Fruchtwasser kann das Kontrastmittel oral resorbiert werden. In Verbindung mit den ohnehin unreifen Nieren kann dies zu einer deutlich verlängerten Halbwertszeit führen. Damit steigt das Risiko der Freisetzung von Gadolinium-Ionen aus ihrer Komplexbindung.

Untersuchungen zum Metabolismus bei trächtigen Ratten mit ¹⁴C-markiertem Gadodiamid zeigten bei den Feten eine 170-fach niedrigere Aktivität im Vergleich zu den mütterlichen Werten und konnten 24h nach Applikation nur noch Spuren des KM nachweisen. Eine mögliche Erklärung liefert die Rückdiffusion über die Plazenta entlang des Konzentrationsgefälles und die darauffolgende mütterliche Ausscheidung ^[72].

4.1.2. Mutagenität und Teratogenität von MR-Kontrastmitteln

a) Tierexperimentelle Studien

Rofsky et al. konnten nach intraperitonealer Gadopentetat-Injektion und Durchführung einer Magnetresonanztomographie bei Mäusen in der Frühschwangerschaft weder vermindertes Gewicht noch Fehlbildungen im Vergleich zur Kontrollgruppe feststellen ^[87].

Nach Gadoteridol-Gabe im Tierexperiment in Dosierung bis zu 10mmol/kg KG, was der 100-fachen menschlichen Dosis entspricht, waren weder teratogene Effekte noch Alterationen in der postpartalen Entwicklung nachweisbar ^[96].

Rofsky et al. fanden keinen Hinweis auf instabile chromosomale Veränderungen nach Administration von Gd-DTPA und Durchführung einer

MRT ^[86]. Dieses Ergebnis ist übereinstimmend mit den Resultaten des Kontrastmittelherstellers, der das mutagene Potential mithilfe bakterieller Test an Mäuseembryo-Fibroblasten und Rattenhepatozyten untersuchte ^[70].

Auch für Gadoversetamid (OptiMARK) konnten Mutagenität, Teratogenität und fetale Wachstumsretardierung nicht nachgewiesen werden ^[115].

Bei der wiederholten i.v.-Verabreichung von Gadobenate-Dimeglumine in verschiedenen Konzentrationen (0,3mmol/kg/d, 0,9mmol/kg/d, 2,0mmol/kg/d) zeigten Kaninchen-Feten dagegen eine Verminderung der Gewichtszunahme sowie eine leicht erhöhte Inzidenz von Frühaborten. Unter der Maximalkonzentration, welche der 7-fachen normalen Dosis beim Menschen entsprach, traten Malformationen der Augen und Skelettdeformitäten auf ^[73].

b) Humantoxikologische Erfahrung

Der vulnerabelste Zeitpunkt in der SS bezüglich teratogener Einflüsse liegt im 1. Trimenon während der Organogenese. Eine Exposition mit embryotoxischen Substanzen unmittelbar post conceptionem würde zu einer erhöhten Inzidenz an Spontanaborten führen.

De Santis et al. untersuchten in einer retrospektiven Studie das Outcome von 26 Schwangerschaften mit Gd-DPTA-Exposition in der perikonzeptionellen Periode: Es kam zu 2 Spontanaborten, bei denen keine fetalen Malformationen als Ursache des Abortes festgestellt wurden. Bei den 23 Termingeburten traten keine Komplikationen in der Neonatalperiode auf, 2 der Neugeborenen besaßen lediglich ein niedriges Geburtsgewicht, ein Baby zeigte zwei Hämangiome ^[22].

Nach Gd-DTPA-Anwendung im 2. und 3. Trimenon bei V.a. uterine oder plazentäre Pathologien in 11 Schwangerschaften waren alle Neugeborenen gesund und ohne Auffälligkeiten ^[61].

Zur besseren Abgrenzung zwischen Plazenta und Myometrium bei V.a. Placenta accreta setzten Tanaka et al Gd-DTPA in 6 Fällen ein ohne Auftreten

von Komplikationen, die nach Entlassung einer weiteren Therapie bedurften [100].

Zum aktuellen Zeitpunkt liegt keine Evidenz zu kongenitalen Fehlbildungen oder Wachstumsverzögerung in Assoziation mit der Exposition gegenüber Gd-KM vor. Allerdings ist die Datenlage zu unklar, um Schlüsse auf die Unbedenklichkeit des Einsatzes von MR-KM für den Fetus zuzulassen.

4.1.3. Indikationen zur MRT mit KM in der Schwangerschaft

Der Einsatz der MRT während der Schwangerschaft bleibt Fällen vorbehalten, die durch Ultraschall-Diagnostik keine ausreichende Klärung erfahren haben. Er dient der Diagnosesicherung bzw. Überprüfung der Diagnose mit dem Ziel, durch Veränderung des therapeutischen Procederes das Outcome für Mutter und Feten zu verbessern. Ob die Verwendung von Kontrastmittel notwendig ist, muss von Fall zu Fall entschieden werden.

a) Mütterliche Indikationen

Der Nutzen der Magnetresonanzbildgebung in der Schwangerschaft ist vielseitig und reicht von der Abklärung eines akuten Abdomens über thrombembolische Geschehen bis hin zu geburtshilflichen Fragestellungen [7, 61, 100, 105, 108].

Eine essentielle Indikation ist auch das Staging von innerhalb der Schwangerschaft auftretenden malignen Tumoren, welches nicht auf einen Zeitpunkt nach der Entbindung hinausgezögert werden kann. Nicklas et al. bezeichnen die MRT als Verfahren der Wahl in den meisten Fällen aufgrund der Abwesenheit ionisierender Strahlen [69].

Auf der Suche nach der Ätiologie eines akuten Abdomens in der Schwangerschaft konnte bei 22 von 29 Patientinnen zur Diagnosefindung sogar auf die Gabe von MR-KM verzichtet werden [7].

Tanaka et al. beurteilten den Nutzen von KM-enhancer MRT im Vergleich zu T2gewichteten Sequenzen und Sonographie bei V.a. Placenta accreta mit dem Ergebnis, dass der Einsatz vor allem bei superoposteriorem Sitz der Placenta gerechtfertigt ist ^[100].

Bei der Diagnosestellung einer Beckenvenenthrombose erwies sich die MRT im Vergleich zur Sonographie als sensibler und lieferte eine bessere Abbildung der Ausdehnung ^[105].

b) Fetale Indikationen

Nach Injektion von 0,1mmol/kg Gadopentetat bei trächtigen Kaninchen findet sich eine fetale Anreicherung in Nieren und ableitenden Harnwegen, welche eine anatomisch-funktionelle Bildgebung ermöglicht, gleichzeitig aber den Feten gegenüber potentiell toxischem Gd-KM exponiert ^[70].

Bei V.a. fetale Malformationen ergeben sich aufgrund der höheren Sensitivität und Spezifität der MRT oft Konsequenzen i.S. e. Indikationsstellung zur Sectio, wie es z.B. bei Neuralrohrdefekten, Bauchwanddefekten oder Herzfehlern der Fall ist ^[95]. Es können auch Fehlbildungen ersichtlich werden, die implizieren, dass der Fetus ex utero nicht lebensfähig wäre und zu einer Interruptio führen. Kasprian und Liu konnten bei V.a. intrathorakale Fehlbildungen in der Sonographie wertvolle Informationen zur Quantifizierung der fetalen Lungenvolumina gewinnen, was zur Verbesserung des peri- und postnatalen Managements beitrug ^[51, 58].

Durch die Wahl schneller MR-Sequenzen (z.B. Haste, SSFSE) lassen sich fetale Bewegungsartefakte minimieren ^[45, 58].

In der Mehrzahl der MR-Untersuchungen aus fetaler Indikation kann auf die Gabe von Kontrastmittel verzichtet werden.

4.1.4. Richtlinien und Empfehlungen

2009 überarbeitete der Ausschuss für Humanarzneimittel (CHMP) der europäischen Arzneimittelbehörde (EMA) anlässlich der Fälle von NSF die Produktinformationen für Gd-KM. Die Anwendung in der Schwangerschaft wird demnach unabhängig von der Risikoklasse des Kontrastmittels nicht empfohlen, es sei denn, der klinische Zustand der Frau macht dessen Anwendung erforderlich ^[12].

Im ACR Guidance Document for safe MR Practices wird das Risiko der Langzeit-Exposition des Feten gegenüber freien Gd-Ionen nach in vivo Transmetallierung als real beurteilt. Somit ist die KM-Anwendung nur gerechtfertigt, wenn der Nutzen für die Schwangere im Vergleich zum potentiellen Schaden des Feten eindeutig überwiegt. Über den Einsatz von Gd-Chelaten solle von Fall zu Fall entschieden werden, Aufklärung der Patientin und schriftliche Einverständniserklärung sind Voraussetzung für die Durchführung ^[50].

Auch Patel et al. weisen trotz bislang fehlender Evidenz auf das Risiko der Gadolinium-Dissoziation und Langzeit-Persistenz im fetalen Organismus hin ^[76].

Die amerikanische FDA ordnet Gd-KM der Risiko-Kategorie C zu: Bei nicht ausreichender Datenlage aus menschlichen Studien und eventuell vorhandener Evidenz zu Toxizität im Tierversuch ist es möglich, dass der Fetus durch die Anwendung einen Schaden trägt. Es muss eine Abwägung des potentiellen Nutzens gegen das potentielle Risiko erfolgen.

Im Vergleich dazu bestätigen Webb et al. in den Guidelines der European Society of Urogenital Radiology, dass der Einsatz von Gd-KM in der Schwangerschaft möglich ist und dass nach Anwendung keine spezifischen Tests in der Neonatalperiode notwendig sind ^[111].

4.2. Diskussion der NSF im Kontext

4.2.1. Überlegungen zur Epidemiologie

Angaben zu Inzidenz und Prävalenz der NSF sind starken Schwankungen unterworfen, die sich erklären durch Unterschiede bei den eingesetzten Gadolinium-Kontrastmitteln, bei der Wahl der Dosis (einfache vs. vielfache KM-Dosis) und durch die Art der Diagnosesicherung.

In einer US-Multicenter-Studie wurde über 6 Jahre eine NSF-Gesamtinzidenz von 0,039% nach Gadodiamid-Einsatz (1:2913 Patienten) und eine um den Faktor 10 geringere Inzidenz (0,003%) nach Gadopentetat-Gabe beobachtet [113].

Betrachtet man die Prävalenz in Abhängigkeit vom Grad der renalen Funktionseinschränkung, so liegen bei Dialysepatienten die Mehrheit der Angaben zwischen 2,8% bei Betrachtung verschiedener Gadolinium-Kontrastmittel [118] und 4% nach Gabe von Omniscan® [10]. Rydahl et al. führen ihr hohes Ergebnis von 18% Prävalenz in der CKD 5-Gruppe (GFR<15ml/min/1,73m² oder in Dialysetherapie) auf den ausschließlichen Einsatz von Gadodiamid im betrachteten Zentrum und der im Patientenkollektiv häufig durchgeführten MRA mit dreifacher KM-Dosis zurück [88].

Das Auftreten der NSF bei einer GFR>30ml/min/1,73m² stellt eine Ausnahme dar [89], bei der Vielzahl der Betroffenen handelt es sich um chronisch Niereninsuffiziente, jedoch wurden auch Fälle im Rahmen von akutem Nierenversagen und in der perioperativen Phase einer Lebertransplantation dokumentiert [10,89].

Für Patienten mit schwerer Niereninsuffizienz liefert die Kalkulation der glomerulären Filtrationsrate mithilfe der MDRD-Formel oft die präziseren Ergebnisse als die Cockcroft-Gault-Formel [15, 85]. Aber selbst die MDRD-

Errechnung spiegelt bei akutem Nierenversagen nicht immer simultan die Clearance der Niere wider.

Betrachtet man die NSF-Entwicklung in Abhängigkeit vom eingesetzten Kontrastmittel, so ergibt sich nach Gadodiamid-Einsatz ein um den Faktor 10 erhöhtes Auftreten: Broome errechnet eine Prävalenz unter Dialysepatienten von 4% für das lineare nichtionische Chelat, bei Gadopentetat-Gabe sind lediglich 0,4% betroffen ^[10, 44]. In einem anderen Patientenkollektiv traten NSF-verdächtige Hautveränderungen bei 30% der Magnevist®-exponierten Dialysepatienten auf ^[104]. Da eine histologische Sicherung der Diagnose ausblieb, ist die Aussagekraft dieser Studie begrenzt.

In der Zusammensicht der biopsiebestätigten NSF-Fälle sind die große Mehrzahl auf die Gabe von Gadodiamid (Omniscan®) zurückzuführen, prozentuale Angaben bewegen sich zwischen 85 und 93% ^[9, 16], für die restlichen Fälle besteht ein Zusammenhang zu Gadopentetat (Magnevist®) oder Gadoversetamid (OptiMARK®).

In der Konsequenz der Überproportionalität der Fälle, die auf Omniscan®-Gabe zurückgeführt wurden selbst in Anbetracht des Marktanteils ^[64] stellten 2 US-Universitätskliniken völlig vom Omniscan®-Einsatz auf den Einsatz von Multihance® und Magnevist® um und richteten zusätzlich ihr Augenmerk auf eine Dosisrestriktion bei NSF-Risikopatienten. Dies führte zu einer Verminderung sowohl der Gesamtinzidenz als auch der Inzidenz bei Risikopatienten und Patienten in Dialyse. De facto traten nach Einführung der neuen Richtlinien in keiner der o.g. Gruppen mehr Fälle von NSF auf ^[4].

Die Anzahl der durchgeführten KM-enhanceten Magnetresonanztomographien stellt einen unabhängigen Risikofaktor für die Entwicklung einer NSF dar ^[89].

Bei Patienten mit einem Vielfachen der normalen Dosis (0,1mmol/kg KG) zeigte sich ebenfalls eine erhöhte Prävalenz. Broome et al. errechnete für die doppelte

KM-Dosis gegenüber der einfachen eine odds ratio von 12,1 für das Auftreten einer NSF ^[10].

Die Tatsache, dass selbst bei schwerer Niereninsuffizienz die Mehrzahl der Patienten keine NSF entwickeln, spricht für das Vorhandensein weiterer Kofaktoren in der Pathogenese.

Viele Autoren beschreiben für die NSF-Fälle, dass die Kontrastmittelgabe in zeitlichem Zusammenhang stand mit sogenannten "proinflammatory events" ^[10, 17, 89]. In einer statistischen Analyse stellten die Anzahl proinflammatorischer Events pro Patient einen unabhängigen Risikofaktor für das Auftreten des Krankheitsbildes dar ^[89]. Sadowski et al. fassen mit o.g. Term thrombembolische Geschehen, chirurgische Eingriffe vor allem im Gefäßbereich und systemische Infektionen zusammen, die mit großen Gewebedefekten einhergehen. Durch die Freisetzung systemischer Mediatoren kann eine übermäßige Fibrose getriggert werden.

Bei allen 9 Patienten, die in Grobners retrospektiver Studie eine NSF entwickelten, lag zum Zeitpunkt der KM-Gabe eine metabolische Azidose vor ^[35]. Es wurde daher vermutet, dass ein azidotischer Zustand die Gadolinium-Dissoziation aus dem Chelatkomplex begünstigt. Gegen diese Annahme spricht eine weitere Untersuchung, laut der eine Azidose nicht als unabhängiger Risikofaktor für eine NSF angesehen werden kann ^[89]. Es wurden selbst Fälle von NSF bei alkalotischem Stoffwechszustand beschrieben ^[118].

Auch einer Hyperphosphatämie, wie man sie häufig bei chronisch Niereninsuffizienten vorfindet, wurde ein möglicher Einfluss bei der NSF-Entstehung beigemessen ^[35]. Abraham et al. argumentieren, dass es bei schlechter Löslichkeit freien Gadoliniums zur Ausbildung von Präzipitaten, beispielsweise mit Phosphat, kommen kann ^[1]. Frenzel et al. wiesen an gesunden Testpersonen für linear nichtionische Chelate (Omniscan®, OptiMARK®) eine in vivo Dissoziationsvermehrung um 75% nach Zugabe von Phosphat zu den Proben nach ^[30].

Was die Medikamentenanamnese betrifft, gibt es bisher keine Hinweise auf einen Zusammenhang zur NSF. Hinterfragt wurde eine Verbindung u.a. zu ACE-Inhibitoren, AT-II-Antagonisten und Erythropoetin.

4.2.2. Gadolinium-Pharmakokinetik in Abhängigkeit von der Nierenfunktion, Dialysierbarkeit und Nephrotoxizität

Patienten mit Niereninsuffizienz besitzen ein höheres Risiko der NSF-Entwicklung, da bei verlängerter Halbwertszeit des Gadolinium-Chelats die Wahrscheinlichkeit der in vivo Transmetallierung steigt. Für Gadodiamid wurde bei gesunden Kontrollpersonen eine Halbwertszeit von 1,3 h(\pm 0,25) ermittelt, bei schwerer Niereninsuffizienz stieg sie auf 34,3h(\pm 22,9h) an ^[48]. Nach Grobners Untersuchungen kann die Halbwertszeit bei hochgradig Niereninsuffizienten 30-120h überschreiten ^[35].

Die Gadolinium-Verbindungen sind durch Hämodialyse filtrierbar, die Elimination beträgt 78,2%, 95,6%, 98,7% und 99,5% in der ersten bis vierten Dialyse-Einheit ^[71]. Da NSF-Fälle auch trotz Durchführen einer Dialyse beschrieben sind ^[10, 118], stellt diese keinen definitiven Schutz vor dem Auftreten des Krankheitsbildes dar. Michaely et al. postulierten, dass die Toxizität bereits unmittelbar nach i.v. Gabe greift ^[64]. Nichtsdestotrotz stellt die Dialyse die einzige Möglichkeit dar, bei medizinisch gerechtfertigter KM-Gabe die Elimination zu beschleunigen.

Heinrich et al. konnten nachweisen, dass die in vitro Nephrotoxizität von Gadolinium-basierenden Kontrastmitteln in angiographischen Konzentrationen mit derer von iodhaltigen Kontrastmitteln vergleichbar ist ^[40]. Eine Verschlechterung der Nierenfunktion durch Gadolinium-KM-Gabe selbst bei hoher Dosis konnte bislang weder tierexperimentell noch in Studien an gesunden und niereninsuffizienten Patienten festgestellt werden ^[48, 80, 98].

4.2.3. Systemische Manifestationen der NSF

Bei Erstbeschreibung des Krankheitsbildes ging man davon aus, es handele sich um einen auf die Haut begrenzten Fibroseprozess, daher die Namensgebung Nephrogene fibrosierende Dermopathie (NFD). Nachdem sich in Autopsien Betroffener die Beteiligung innerer Organe wie Lunge, Myokard, Nierentubuli oder Zwerchfell bestätigte [20, 33, 68, 102], veränderte sich die Betrachtung hin zu einem systemischen Prozess, der sich in der Bezeichnung NSF widerspiegelt.

4.2.4. Beurteilung der Stabilität der Chelate

4.2.4.1. Stabilität der Gadolinium-Komplexe und Risiko der Transmetallierung

Den Prozess, bei dem Gadolinium-Ionen aus dem Chelat-Komplex herausgelöst werden, bezeichnet man als Transmetallierung. Endogene Ionen wie Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} oder Ca^{2+} konkurrieren mit Gd^{3+} um die Bindung mit dem Liganden. Bei Verdrängung aus dem Komplex gelangen freie Gadolinium-Ionen in den Blutkreislauf. In der Konsequenz kann das Gadolinium vor allem in Leber und Knochen eingelagert werden und sekundär daraus mobilisiert werden [1, 32, 98, 114]. Freie Gadolinium-Ionen besitzen eine hohe Toxizität und können als Antigen für Zellen dienen, die am Fibroseprozess beteiligt sind.

Klinische Studien zur in vivo Stabilität sind rar aufgrund der schwierigen Durchführbarkeit. Eine Reproduktion der pathophysiologischen Stoffwechsellage bei Niereninsuffizienz wäre von besonderem Interesse. Die Einschätzung des individuellen Transmetallierungs-Risikos eines Gadolinium-Chelats beruht daher zum einen auf der Anzahl der dokumentierten NSF-Fälle und zum anderen auf den physikochemischen Eigenschaften des Chelats.

Chemische Struktur: Die Stärke der Chelatbindung wird durch die Molekülstruktur und durch die Ladung der Verbindung beeinflusst. Während makrozyklische Chelate das Gadolinium fest umgeben, besitzen lineare Chelate eine offenkettige Struktur. Gegenüber den ionischen Verbindungen gelten die nichtionischen als weniger stabil. Aus diesem Grund sind den beiden nichtionischen linearen Kontrastmitteln Omniscan® und OptiMARK® in der käuflichen Lösung bereits ein Überschuss an freiem Ligand hinzugefügt ^[64].

zur Klassifizierung der MR-Kontrastmittel s. Kapitel 1.2.2 b

Thermodynamische Stabilität:

Im Chelatkomplex herrscht ein Gleichgewicht, für das gilt:



Die thermodynamische Stabilität wird gemessen in $\log K_{\text{therm}}$, wobei für K_{therm} gilt:

$$K_{\text{therm}} = [ML] / [M][L]$$

Je höher der Wert $\log K_{\text{therm}}$, desto stabiler ist der Komplex und desto weniger Metall und Ligand liegen frei vor.

Durch Anwendung der „Conditional-complex“-Stabilität wird eine zusätzliche Annäherung an die in vivo-Bedingungen erreicht. Sie ist definiert als $\log K_{\text{Cond}}$ bei einem pH von 7,4 unter Verwendung der Protonierungskonstanten der Liganden ^[46, 64]. Damit beschreibt sie unter physiologischem pH die Affinität des Chelats, das Gadolinium zu binden.

Die thermodynamische Stabilitätskonstante von Omniscan® und OptiMARK® liegt um das 100-1000-fache unterhalb derer anderer Chelate wie Magnevist®, Multihance® oder Prohance®.

Kinetische Stabilität:

Die kinetische Stabilität beschreibt die Geschwindigkeit der Dissoziation zwischen Metall und Liganden und lässt somit wichtige Rückschlüsse zu auf die Gadolinium-Freisetzung in vivo.

Sie ist messbar als Dissoziationshalbwertszeit $T_{1/2}$ bei pH 1 und beschreibt den Zeitpunkt, bei dem 50% des Metalls gebunden und 50% in freier Form vorliegen. Die Bestimmung der Dissoziationshalbwertszeit unterliegt großen Schwankungen zwischen Laboratorien, welche die Bestimmungen untereinander nicht vergleichbar machen ^[66].

Frenzel et al. untersuchten die Dissoziationsraten unterschiedlicher Gadolinium-Verbindungen im Serum gesunder Testpersonen unter physiologischen Bedingungen ^[30]. Die Anwendung der Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie in Verbindung mit Massenspektroskopie ermöglichte die Differenzierung zwischen komplex-gebundenem und freiem Gadolinium, prozentuale Angaben beziehen sich auf die initial applizierte Dosis. Sie wiesen nach, dass die Gadolinium-Freisetzung aus linearen Chelaten deutlich höher lag, als dies bei Betrachtung der entsprechenden „Conditional-complex“-Stabilität zu erwarten war.

Im nativen Serum lag die 15-Tages-Dissoziation der nichtionischen linearen Chelate im Vergleich zu den ionischen linearen Vertretern um etwa eine Zehnerpotenz höher (Omniscan® 20%, OptiMARK® 21%, Magnevist® 1,9%). Durch Zugabe von freiem Liganden zum Gemisch (wie er in der handelsüblichen Zusammensetzung von Omniscan® und OptiMARK® enthalten ist) konnten nur initial freigesetzte Gadolinium-Ionen abgepuffert werden ohne die Gesamtdissoziation zu beeinflussen.

Um eine Stoffwechselsituation zu simulieren, wie man sie oft bei chronischer Niereninsuffizienz vorfindet, wurde den Serum-Proben 10mmol/l Phosphat hinzugefügt. Dies induzierte bei den linearen nichtionischen Verbindungen eine initiale Dissoziationsvermehrung um das 100-fache während der Anteil ungebundenen Gadolinium nach 15 Tagen von 20 auf 35% der applizierten Dosis anstieg. Unter den ionischen linearen Vertretern zeigte sich bei anfänglich um das 12-20-fach erhöhter Freisetzung am Endpunkt ein vergleichbarer Anteil ungebundenen Gadoliniums.

In der Gruppe der makrozyklischen Verbindungen lag die Dissoziation basal und nach Phosphat-Zugabe unterhalb der Nachweisgrenze von 0,1%, wobei keine Stabilitätsunterschiede bezüglich der Ladung feststellbar waren.

Für die Stärke der Gadolinium-Bindung ergibt sich somit folgende Reihenfolge:
Linear nichtionisch < linear ionisch < makrozyklisch ionisch und nichtionisch.

Weitere Untersuchungen bezüglich der Chelatstabilität messen den nichtionischen linearen Verbindungen ebenfalls das höchste Risiko der Dissoziation und damit der Entwicklung einer NSF bei ^[67].

Michaely et al. kommen zu dem Schluss, dass innerhalb der zyklischen Verbindungen die Molekülladung keinen Einfluss auf die in vivo Stabilität besitzt ^[64].

4.2.4.2. Evidenz für Gadolinium-Dissoziation

a) Tierexperimentell

Tweedle et al. untersuchten durch Radiomarkierung die Anreicherung von verschiedenen Gadolinium-Chelaten (Gadodiamid, Gadopentetat, Gadoteridol, Gadoterat) in Knochen und Leber von Nagetieren über einen Zeitraum von 14 Tagen p.i. . Gadolinium-Ablagerungen waren bei den linearen Chelaten höher und länger nachweisbar als bei den zyklischen Verbindungen, wobei der Ganzkörper-Gadoliniumgehalt nach Gadodiamid-Applikation (lineare nichtionische Struktur) den von Gadopentetat (linear ionische Struktur) übertraf. Bei makrozyklischen Chelaten war nach 14 Tagen der geringste Gadolinium-Gehalt im Gewebe messbar.

Der Faktor, der somit die in vivo Dissoziation am meisten beeinflusste war das Vorhandensein einer zyklischen bzw. linearen Konfiguration des Chelats ^[106].

Wadas et al. betrachteten die abweichende Verstoffwechslung von Gadolinium-Verbindungen bei transgenen Mäusen mit eingeschränkter Nierenfunktion im Vergleich zu nierengesunden Tieren. Die Messung der

Restaktivität der radiomarkierten Chelate ergab für Gd-DOTA (makrozyklisch) einen gegenüber der Kontrolle ohne renale Funktionseinschränkung um das 3-fache erhöhten Wert, für Gd-DTPA (linear ionisch) zeigte sich eine etwa 8-fache Aktivität, im Fall von Gd-DTPA-BMA (linear nichtionisch) stieg der Wert sogar auf das 24-fache ^[109].

Aus den vorliegenden Daten wird ersichtlich, dass der Anteil Residualgadolinium bei Niereninsuffizienz in Abhängigkeit von der Art des Chelats erheblich ansteigt und so einen Trigger für die Entwicklung einer NSF darstellen kann.

Die gleiche Reihenfolge für den Grad der langfristig nachweisbaren Gadolinium-Hautablagerungen (linear nichtionisch>linear ionisch>makrozyklisch) stellten auch Pietsch et al. in einem Modell niereninsuffizienter Ratten nach wiederholter Kontrastmittel-Gabe fest ^[78].

Der Gadolinium-Gehalt in Knochen von Versuchstieren zeigte selbst 2 Jahre nach Ende der Magnevist-Gabe keine Tendenz zur Abnahme ^[98].

Vergleicht man den Grad der Gadolinium-Ablagerungen bei wiederholter Hochdosis-Exposition (5mmol/kg KG über 4 Wochen) mit Siebers Ergebnissen (2,5mmol/kg KG über 20 Tage), so fallen diese bei erster Studie höher aus als man es durch Dosis-Extrapolation erwarten würde ^[94, 98]. Dies lässt sich erklären durch vermehrte Gadolinium-Dissoziation, sobald die Nierenschwelle überschritten ist.

Hautläsionen in tierexperimentellen Studien zur Medikamentensicherheit wurden bereits 1993 für Omniscan® und später auch für OptiMARK® dokumentiert ^[37, 115]. In beiden Fällen handelt es sich um lineare nichtionische Chelatkomplexe, die eine geringe Stabilität in vivo besitzen. Die entzündlichen Hautveränderungen mit Ulzerationen wurden auf einen durch den Überschuss an Liganden induzierten Zinkmangel zurückgeführt.

Pietsch et al. legten dagegen kürzlich experimentell dar, dass nach KM-Exposition zwischen zwei Nagergruppen mit und ohne Zinkmangel keine Unterschiede bezüglich des Auftretens von NSF-ähnlichen Hautläsionen erkennbar waren ^[77].

b) Dissoziation im Menschen

Gibby und White führten an Patienten mit Gelenkersatz Studien durch, in denen sie den Gadolinium-Gehalt im Knochen nach Verabreichung verschiedener Chelate verglichen. Das nichtionischen linearen KM (Omniscan®) führte hierbei zum 2,5-4-fachen der Ablagerungen der makrozyklischen Gd-Verbindung (ProHance®) ^[32, 114].

Nachdem ein Zusammenhang zwischen der Gabe von MR-KM und dem Auftreten der NSF-Läsionen erstmals 2006 postuliert wurde ^[35, 60], konnte eine Kausalität durch den Nachweis von Gadolinium in der Haut betroffener Patienten belegt werden ^[1, 41, 118]. In Wigintons Kollektiv fiel die Biopsie in 6 von 7 Fällen positiv für Gadolinium aus, der 7. Patient hatte zum Zeitpunkt der Probenentnahme nach akutem Nierenversagen und wiederhergestellter Nierenfunktion bereits rückläufige Hauterscheinungen ^[118].

Abraham et al. führten bei 20 NSF-Patienten und einer Kontrolle (alle im Stadium der terminalen Niereninsuffizienz) wiederholte Hautbiopsien mit quantitativer Bestimmung des Gadolinium-Gehalts durch, die verwandte Methode ermöglichte die Differenzierung zwischen komplex-gebundenem und freiem Gadolinium. Im Gegensatz zu den Kontrollbiopsien ließ sich in allem Proben der NSF-Patienten uncheliertes Gadolinium feststellen. Interessanterweise ergab sich bei der Mehrzahl der Untersuchten eine Zunahme des Gd-Gehalts über 3 bis 5 Jahre. Diese Tatsache begründeten die Autoren durch die Bildung endogener Gadolinium-Quellen im Knochen, aus denen das Gadolinium langfristig freigesetzt werden kann ^[1].

Puttagunta et al. beurteilten den Effekt von Gd- DTPA-BMA (linear nichtionisch), Gd-DTPA (linear ionisch) und Gd-HP-DO3A (makrozyklisch) auf

Veränderungen der Kupfer- und Zink-Konzentrationen in Serum und Urin. Gd-DTPA-BMA führte zum markantesten Anstieg der Zink-Exkretion ($27,4 \pm 9,2 \mu\text{mol}$) während Gd-HP-DO3A keine erhöhte Zinkurie verursachte, Gd-DTPA nahm zwischen den anderen Chelaten eine Mittelstellung ein ($5,9 \pm 1,9 \mu\text{mol}$). Die Zinkurie wird durch in vivo Transmetallierung hervorgerufen, bei der freie Gadolinium-Ionen und Zn-DTPA(-BMA) entstehen. Der Parameter, der das Risiko einer Dissoziation am ehesten übereinstimmend mit den erhobenen Daten wiedergibt ist die kinetische Stabilität. Für die untersuchten Chelate lässt sich folgendes ableiten:

Stabilität Gd-DTPA-BMA < Stabilität Gd-DTPA < Stabilität Gd-HP-DO3A.

Eine Veränderung der Serum-Werte für Zink und Kupfer durch die Kontrastmittelgabe ließ sich genauso wenig nachweisen wie eine erhöhte Kupferausscheidung im Urin ^[81]. Zink liegt im Vergleich zu Kupfer im Serum in höherer Konzentration vor und besitzt im Vergleich zu Calcium eine höhere Affinität zu organischen Liganden, Eisen liegt praktisch immer proteingebunden vor. Daraus ergibt sich für Zink das höhere Potential, Gadolinium aus dem Chelatkomplex zu verdrängen mit der resultierenden Zinkurie ^[66].

Der instabile Chelatkomplex von Gd-DTPA-BMA in Verbindung mit dem überschüssigen Liganden in Omniscan führten besonders bei niereninsuffizienten Patienten zu falsch-niedrigen Calcium-Werten in der farbkolorimetrischen Messung ^[119, 122]. Das Auftreten von Pseudohypokalzämie ist für keines der anderen Gadolinium-Chelate beschrieben ^[46].

4.2.4.3. NSF im Tiermodell

Ziel eines NSF-Modells ist es herauszufinden, wie Gadolinium-Chelate im Organismus mit Niereninsuffizienz metabolisiert werden und ob NSF-ähnliche Läsionen im experimentellen Setting auslösbar sind.

Sieber et al. reproduzierten an Ratten die verlängerte Gadolinium-Halbwertszeit bei Niereninsuffizienz durch wiederholte Kontrastmittel-Gaben à $2,5 \text{mmol/kg KG}$

über 20 Tage. Sowohl nach Omniscan®-Exposition als auch bei Gadodiamid ohne überschüssigen Liganden entwickelten sich Hautläsionen, die im Aspekt der NSF glichen. Auch mikroskopisch zeigten sich Übereinstimmungen: beginnende Fibrose mit Spaltenbildung, heterogenes zelluläres Infiltrat mit Beteiligung CD34-positiver Zellen. Die dermale Gadolinium-Konzentration lag in der Omniscan-Gruppe um den Faktor 10 höher als in der Magnevist-Gruppe. Sowohl nach Magnevist-Gabe als auch bei Testung des Liganden im Omniscan-Präparat entstanden makroskopisch keine Hauteffloreszenzen ^[94].

Steger-Hartmann betrachteten vor dem Hintergrund der NSF erneut Ergebnisse der tierexperimentellen Untersuchungen zur Medikamentensicherheit von Magnevist® (Gadopentetat) und konnten in den Biopsien von Haut und inneren Organen ebenfalls keine mit den NSF-Läsionen vergleichbare Pathologie feststellen, trotz ähnlich hoher Gadolinium-Konzentrationen der Hautproben wie in Siebers Untersuchung ^[98].

Haylor et al. maßen bei Ratten nach subtotaler Nephrektomie und einmaliger Omniscan-Injektion (2,5mmol/kg KG) die Gadolinium-Konzentrationen in Knochen, Leber und Haut. Sie gelangten zu dem Schluss, dass bei 2,5 (Knochen) bis 10-fach (Leber) erhöhter Gewebekonzentration im Vergleich zu nicht nephrektomierten Kontrollen ein linearer Zusammenhang etabliert werden kann zwischen Serum-Kreatininwert und Grad der Gadolinium-Ablagerungen. Interessanterweise waren Hautläsionen trotz vermehrtem zellulärem Infiltrat und CD34-positiver Immunhistochemie äußerlich nicht sichtbar ^[39]. Möglicherweise wurde das NSF-Äquivalent bereits getriggert, aber 4 Wochen Beobachtungszeitraum reichten nicht aus für die Entwicklung einer makroskopisch sichtbaren Fibrose. Bezüglich des Zeitfensters zwischen Exposition und Auftreten der Hautläsionen liegt der Median je nach Patientenkollektiv zwischen 25 Tagen und 11 Wochen ^[60, 118].

4.2.5. Pathophysiologie der NSF

4.2.5.1. Fibrosemechanismus und involvierte Mediatoren

Fibrose ist gekennzeichnet durch Überwucherung, Verhärtung oder Vernarbung von Gewebe, welche auf ein Ungleichgewicht zwischen Synthese und Katabolismus von Extrazellulärer Matrix und insbesondere Kollagen zurückzuführen ist. Haupteffektorzelle der ECM-Produktion ist der aktivierte Myofibroblast, der aus diversen Zellarten ausdifferenzieren kann. Somit besitzt er in der Fibrogenese eine Schlüsselrolle ^[121].

Auf Organebene wird der Fibroseprozess relevant durch die Verdrängung lokaler parenchymatöser Zellen und dem daraus entstehenden Funktionseinbußen.

Bisher zielten viele medikamentöse Therapien auf die Unterbrechung chronischer Entzündung, durch die häufig die Fibrose aktiviert wird. Mit Verbesserung des Verständnisses von Fibrosemediatoren und deren Interaktionen steigt die Evidenz, dass es zwischen Entzündungsmediation und Fibrosemediation auch abweichende Signalwege gibt. Durch gezieltes Anknüpfen der pharmakologischen Therapie an die fibrogenen Signale konnte im Tierversuch bereits ein Fortschreiten der Fibrose verlangsamt werden. Diese Ergebnisse sind vielversprechend auch im zukünftigen klinischen Einsatz bei einem Prozess, der bei den unterschiedlichsten Krankheitsbildern die Prognose determiniert.

Rolle der Chemokine: Chemokine führen zu Migration von Leukozyten an den Ort eines Gewebedefekts. Unter ihnen gelten besonders CCL3 (macrophage inflammatory protein 1 α) und CCL2 (monocyte chemoattractant protein 1) als profibrotische Mediatoren ^[65, 103].

Rolle der Th1- und Th2- Antwort: Bei Mäusen mit dominierender T-Helfer-1-Antwort zeigte sich eine Hochregulierung der Gene für Akute-Phase-Reaktion

und Apoptose in Zusammenhang mit einer gesteigerten Aktivität von Interferon γ und Interleukin 12, die antifibrotische Eigenschaften besitzen [43, 90].

Zu den Zytokinen, die in der Th2-geprägten Immunantwort involviert sind gehören u.a. Interleukin 4, Interleukin 5 und Interleukin 13. Erhöhte IL4-Werte konnten in einer Vielzahl fibroseinduzierender Erkrankungen nachgewiesen werden [13, 110].

In Studien wurde die fibroseinduzierende Potenz von Interleukin-4 höher als die von TGF β -1 eingestuft [27].

Humane Fibroblasten besitzen Interleukin-4-Rezeptoren, deren Aktivierung zur gesteigerten ECM-Synthese führt [23], während selektive Interleukin-4-Antagonisierung das Fortschreiten der Fibrose hemmt [74].

IL-13 besitzt teilweise identische Signaltransduktionswege wie IL-4, durch den Einsatz transgener und Knockout-Mäuse und die selektive Antagonisierung konnten kürzlich auch Abweichungen in der generierten Antwort nachgewiesen werden: Die Fibroseentwicklung war nach IL-13-Antagonisierung deutlich reduziert [14], IL-13-defiziente Mäuse besaßen nach chemischer Stimulation im Vergleich zu Mäusen mit IL-4-Defizienz stark reduzierte Kollagen-Ablagerungen [54].

Rolle von TGF β : Der Stellenwert von TGF β in diversen physiologischen und pathologischen Signalwegen, zu denen auch die überschießende Fibrose gehört, war bereits Kernstück diverser Studien [59, 91].

Blutmonozyten und Gewebsmakrophagen stellen die Hauptquelle für TGF β 1 dar. Da es in inaktiver Form intrazellulär gespeichert wird, können die Schritte, die bei der Aktivierung und Freisetzung durchlaufen werden, pharmakologische Ansatzpunkte zur Fibroseinhibierung sein [121].

TGF β 1 induziert auf direktem Weg die Ausdifferenzierung mesenchymaler Zellen zu Myofibroblasten. Nach Andocken an Transmembranrezeptoren kann TGF β 1 über Smad-Proteine die Transkription von Prokollagen I und III verändern [84].

IL-13 und TGF β 1 interagieren in der Fibrogenese, zum Beispiel kann IL-13 in Makrophagen die Sekretion von latentem TGF β 1 aktivieren [121]. Es haben sich

Hinweise ergeben, dass IL-13-getriggerte Fibrose auch TGF β 1-unabhängig stattfinden kann ^[52].

4.2.5.2. NSF: Histologie, Rolle der CF, Rolle des TGF β , weitere Fibrosemidiatoren

Charakteristisch für Hautbiopsien, welche die Diagnose der NSF bestätigen, sind neben dem Infiltrat von Fibroblasten und dendritischen Zellen und den verdickten Kollagenbündeln mit Spaltenbildung die doppelpositive immunhistochemische Färbung CD-34+, Prokollagen I +, eine Immunhistochemie, die den zirkulierenden Fibrozyten charakterisiert ^[21].

Der Zelltypus des zirkulierenden Fibrozyten wurde erstmals 1994 im Rahmen eines Wundheilungsmodells beschrieben ^[11]. Den von pluripotenten Knochenmarkszellen abstammenden Fibrozyten wurde bereits damals eine Rolle sowohl in der Wundheilung als auch bei pathologischen Fibroseprozessen zugesprochen.

Das CD34-Oberflächenantigen haben CF gemeinsam mit hämatopoetischen Stammzellen, Endothelzellen und Knochenmark-Stromazellen. Somit besitzen sie sowohl die Eigenschaft im Blutkreislauf zu zirkulieren als auch die Fähigkeit Zellmatrix zu synthetisieren (Prokollagen I). CF sind beteiligt an der proliferativen Phase der Wundheilung, als antigen-präsentierende Zellen sind sie in der Lage naive T-Zellen zu aktivieren. Durch die Produktion von Wachstumsfaktoren und Zytokinen erfolgt die Interaktion mit anderen Zellen ^[82].

Die Angiogenese, welche u.a. durch die Sekretion von VEGF, PDGF-A und M-CSF vermittelt wird ^[38], findet sich sowohl in Gewebeproben von Wundheilungsprozessen als auch in den NSF-Hautbiopsien wieder.

Die Kollagensynthese und der -Abbau werden durch Matrixmetalloproteinasen (MMP) und deren Inhibitoren wie z.B. TIMP (tissue inhibitors of metalloproteinases) reguliert ^[75].

Varani et al. wiesen in Zellkulturen von Hautfibroblasten eine gesteigerte Ausschüttung von MMP-1 und TIMP-1 nach Exposition gegenüber Omniscan® und in geringerem Maß auch gegenüber Magnevist®, Multihance® und Prohance® nach ^[107]. Bei vermehrter Kollagen-I-Ablagerung ohne Zunahme der Prokollagen-I-Synthese beruht die profibrotische Wirkung von Omniscan® auf einer Beeinflussung des Kollagenabbaus durch ein Enzym/Inhibitor-System ohne Zunahme der Neusynthese ^[6].

Edward et al. stellten für aus der Haut von NSF-Patienten isolierte Fibroblasten erhöhte Syntheseraten für Hyaluron (3,2-5-fach) und Kollagen(1,8-4-fach) im Vergleich zu Kontroll-Fibroblasten fest. Während die Inkubation von Kontroll-Fibroblasten mit NSF-Patienten-Serum eine Zunahme der ECM-Synthese induzierte, konnte man diesen Effekt bei aus Hautbiopsien der fibrotischen Areale isolierten Fibroblasten nicht nachweisen. Da die NSF-Fibroblasten basal bereits maximal aktiviert sind, ist durch Zugabe von Patienten-Serum keine weitere Steigerung der ECM-Synthese erreichbar ^[24].

Die Präsenz von fibroseinduzierenden Faktoren im Serum spricht dafür, dass die Antwort auf den exogenen Stimulus des KM auf systemischer Ebene abläuft.

Die Quelle der fibrogenen Zytokine und Wachstumsfaktoren könnten beispielsweise Monozyten darstellen. Wermuth et al. wiesen durch Exposition von Blutmonozyten mit Gd-DTPA-BMA (Omniscan®), Gd-DTPA (Magnevist®) und Gd-Chlorid eine Stimulation von Expression und Sekretion von Interleukin-4, 6, 13, Tumornekrosefaktor α und vascular growth factor nach. Die anschließende Inkubation mit dem konditionierten Medium der Monozyten induzierte in humanen Hautfibroblasten einen profibrotischen Phänotyp ^[112].

Gadolinium-Chlorid, welches hier eine profibrotische Antwort hervorrief, zeigte bei direkter Inkubation mit Hautfibroblasten keine wachstumsfördernde Wirkung ^[24].

Bezüglich der proliferativen Wirkung der KM auf verschiedene Zellreihen divergieren die Untersuchungsergebnisse: Hautfibroblasten-Kulturen, die mit 1mM Omniscan® inkubiert wurden, zeigten unabhängig von ihrer Inkubationsdauer (1Tag, 4Tage) ein signifikant gesteigertes Wachstum, mit

Abnahme der Zellzahlverdopplungszeit (Kontrolle:28h, Omniscan®: 22h) und Erhöhung der Zelldichte(Kontrolle: $4,75 \times 10^4$, Omniscan®: $9,3 \times 10^4$) [24].

Varani et al. beschrieben ebenfalls einen proliferativen Effekt von Omniscan®, und in geringerem Umfang auch von Magnevist®, Multihance® und Prohance® auf das Wachstum von Hautfibroblasten [107].

Wiesinger et al. konnten dagegen für Omniscan®, Multihance® und das Mangan-basierende Teslascan® in bis zu 20-facher normaler plasmatischer Konzentration und 24-stündiger Inkubation keine Induktion von gesteigertem Zellwachstum bei embryonalen Lungenfibroblasten und Nabelschnur-Endothelzellen feststellen [116, 117].

Zum gleichen Ergebnis gelangten auch die Untersuchungen dieser Promotionsarbeit, die sich mit den Gadolinium-haltigen Kontrastmitteln Magnevist® und Gadovist® und dem Eisen-haltigen Kontrastmittel Resovist® beschäftigten.

Eine mögliche Erklärung für die divergierenden Ergebnisse liefert die Verschiedenheit der untersuchten Zellpopulationen. Während TGFβ-1 über smad3-Signalisierung in Hautfibroblasten eine proliferative Antwort mit Zunahme der Hyaluron-Synthese induzierte, führte derselbe Signalweg in Fibroblasten der Mundschleimhaut zu einem antiproliferativen Ergebnis [63].

Strutz et al. zeigten, dass die TGFβ-1 getriggerte Proliferation zwischen den Fibroblasten-Subpopulationen abweichende Transduktionsmechanismen durchläuft: PDGF-Blockade führte zu Reduktion des Proliferationsreizes in Hautfibroblasten, während die Proliferation von Nierenfibroblasten, welche größtenteils basic fibroblast growth factor (FGF-2)-mediert ist, davon unbeeinflusst blieb [99].

Die Wirkung des TGFβ-1 hängt darüber hinaus von dessen Quelle ab: Während TGFβ-1 aus Makrophagen meist einen profibrotischen Effekt besitzt [55], scheint von T-Zellen synthetisiertes TGFβ-1 eher eine fibrosesupprimierende Rolle auszuüben [53].

Haupteffektor der ECM-Produktion ist der aktivierte Myofibroblast, der aus einer Vielzahl anderer Zelltypi hervorgehen kann, wie beispielsweise ansässige

mesenchymale Zellen, Epithel- und Endothelzellen (sogenannte epitheliale/endotheliale mesenchymale Transition) und zirkulierende Fibrozyten^[121].

Mit dem intraläsionalen Gadolinium-Nachweis aus Hautbiopsien von NSF-Patienten^[1, 41, 118] gilt der kausale Zusammenhang zwischen Kontrastmittel-Exposition und Entstehung der NSF als erwiesen. Weiterhin unklar bleibt, ob das noch in der Blutbahn befindliche durch Transmetallierung freigesetzte Gadolinium den Trigger der Fibrose darstellt oder ob erst die kutanen Gadoliniumablagerungen die Fibrogenese aktivieren. Kutanes Gadolinium könnte zur Aktivierung ansässiger Fibroblasten führen, alternativ können auch Makrophagen nach Phagozytose des Fremdmaterials profibrotische Faktoren ausschütten^[24].

Die zum aktuellen Zeitpunkt meistverbreitete These ist die der zirkulierenden Fibrozyten. Ungebundenes Gadolinium wirkt als Antigen für die CF, welche in die Dermis migrieren, wo sie durch immunhistochemische Färbung nachweisbar werden. Cowper liefert zum Beleg der systemischen Postulate der CF folgende Argumente: Die symmetrischen Verteilung der Hautläsionen, die Geschwindigkeit der Entwicklung der NSF bei Abwesenheit von Mitosefiguren in den Hautschnitten, der histologische Aspekt, welcher einem Wundheilungsprozess mit der dazugehörigen Angiogenese gleicht und das Beginnen der Hauteffloreszenzen an abhängigen Körperpartien, wo erhöhte vaskuläre Permeabilität die zelluläre Migration erleichtert^[17].

Durch Ausdifferenzierung zu Myofibroblasten und Steigerung der Matrixsynthese stellt der zirkulierende Fibrozyt einen potentiellen Fibrosegenerator dar.

Veränderungen der CD-34-Expression im zeitlichen Verlauf fibrotischer Erkrankungen konnten verschiedentlich nachgewiesen werden. Aiba und Tagami stellten in hypertrophischem Narbengewebe eine allmähliche Verminderung des CD-34-Oberflächenantigens fest, welche sie assoziierten mit dem Übergang von der inflammatorischen zur regenerativen Phase. Gleichzeitig fanden sie eine verstärkte Expression von Prolyl-4-Hydroxylase, welche der Stabilisierung der Kollagen-Tripelhelix dient^[2].

Quan sieht im Verlust der CD-34-Expression eine Transition von der zirkulierenden zur ECM-synthetisierenden Zelle^[82].

Bei Patienten mit allergischem Asthma zeigte sich ein positiver Zusammenhang zwischen CD34 positiven Zellen im Bronchial-Biopsat und der Entwicklung einer Atemwegsfibrose. TGF β -1 induzierte die Ausdifferenzierung zu Myofibroblasten mit Verlust der CD34-Expression^[92].

In der betroffenen Haut von Sklerodermie-Patienten liegt eine verminderte CD34-Expression im Vergleich zu gesunden Kontrollen vor^[3]. Eine mögliche Erklärung für die persistierende fibrotische Aktivität bei dem Krankheitsbild liefert die Aufrechterhaltung des Fibroblasten-Phänotyps durch ein autokrines TGF β -1 Signal^[121].

Jiménez et al. beschrieben erhöhte TGF β -1-Expression in Hautbiopsien von NSF-Patienten^[47], welche in einer Zellkultur mit nativen Hautfibroblasten nach Kontrastmittel-Exposition nicht reproduziert werden konnte^[116]. Dies spricht dafür, dass es sich bei den TGF β -1-sekretierenden Zellen nicht um die Hautfibroblasten selbst handelt, sondern um andere Fibrosemediatoren wie beispielsweise Monozyten oder Makrophagen^[24, 112].

4.2.6. NSF- Konsequenzen im klinischen Alltag

Da Patienten mit hohem Risikoprofil für NSF ebenfalls durch die Entwicklung einer CIN (Contrast induced nephropathy) bei Gabe von jodhaltigem Kontrastmittel in der Computertomographie gefährdet sind, muss eine Abwägung der beiden Risiken gegeneinander erfolgen.

Als CIN wird eine Verschlechterung der Nierenfunktion nach intravasaler Kontrastmittelgabe bezeichnet, die mit einem Serum-Kreatinin-Anstieg von $\geq 0,5$ mg/dl oder $\geq 25\%$ des ursprünglichen Wertes einhergeht^[80]. Während die Inzidenz in der Gesamtpopulation bei 1-2% liegt, kann sie bei Hochrisikopatienten für Niereninsuffizienz bis zu 50% betragen^[28].

Bei Auftreten der CIN ist die Gesamtmortalität im ersten Jahr um 9% erhöht^[62]. Die NSF-Inzidenz liegt bei schwerer Niereninsuffizienz zwischen 3 und 7%^[101]. Hieraus wird ersichtlich, dass die kontrastverstärkte Computertomographie

gerade in der Risikopopulation keine Alternative zur MRT mit Gadolinium-KM darstellt. Da auf eine Gefäßdarstellung bei vielen dieser Patienten nicht verzichtet werden kann, sollte in Übereinstimmung mit den europäischen Richtlinien (s. Kap. 1.3.2) auf eine Gadolinium-Verbindung mit niedrigem Risikoprofil zurückgegriffen werden.

Ein Auftreten der NSF wurde bisher nicht dokumentiert nach der Gabe von Gadoterat Meglumin, Gadoteridol, Gadobenat Dimeglumin und Gadobutrol ^[101].

Ein weiteres Ziel muss es sein, einen ausreichenden Gewebekontrast bei möglichst geringer Kontrastmitteldosis zu erreichen, beispielsweise durch den Einsatz optimierter Spulensysteme oder stärkere Magnetfelder (3T).

Da ein Nutzen diverser pharmakologischer Therapien nur im Einzelfall nachweisbar war, ist die Prävention der NSF essentiell. Hierzu bieten sich Screeningfragebögen auf eine noch nicht diagnostizierte Niereninsuffizienz an, denen sich bei Verdacht die Bestimmung der GFR mittels Cockcroft-Gault-Formel oder MDRD-Formel anschließt.

Bei Wiedererlangen der Nierenfunktion, nach akutem Nierenversagen oder durch Nierentransplantation zeigte sich teilweise eine Rückläufigkeit der Hautveränderungen ^[17].

4.3. Eigene Untersuchung

4.3.1. Beurteilung der Methode

Ziel der Zellkulturuntersuchung war es, so approximativ wie möglich die in vivo Bedingungen zu reproduzieren. Nur auf diese Weise kann man aus den erhobenen Daten auch eine gewisse Aussage für die Kontrastmittel-Auswirkung in der Schwangerschaft ableiten. Nachfolgend werden Stärken und Schwachpunkte des verwendeten in vitro-Modells aufgezeigt.

In einer Monolayer-Kultur lässt sich lediglich das Wachstumsverhalten einer Zellpopulation betrachten. Eine Kontrastmittelwirkung, die auf der Interaktion verschiedener Zellen wie beispielsweise Fibroblasten, Endothelzellen und im Blutkreislauf zirkulierenden Zellen beruht, entzieht sich dem Urteil. Gerade zirkulierende Mediatoren nehmen allerdings nach dem aktuellen wissenschaftlichen Stand in der Pathophysiologie der NSF einen wichtigen Stellenwert ein.

Auch die Zell-Zell-Kommunikation durch Ausschüttung von Zytokinen und anderen Signalmediatoren war nicht Gegenstand dieser Arbeit.

Das durch das Kulturmedium gebildete extrazelluläre Milieu und der intermittierende Medienwechsel entsprechen nicht dem physiologischen Fließgleichgewicht eines Organismus, in dem das Substratangebot gleichmäßig vorhanden ist, Abfallprodukte entsorgt werden und der Säure-Basen-Haushalt durch Pufferungsvorgänge aufrecht erhalten wird.

Die Wahl der Kontrastmitteldosis steht in direktem Bezug zu den Konzentrationen, wie sie im menschlichen Plasma angenommen werden. Auch erfolgt die vergleichende Bewertung der Toxizität zwischen verschiedenen Kontrastmittelgruppen.

Die Kontrastmittel-Verweildauer im fetalen Organismus ist schwer zu erfassen. Studien mit radiomarkiertem Kontrastmittel zeigten nach 24 Stunden einen Abfall auf 1/100 der initialen Aktivität ^[72]. Eine Inkubationszeit von 4 bzw. 24 Stunden scheint somit eine adäquate Annäherung an die realen Umstände zu bieten, wobei eine längere Verweildauer sehr geringer KM-Konzentrationen im Fruchtwasser denkbar ist.

Im Fall von schwerer Niereninsuffizienz wird von einer Halbwertszeit Gadolinium-haltigen Kontrastmittels ausgegangen, die 30 Stunden überschreiten kann ^[35]. Somit bleibt es fraglich, ob die von uns gewählte Expositionsdauer zu kurz für die Induktion eines fibrotischen Geschehens in humanen embryonalen Lungenfibroblasten war. Auf der anderen Seite sind NSF-Fälle auch beschrieben bei Patienten, die unmittelbar nach Exposition einer Dialyse unterzogen wurden, was für die sofort eintretende Toxizität des Kontrastmittels spricht.

Es ist bekannt, dass TGF β 1 in Fibroblasten unterschiedlicher Herkunft gegensätzliche Antworten hervorrufen kann^[63]. Eine Beteiligung der Lunge am systemischen Fibroseprozess ist nicht obligat, wurde aber bereits in der Literatur beschrieben^[68]. Von diesem Standpunkt wäre auch eine wachstumsanregende Wirkung auf die embryonalen Lungenfibroblasten möglich gewesen.

Durch die Beurteilung der zellulären Integrität unterschiedlicher Zellpopulationen auf diversen Ebenen mit übereinstimmendem Ergebnis gewinnt die getroffene Endaussage an Tragweite.

4.3.2. Diskussion der eigenen Ergebnisse

Proliferationskinetik:

Bei den embryonalen Lungenfibroblasten, deren Zellzahl über 21 Tage nach Ende der Inkubation mit den Kontrastmitteln bestimmt wurde, trat ein exponentieller Zellzahlanstieg ab Tag 4 ein. Die maximalen Zellzahlen wurden an Tag 11 erreicht, es folgte eine Plateauphase mit leichter Abflachung der Kurve.

Nach 4-stündiger Exposition in 1- bis 20-facher normaler plasmatischer Konzentration hoben sich die Kurven der verschiedenen Bedingungen nicht voneinander ab (Abb. 3.2). Es trat bei keinem der Kontrastmittel ein wachstumshemmender Effekt auf. Auch ein höherer Proliferationsanreiz durch die Kontrastmittelexposition war nicht festzustellen.

In der 24-Stunden-Gruppe der embryonalen Lungenfibroblasten zeigte sich dagegen für Magnevist® in maximaler Dosierung ein initial verzögertes Wachstum mit signifikanter Abweichung von den restlichen Bedingungen an Tag 4, dessen Tendenz an Tag 7 weiterhin bestehen blieb (Abb. 3.6). Da sich der verminderte Zellzahlzuwachs im weiteren Verlauf ausglich, handelt es sich hierbei nicht um den Nachweis einer Toxizität, sondern lediglich um einen antiproliferativen Effekt mit anschließender Kompensierung des Wachstumsrückstandes. Zwar wurde die höchste maximale Zellzahl in der Kontrolle erreicht, während die Spitze der Kurve für die mit Resovist® und

Magnevist® in 10- und 20-facher Konzentration inkubierten Zellen flacher verlief, doch besitzen die Unterschiede keine statistische Signifikanz. Ein im Vergleich zur Kontrolle gesteigertes Wachstum war für keine der Bedingungen zu verzeichnen.

Bei den HUVEC folgte auf einen langsamen Zellzuwachs bis Tag 3 eine exponentielle Vermehrung mit Erreichen der maximalen Zellzahl um Tag 10, der sich die Ausbildung eines Plateaus bis zum Ende des Beobachtungszeitraums an Tag 17 anschloss.

Nach 24-stündiger Inkubation in den maximalen Konzentrationen (10x, 20x) ergaben sich für keine der Bedingungen Abweichungen von der Kontrolle (Abb. 3.16). In der Untersuchung der Nabelschnur-Endothelzellen traten demnach weder eine Toxizität noch ein vorübergehender antiproliferativer Effekt auf, wie er bei den Lungenfibroblasten für Magnevist® in höchster Inkubationsdauer und KM-Konzentration zu beobachten war.

Viabilität:

Für beide Inkubationszeiten hielten sich die Viabilitätswerte der HEL in der ersten Hälfte des Beobachtungszeitraumes konstant und sanken im Verlauf leicht ab.

Nach 4-stündiger KM-Exposition unterschied sich die Viabilität der embryonalen Lungenfibroblasten zu keinem Zeitpunkt von der der Kontrolle (Abb.3.11).

Unmittelbar nach Ende der 24-stündigen Exposition in der höchsten Konzentration war die Viabilität der HEL bei Magnevist® (signifikant), Resovist® (nicht signifikant) und Gadovist® (nicht signifikant) herabgesetzt (Abb 3.12) . Im Verlauf glichen sich die Viabilitäten der unterschiedlichen Bedingungen einander an, so dass keine Divergenzen in Abhängigkeit von Kontrastmittel oder Konzentration mehr feststellbar waren.

Im direkten Vergleich der 4- und 24-Stunden-Werte zeigten sich an den beiden ersten Beobachtungstagen Viabilitätsdifferenzen zugunsten der kürzeren Inkubationszeit, welche bei höherer KM-Konzentration ausgeprägter waren

(Abb. 3.13, 3.14, 3.15). Die Differenzen verschwanden an den weiteren Versuchstagen.

Nach einem globalen Absinken der Viabilitätswerte der Nabelschnuroendothelzellen unmittelbar nach Aussaat folgte ein Wiederanstieg auf das ursprüngliche Niveau mit Konstanz bis zum Ende der Proliferationskinetik (Abb. 3.18). Dieser Effekt kann, da er auch bei der Kontrolle auftrat, am ehesten auf zelluläre Adaptationsmechanismen unmittelbar nach Aussaat und nicht auf eine Kontrastmittel-Wirkung zurückgeführt werden. Mit Ausnahme zweier Werte an Tag 0 schwankten die gemessenen Viabilitäten um den Wert der Kontrolle.

Koloniebildungsassay:

Die Bestimmung der Koloniebildungsrate gilt als geeignete Methode um auch subtile Einwirkungen einer Noxe zu erfassen.

Während sich bei 4-stündiger Kontrastmittelinkubation nur eine Tendenz zur konzentrationsabhängigen Hemmung der Koloniebildung für Magnevist® und Resovist® zeigte (Abb. 3.20), führte eine verlängerte Expositionsdauer von 24 Stunden zu signifikant verminderter klonogener Aktivität der embryonalen Lungenfibroblasten, die mit Magnevist in 10- und 20-facher Konzentration inkubiert wurden (Abb. 3.23)

Bezüglich der Koloniebildungsrate der Nabelschnur-Endothelzellen nach 24-stündiger Inkubation mit den Kontrastmitteln in hoher Konzentration ließ sich für keine der untersuchten Verbindungen eine Herabsetzung der klonogenen Aktivität feststellen.

Zellzyklus:

In der Analyse der Zellzyklusanteile sollte definiert werden, ob sich aus der Kontrastmittelexposition eine Veränderung der Phasenanteile im Vergleich zur Kontrolle ergibt. Durch das Einwirken einer Noxe, kann der reguläre Zellzyklus beeinträchtigt sein. Kontrollmechanismen, die auf zellulärer Ebene durchlaufen

werden, führen bei einem fehlerhaften Produkt dazu, dass der Übergang in die darauffolgende Phase verhindert wird.

Wir untersuchten die Kontrastmittelwirkung unmittelbar nach Expositionsende als auch 24 Stunden später, wobei die embryonalen Lungenfibroblasten zuvor mit der maximalen 20-fachen Konzentration inkubiert worden waren.

Die G₁-Phase macht bezüglich ihrer zeitlichen Dauer den längsten Phasenanteil aus. Dementsprechend befinden bei allen untersuchten Bedingungen mit Ausnahme von Magnevist® 24 Stunden nach Ende der Exposition die Mehrheit der Zellen in dieser Phase.

Der Anteil der Zellen in der S-Phase stellt einen guten Maßstab des proliferativen Verhaltens dar. Hier findet die Replikation der DNA statt, welche den Grundstein legt für die spätere Zellteilung. Ein erhöhter S-Phasen-Anteil 24 Stunden nach Inkubationsende gegenüber der Messung unmittelbar nach Kontrastmittelexposition zeigte sich am deutlichsten bei Magnevist®, wobei dieser von 2,9% auf 38,5% anstieg und in geringerem Maße auch bei Gadovist® mit einer Zunahme von 16,7% auf 26,8%. Durch die beiden Gadolinium-haltigen Kontrastmittel ist eine vorübergehende Hemmung der Syntheseleistung der HEL aufgetreten, die 24 Stunden später bereits kompensiert wurde (Gadovist®) bzw. zu einer reaktiv gesteigerten Syntheseleistung im Vergleich zur Kontrolle führte (Magnevist®)(Abb. 3.27, Abb. 3.28).

Die G₂-Phase ist gekennzeichnet durch die Synthese von Proteinen und RNA, die für die Mitose benötigt werden. Werden die Kontrollpunkte nicht regelrecht durchlaufen, führt dies zu einem G₂/M-Arrest. Der G₂/M-Anteil zeigt im Vergleich der beiden Messungen wenig Veränderungen. Nach Gadovist®- und Magnevist®-Exposition geht der zunehmende S-Anteil einher mit einer leichten prozentualen Verminderung der G₂/M-Phase. Somit trat nach Kontrastmittelexposition kein G₂/M-Arrest auf.

Mitochondriales Transmembranpotential:

Eine mögliche Art, wie sich Toxizität bei Exposition gegenüber einer Noxe manifestieren kann, ist in Form einer gesteigerten Apoptose. Das

aufrechterhaltene Transmembranpotential nach Inkubation mit Magnevist®, Gadovist® und Resovist® deutet darauf hin, dass die Kontrastmittelexposition keinen Einfluss auf das Apoptoseverhalten der embryonalen Lungenfibroblasten ausübt.

Dieses Ergebnis ist übereinstimmend mit der Abwesenheit von Apoptose bei der Viabilitätsbestimmung und mit der reversiblen antiproliferativen Wirkung in der Proliferationskinetik.

Immunfluoreszenz:

In der Immunfluoreszenz können durch Antikörpermarkierung selektiv Zellbestandteile angefärbt werden mit dem Ziel, morphologische Veränderungen nach Exposition gegenüber den Kontrastmitteln sichtbar zu machen.

Einer der Antikörper, die wir einsetzten, war gegen Vimentin gerichtet. Vimentin gehört der Gruppe der Intermediärfilamente (IF) an, zusammen mit Mikrotubuli und Mikrofilamenten bilden sie das zytoskelettale System, welches in nahezu allen ausdifferenzierten Zellen vorhanden ist.

Während die den Intermediärfilamenten attribuierte Funktion bis in die 90er-Jahre in erster Linie im Erhalt struktureller und mechanischer Integrität bestand, hat sich das Verständnis heute hin zu dynamischen Zellelementen gewandelt. Sie sind beteiligt an der Regulation von Proteinen, welche Prozesse wie Zelladhäsion, Migration und zelluläres Überleben/Apoptose beeinflussen. Auch in der Pathogenese diverser Erkrankungen scheinen Mutationen von IF eine Rolle zu spielen ^[25].

Vimentin ist das Haupt-IF-Protein in mesenchymalen Zellen, somit ist die von uns angewandte Färbung nicht Fibroblasten-spezifisch, sie kann beispielsweise auch bei glatten Muskelzellen oder Endothelzellen eingesetzt werden.

Die Anfärbung der Zellkerne wurde mithilfe von DAPI erreicht, welches in die DNA interkaliert.

Nach Exposition gegenüber den Kontrastmitteln Gadovist, Magnevist und Resovist in maximaler 20-facher Konzentration traten keine Veränderungen des charakteristischen Aspekts der Fibroblasten auf. Das feine Netz der

Intermediärfilamente besaß eine homogene Ausprägung, die zellulären Randbereiche waren klar gegeneinander abgrenzbar. Auch bezüglich ihrer Größe zeigten die KM-exponierten HEL im Vergleich zur Kontrolle keine Auffälligkeiten (Abb. 3.32, 3.34, 3.35). Hinweise auf eine Toxizität würden sich beispielsweise aus einem ungleichmäßig aufgebautem Zytoskelett, vergrößerten „aufgedunsenen“ Zellen oder dem Verlust des Fibroblasten-spezifischen Aussehens mit langgestreckten Ausläufern ergeben.

Nach KM-Exposition wiesen die Zellkerne weiterhin ihre regelmäßige ovale Form auf, es traten keine nukleären Ausstülpungen oder Kernfragmente auf, die Anfärbung war homogen.

Bei der Inkubation mit Resovist bildeten sich intrazelluläre Eisenablagerungen aus (Abb. 3.35, 3.36), welche das Fluoreszenz-Muster überlagern und so den verschatteten, scheinbar ungleichmäßig angefärbten Aspekt der Fibroblasten erklären.

4.3.3. Diskussion der Ergebnisse im Kontext

Die diversen MR-Kontrastmittelgruppen und die Elemente, auf denen sie basieren, besitzen ein heterogenes Nebenwirkungsprofil.

Einmalige Gadolinium-Chlorid Injektionen in Dosen bis zu 0,2mmol/kg KG bei Nagetieren führten zu Mineralemboli in Kapillaren, Nekrose von Leberzellen und Milz und erhöhten LDH-Werten im Serum ^[97].

Da Gadolinium-Chelate zur bildgebenden Darstellung auch intraartikulär injiziert werden können, untersuchten Greisberg et al. die Kontrastmittelwirkung auf Chondrozyten. Die Inkubation mit Gadodiamid (Omniscan®) wirkte sich hemmend auf die Wachstumsrate in der Zellkultur aus, gleichzeitig war die Apoptoserate gesteigert ^[34].

In Bezug auf die Toxizität auf renale Tubuluszellen stellte sich heraus, dass in angiographischer Dosis die Effekte von Gadolinium-haltigen Kontrastmitteln mit denen jodhaltiger Kontrastmittel vergleichbar sind ^[40]. Steger-Hartmann konnten dagegen bei wiederholter hochdosierter Magnevist-Gabe im Tierversuch keine

Herabsetzung der GFR feststellen ^[98]. Auch in Patientenkollektiven mit unterschiedlichem Grad der Niereninsuffizienz trat durch Gadodiamid-Gabe keine Nephrotoxizität auf ^[48].

Eisenoxidpartikel können eingesetzt werden, um per MRT die Migrationwege vorher markierter Zellen sichtbar zu machen. Die als Zelltracking bezeichnete Methode setzt voraus, dass die Langzeitimplantation im Körper unschädlich ist. SPIO-markierte subkutan implantierte mesenchymale Stammzellen führten zu Veränderungen des Phänotyps bei Versuchstieren ^[26].

Beim Versuch der Langzeitmarkierung humaner fetaler mesenchymaler Stammzellen durch Mikrogel Eisenoxidpartikel (MGIO) war das zelluläre Überleben durch akute Inflammation und Nekrose auf 5-12 Tage begrenzt ^[56].

Für Mangan, welches die Basis für Teslascan bildet, geht man von einer Neurotoxizität durch Akkumulation aus, die sich als extrapyramidal motorische Störung manifestiert. Darüberhinaus wurden eine fetale Toxizität und Auswirkungen auf Herz, Leber und Lunge beschrieben ^[19].

Die wiederholte Exposition humaner embryonaler und fetaler Lungenfibroblasten gegenüber statischen Magnetfeldern der Stärke 1,5T und 3T beeinträchtigte Proliferation, klonogene Aktivität und Apoptoseverhalten nicht ^[93, 120].

Zur Stabilität der Gadolinium-Chelate s. Kapitel 4.2.4

Zur Toxizität in der Schwangerschaft s. Kapitel 4.1.2

4.4. Abschließende Beurteilung und Perspektive

In unseren Untersuchungen konnten wir belegen, dass allein das Kontrastmittel Magnevist in maximaler Konzentration und Inkubationszeit die Proliferation der HEL hemmt. Es handelt sich um einen reversiblen Effekt, da sich zum Ende des Beobachtungszeitraums hin die Zellzahlen bereits angeglichen haben. Eine vergleichbare antiproliferative Wirkung ließ sich in der Kinetik der HUVEC nicht

feststellen. Desweiteren wiesen wir für die gleiche Bedingung eine Hemmung der klonogenen Aktivität und eine reversible Verminderung der DNA-Syntheseleistung in der Zellzyklusbestimmung nach. Nach Aussaat waren die Viabilitäten der embryonalen Lungenfibroblasten und Nabelschnur-Endothelzellen für keine Kontrastmittelbedingung herabgesetzt. Auch zeigte sich nach TMRE-Färbung keine Induktion von Apoptose nach KM-Exposition, die Ausbildung des Zytoskeletts und die Kernmorphologie waren regelrecht.

Da die antiproliferativen Effekte nur vorübergehend zu beobachten waren, können wir nicht von einer Toxizität der beiden Gadolinium-basierenden Kontrastmittel Magnevist und Gadovist und des Eisenoxid-haltigen Kontrastmittels Resovist auf die Zellpopulationen der HEL und HUVEC ausgehen. Unberücksichtigt bleiben im Zellkulturmodell die Interaktion mit anderen Zellpopulationen und die Ausschüttung von Zytokinen und anderen Botenstoffen.

Die Zielzellen einer möglichen MR-KM-Toxizität im fetalen Organismus sind nicht bekannt. Bei nachgewiesener Anreicherung in den fetalen Nieren und ableitenden Harnwegen^[70] und noch unausgereifter exkretorischer Funktion der Organe ist es berechtigt, das Augenmerk auf eine Nephrotoxizität zu richten. Eine Toxizität auf adulte renale tubuläre Zellen in der Zellkultur durch Gadolinium-haltige Kontrastmittel in angiographischer Dosis wurde bereits beschrieben^[40].

Die Schlussfolgerung auf die Unbedenklichkeit des Einsatzes einer Kontrastverstärkten MRT in der Schwangerschaft ist somit nicht zulässig. Vielmehr muss weiterhin eine auf die Patientin abgestimmte Entscheidung erfolgen, in der der Nutzen für die Schwangere oder den Fetus und das potentielle Risiko einer fetalen Schädigung gegeneinander abgewogen werden. Bei der Wahl des Gadolinium-Chelats ist Gadopentetat (Magnevist®) das Kontrastmittel, für welches die meiste klinische Erfahrung vorliegt. Bezüglich der in vivo

Dissoziation des Gadoliniums aus dem Komplex ist das Risiko hierfür bei einer makrozyklischen Verbindung am geringsten.

Im Rahmen der Versuche trat nach Kontrastmittelexposition keine gesteigerte Proliferation der embryonalen Fibroblasten auf.

Was die Interpretation der Versuche als Modell der NSF betrifft gibt es diverse Erklärungen, weshalb keine profibrotische Antwort hervorgerufen wurde. Zum einen ist die Abwesenheit „zirkulierender Faktoren“ zu erwähnen, welche in der Pathophysiologie der NSF eine essentielle Rolle spielen. Die Induktion einer gesteigerten Zellproliferation in Verbindung mit einer vermehrten Kollagensynthese wurde für humane adulte Hautfibroblasten nach Gadodiamid-Exposition beschrieben ^[24]. Zum einen besitzt Gadodiamid basierend auf der Anzahl der dokumentierten Fälle ein weitaus höheres Risiko zur Entwicklung einer NSF als Gadopentetat (Magnevist®), nach Gabe von Gadobutrol (Gadovist®) sind bisher keine Fälle beschrieben. Zum anderen muss eine Aktivierung von Hautfibroblasten durch das Kontrastmittel nicht zwingend in Lungenfibroblasten die gleiche Wirkung auslösen, auch unterschiedliche Antworten zwischen adulten und embryonalen Zellen sind denkbar. Übereinstimmend hierzu stellte Wiesinger et al. durch Gadodiamid-Inkubation ebenfalls keine Induktion eines profibrotischen Effekts bei embryonalen Lungenfibroblasten und Nabelschnur-Endothelzellen fest ^[116, 117].

Zur Prävention neuer NSF-Fälle scheint insbesondere bei Patienten mit schwerer Niereninsuffizienz bei Notwendigkeit einer Kontrastmittel-gestützten Untersuchung das Zurückgreifen auf ein makrozyklisches Chelat mit geringer in vivo Transmetallierung in geringstmöglicher Dosis sinnvoll. Das Ausweichen auf die kontrstmittelgestützte CT stellt bei diesem Patientenkollektiv aufgrund des Risikos einer CIN keine Alternative dar.

5. Zusammenfassung

Zielsetzung:

Die Magnetresonanztomographie stellt bei Pathologien in der Schwangerschaft nicht die Bildgebung der 1. Wahl dar. Sie kommt zum Einsatz um einen bereits in der Sonographie geäußerten Verdacht zu verifizieren oder wenn letztere nicht entscheidungsgebend für das weitere Prozedere ist. Der Nutzen einer Kontrastmittelgabe zur Verbesserung der diagnostischen Genauigkeit ist unumstritten, aber bisherige Untersuchungen der Toxizität für den Fetus kamen zu widersprüchlichen Schlussfolgerungen. Die Intention der vorliegenden Arbeit bestand darin, systematisch die Wirkung der MR-Kontrastmittel Gadovist, Magnevist und Resovist auf embryonale Lungenfibroblasten (HEL) und Nabelschnur-Endothelzellen (HUVEC) in vitro zu erfassen.

Material und Methoden:

Humane embryonale Lungenfibroblasten wurden 4 bzw. 24 Stunden mit Gadovist®, Magnevist® und Resovist® in 1-facher, 5-facher, 10-facher und 20-facher normaler plasmatischer Konzentration inkubiert. In der Proliferationskinetik wurden an den Tagen 4, 7, 11, 14, 18 und 21 nach Aussaat Zellzahl und Viabilität bestimmt. Die klonogene Aktivität der Lungenfibroblasten wurde im Koloniebildungsassay ermittelt. Eine Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie wurde unmittelbar nach 24-stündiger Inkubation mit der 20-fachen Kontrastmittel-Konzentration und 24 Stunden nach Inkubationsende durchgeführt. Der Anteil apoptotischer Zellen wurde nach TMRE-Färbung durchflusszytometrisch untersucht, zur Erfassung morphologischer Veränderungen erfolgte eine Immunfluoreszenz-Mikroskopie mit Vimentin-Färbung und DAPI-Kernfärbung.

Die Nabelschnur-Endothelzellen wurden 24 Stunden mit den drei Kontrastmitteln in 10- und 20-facher Konzentration inkubiert. Es schloss sich

eine Bestimmung des Wachstumsverhaltens und der Viabilität in der Proliferationskinetik an den Tagen 3, 7, 10, 14 und 17 nach Aussaat und eine Erfassung der klonogenen Aktivität im Koloniebildungsassay an.

Ergebnisse:

Der Kurvenverlauf der Proliferationskinetik von HEL und HUVEC ist gekennzeichnet durch ein anfangs langsames, später exponentielles Wachstum mit Erreichen der höchsten Zellzahlen um Tag 11(HEL) bzw. 10 (HUVEC), an das sich die Ausbildung eines Plateaus anschließt. Nach 4-stündiger Inkubation der HEL traten keine Abweichungen vom Kurvenverlauf der Kontrolle auf. Bei einer Expositionsdauer von 24 Stunden ergab sich für die mit Magnevist® in 20-facher Konzentration inkubierten Zellen eine Wachstumsverzögerung an den Tagen 4 (signifikant, $p < 0,05$) und 7. In der Kinetik der HUVEC zeigten sich bei maximaler Konzentration und Inkubation von 24 Stunden keine herabgesetzten Zellzahlen in Bezug zur Kontrolle, auch die klonogene Aktivität blieb durch die Kontrastmittel unbeeinflusst.

Die Koloniebildungsrate der embryonalen Lungenfibroblasten nach 24-stündiger Magnevist®-Exposition in 10- und 20-facher Konzentration war signifikant herabgesetzt. Bei 4-stündiger Expositionsdauer der HEL und in der Koloniebildung der HUVEC zeigten sich keine Abweichungen zur Kontrolle.

Die Viabilität der embryonalen Lungenfibroblasten war nach 4-stündiger KM-Inkubation zu keinem Zeitpunkt der Kinetik herabgesetzt, während für die 24-Stunden-Werte eine verminderte Viabilität lediglich am Tag der Aussaat (Tag 0) unmittelbar nach Inkubationsende mit Magnevist® 20x feststellbar war. Bei der Viabilität der Nabelschnur-Endothelzellen zeigten sich keine Abweichungen von den Werten der Kontrolle.

Unmittelbar nach Ende der KM-Inkubation war der S-Phasen-Anteil für Magnevist® stark reduziert (Magnevist® 2,9%, Kontrolle 18,1%), stieg aber bereits 24 Stunden später über den Wert der Kontrolle an (Magnevist® 38,5%, Kontrolle 25,1%).

Bei der Messung des mitochondrialen Transmembranpotentials zeigte keines der Kontrastmittel einen erhöhten Anteil apoptotischer Zellen.

Sowohl die Kontroll-Fibroblasten als auch die in 20-facher KM-Konzentration inkubierten Zellen zeigten ein regelmäßig ausgebildetes zytoskelettales Gerüst, Veränderungen der Kernmorphologie traten nicht auf.

Schlussfolgerung:

Nur die 24-stündige Inkubation mit Magnevist® in maximaler Konzentration löste einen reversiblen antiproliferativen Effekt auf die HEL aus. Dieser äußerte sich in geringeren Zellzahlen nach Inkubationsende in der PK, einer verminderten klonogenen Aktivität und einer reversiblen Hemmung der Syntheseleistung in der Zellzyklusanalyse. Eine wachstumshemmende Wirkung von Gadovist® und Resovist® auf die HEL konnte nicht nachgewiesen werden. Bei der Untersuchung der Nabelschnurendothelzellen übte die KM-Exposition keinen Einfluss aus auf proliferatives Verhalten und klonogene Aktivität. Die Kontrastmittel induzierten weder eine Erhöhung des Apoptoseanteils noch zellmorphologische Veränderungen in der Immunfluoreszenz.

Zusammenfassend konnten wir für die untersuchten Kontrastmittel Resovist®, Gadovist® und Magnevist® eine Toxizität auf embryonale Fibroblasten und Nabelschnur-Endothelzellen ausschließen, die antiproliferative Wirkung von Magnevist® (20x, 24h Inkubation) war von reversibler Natur.

Um die tatsächliche Unbedenklichkeit für den Fetus darzulegen, bedarf es der weiteren in vitro Testung anderer Zellpopulationen, beispielsweise um die Frage einer Nephrotoxizität zu beantworten. Auch wären tierexperimentelle Studien mit Erforschung der Metabolisierung und Halbwertszeit im fetalen Organismus wünschenswert. Bis dahin sollte sich der Einsatz von MR-Kontrastmitteln in der Schwangerschaft auf Fälle begrenzen, bei denen der diagnostische Nutzen gegenüber dem potentiellen Schaden für den Fetus bei weitem überwiegt. Vor dem Hintergrund der NSF erscheint die Wahl eines makrozyklischen Chelats sinnvoll, um das Risiko einer in vivo Gadolinium-Dissoziation möglichst gering zu halten.

Literaturverzeichnis

- [1] Abraham J.L., Thakral C., Skov L., Rossen K., Marckmann P.
Dermal inorganic gadolinium concentrations: evidence for in vivo transmetallation and long-term persistence in nephrogenic systemic fibrosis
Br. J. Dermatol. 2008 Feb;158(2):273-280
- [2] Aiba S., Tagami H.
Inverse correlation between CD34 expression and proline-4-hydroxylase immunoreactivity on spindle cells noted in hypertrophic scars and keloids
J. Cutan. Pathol. 1997 Feb;24(2):65-69
- [3] Aiba S., Tabata N., Ohtani, Tagami H.
CD34+ spindle-shaped cells selectively disappear from skin lesion of skleroderma
Arch. Dermatol. 1994 May;130(5):593-597
- [4] Altun E., Martin D.R., Wertman R., Lugo-Somolinos A, Fuller E.R. 3rd, Semelka R.C.
Nephrogenic systemic fibrosis: change in incidence following a switch in gadolinium agents and adoption of a gadolinium policy-report from two US universities
Radiology. 2009;253(3):689-696
- [5] Arbad A.S., Pandit S.D., Anderson S.A., Yocum G.T., Bur M., Frenkel V., Khuu H.M., Read E.J., Frank J.A.
Magnetic resonance imaging and confocal microscopy studies of magnetically labeled endothelial progenitor cells trafficking to sites of tumor angiogenesis
Stem. Cells. 2006;24:671-678
- [6] Bhagavathula N., DaSilva M., Aslam M.N., Dame M.K., Warner R.L., Xu Y., Fisher G.J., Johnson K.J., Swartz R., Varani J.
Regulation of collagen turnover in human skin fibroblasts exposed to a gadolinium-based contrast agent
Invest. Radiol. 2009 Aug;44(8):433-439
- [7] Birchard K.R., Brown M.A., Hyslop W.B., Firat Z., Semelka R.C.
MRI of acute abdominal and pelvic pain in pregnant patients
Am. J. Roentgenol. 2005;184(2):452-458
- [8] Bloomfield T.H., Hawkins D.F., Philipp E., Setchell M.
The effect of drugs on the human fetus in
Scientific foundations of obstetrics and gynaecology
4. Auflage, Butterworth-Heinemann, Oxford, 2001
- [9] Broome D.R.

Nephrogenic systemic fibrosis associated with gadolinium based contrast agents: a summary of the medical literature reporting
Eur. J. Radiol. 2008, doi:10.1016/j.ejrad.2008.02.011

[10] Broome D.R., Girguis M.S., Baron P.W., Cottrell A.C., Kjellin I., Kirk G.A.
Gadodiamide-associated nephrogenic systemic fibrosis: why radiologists should be concerned
Am. J. Roentgenol. 2007 Feb;188(2):586-592

[11] Bucala R., Spiegel L.A., Chesney J., Hogan M., Cerami A.
Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair
Mol. Med. 1994 Nov;1(1):71-81

[12] Gadoliniumhaltige Kontrastmittel: Umsetzung des Beschlusses der Europäischen Kommission zum Risiko nephrogener systemischer Fibrosen (NSF)
Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM), Stand 07.09.2010
www.bfarm.de

[13] Büttner C., Skupin A., Reimann T., Rieber E.P., Unteregger G., Geyer P., Frank K.H.
Local production of interleukin-4 during radiation-induced pneumonitis and pulmonary fibrosis in rats: macrophages as a prominent source of interleukin-4
Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 1997 Sep;17(3):315-325

[14] Chiamonte M.G., Donaldson D.D., Cheever A.W., Wynn TA.
An IL-13 inhibitor blocks the development of hepatic fibrosis during a T-helper type 2-dominated inflammatory response
J. Clin. Invest. 1999 Sep;104(6):777-785

[15] Cockcroft D.W., Gault M.H.
Prediction of creatinine clearance from serum creatinine
Nephron 1976; 16:31-41

[16] Cowper S.E.
Nephrogenic fibrosing dermopathy[NFD/NSF website] <http://www.icnldr.org>
Auswertung Oktober 2007

[17] Cowper S.E.
Nephrogenic fibrosing dermopathy: the first 6 years
Curr. Opin. Rheumatol. 2003 Nov;15(6):785-790

[18] Crissman H.A., Mullaney P.F., Steinkamp J.A.
Methods and applications of flow systems for analysis and sorting of mammalian cells.
Methods Cell Biol. 1975;9(0):179-246

- [19] Crossgrove J, Zheng W.
Manganese toxicity upon overexposure.
NMR Biomed. 2004; 17:544-553.
- [20] Daram S.R., Cortese C.M., Bastani B.
Nephrogenic fibrosing dermopathy/nephrogenic systemic fibrosis: report of a new case with literature review
Am. J. Kidney Dis. 2005 Oct;46(4):754-759
- [21] DeHoratius D.M., Cowper S.E.
Nephrogenic systemic fibrosis: an emerging threat among renal patients
Semin.dial.2006; 19: 191-194
- [22] DeSantis M., Straface G., Cavaliere A.F., Carducci B., Caruso A.
Gadolinium periconceptional exposure: pregnancy and neonatal outcome
Acta. Obstet. Gynecol. Scand. 2007;86(1):99-101
- [23] Doucet C., Brouty-Boyé D., Pottin-Clémenceau C., Jasmin C., Canonica G.W., Azzarone B.
Interleukin (IL)-4 and IL-13 act on human lung fibroblasts. Implication in asthma
J. Clin. Invest. 1998 May 15;101(10):2129-2139
- [24] Edward M., Quinn J.A., Mukherjee S., Jensen M.B., Jardine A.G., Mark P.B., Burden A.D.
Gadodiamide contrast agent 'activates' fibroblasts: a possible cause of nephrogenic systemic fibrosis
J. Pathol. 2008 Apr;214(5):584-93.
- [25] Eriksson J.E., Dechat T., Grin B., Helfand B., Mendez M., Pallari H.M., Goldman R.D.
Introducing intermediate filaments: from discovery to disease
J. Clin. Invest. 2009;119:1763-1771
- [26] Farrell E., Wielopolski P., Pavljasevic P., van Tiel S., Jahr H., Verhaar J., Weinans H., Krestin G., O'Brien F.J., van Osch G., Bernsen M.
Effects of iron oxide incorporation for long term cell tracking on MSC differentiation in vitro and in vivo
Biochem. Biophys. Res. Commun. 2008;369:1076-1081
- [27] Fertin C., Nicolas J.F., Gillery P., Kalis B., Banchereau J., Maquart F.X.
Interleukin-4 stimulates collagen synthesis by normal and scleroderma fibroblasts in dermal equivalents
Cell. Mol. Biol. 1991;37(8):823-829
- [28] Finn W.F.
The clinical and renal consequences of contrast induced nephropathy
Nephrol. Dial. Transplant. 2006;21(6):i2-10

- [29] Frank J.A., Miller B.R., Arbad A.S., Zywicke H.A., Jordan E.K., Lewis B.K., Bryant L.H. Jr., Bulte J.W.
Clinically applicable labeling of mammalian and stem cells by combining superparamagnetic iron oxides and transfection agents
Radiology 2003;228:480-487
- [30] Frenzel T., Lengsfeld P., Schirmer H., Hütter J., Weinmann H.J.
Stability of gadolinium-based magnetic resonance imaging contrast agents in human serum at 37 degrees C.
Invest. Radiol. 2008;43(12):817-828
- [31] Freshney R.I.
Tierische Zellkulturen, ein Methoden-Handbuch
deGruyter Verlag Berlin, 1990: 242-245
- [32] Gibby W.A., Gibby K.A., Gibby W.A.
Comparison of Gd DTPA-BMA (Omniscan) versus Gd HP-DO3A (ProHance) retention in human bone tissue by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy
Invest. Radiol. 2004;39(3):138-142
- [33] Gibson S.E., Farver C.F., Prayson R.A.
Multiorgan involvement in nephrogenic fibrosing dermopathy: an autopsy case and review of the literature
Arch. Pathol. Lab. Med. 2006 Feb;130(2):209-212
- [34] Greisberg J.K., Wolf J.M., Wyman J., Zou L., Terek R.M.
Gadolinium inhibits thymidine incorporation and induces apoptosis in chondrocytes
J. Orthop. Res. 2001;19(5):797-801
- [35] Grobner T.
Gadolinium-a specific trigger for the development of nephrogenic fibrosing dermopathy and nephrogenic systemic fibrosis?
Nephrol. Dial. Transplant. 2006;21(4):1104-1108
- [36] Hahn G., Sorge I., Gruhn B., Glutig K., Hirsch W., Bhargava R., Furtner J., Born M., Schröder C., Ahlström H., Kaiser S., Moritz J.D., Kunze C.W., Shroff M., Stokland E., Trnkova Z.J., Schultze-Mosgau M., Reif S., Bacher-Stier C., Mentzel H.J.
Pharmacokinetics and safety of gadobutrol-enhanced magnetic resonance imaging in pediatric patients
Invest. Radiol. 2009;44:776-783
- [37] Harpur E.S., Worah D., Petter-Arndt H., Holtz E., Furuhami K., Nomura H.
Preclinical safety assessment and pharmacokinetics of gadodiamide injection, a new magnetic resonance imaging contrast agent

Invest. Radio. 1993;28(suppl.1): S28-S43

[38] Hartlapp I., Abe A., Saeed R.W., Peng T., Voelter W., Bucala R., Metz C.N.

Fibrocytes induce an angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and promote angiogenesis in vivo

FASEB J. 2001 Oct;15(12):2215-2224.

[39] Haylor J., Dencausse A., Vickers M., Nutter F., Jestin G., Slater D., Idee J.M., Morcos S.

Nephrogenic gadolinium biosdistribution and skin cellularity following a single injection of Omniscan in the rat

Invest. Radiol. 2010;45(9):507-512

[40] Heinrich M.C., Kuhlmann M.K., Kohlbacher S., Scheer M., Grgic A., Heckmann M.B., Uder M.

Cytotoxicity of iodated and gadolinium-based contrast agents in renal tubular cells at angiographic concentrations: in vitro study

Radiology. 2007;242(2):425-434

[41] High W.A., Ayers R.A., Chandler J., Zito G., Cowper S.E.

Gadolinium is detectable within the tissue of patients with nephrogenic systemic fibrosis

J. Am. Acad. Dermatol. 2007 Jan;56(1):21-26

[42] Hill J.M., Dick A.J., Raman V.K., Thompson R.B., Yu Z.X., Hinds K.A., Pessanha B.S., Guttman M.A., Varney T.R., Martin B.J., Dunbar C.E., McVeigh E.R., Lederman R.J.

Serial cardiac magnetic resonance imaging of injected mesenchymal stem cells

Circulation 2003;108:1009-1014

[43] Hoffmann K.F., McCarty T.C., Segal D.H., Chiaramonte M., Hesse M., Davis E.M., Cheever A.W., Meltzer P.S., Morse H.C. 3rd, Wynn T.A.

Disease fingerprinting with cDNA microarrays reveals distinct gene expression profiles in lethal type 1 and type 2 cytokine-mediated inflammatory reactions

FASEB J. 2001;15(13):2545-2547

[44] Hope T.A., Herfkens R.J., Denianke K.S., LeBoit P.E., Hung Y.Y., Weil E. Nephrogenic systemic fibrosis in patients with chronic kidney disease who received gadopentetate dimeglumine

Invest. Radiol. 2009;44(3):135-139

[45] Hubbard A.M., Crombleholme T.M., Adzick N.S.

Prenatal MRI evaluation of giant neck masses in preparation for the fetal exit procedure

Am. J. Perinatol. 1998;15(4):253-257

[46] Idée J.M., Port M., Raynal I., Schaefer M., Le Greneur S., Corot C.

Clinical and biological consequences of transmetallation induced by contrast agents for magnetic resonance imaging: a review
Fundam. Clin. Pharmacol. 2006 Dec;20(6):563-576

[47] Jiménez S.A., Artlett C.M., Sandorfi N., Derk C., Latinis K., Sawaya H., Haddad R., Shanahan J.C.
Dialysis-associated systemic fibrosis (nephrogenic fibrosing dermopathy): study of inflammatory cells and transforming growth factor beta1 expression in affected skin
Arthritis Rheum. 2004 Aug;50(8):2660-2666

[48] Joffe P., Thomsen M.S., Meusel M.
Pharmacokinetics of gadodiamide injection in patients with severe renal insufficiency and patients undergoing hemodialysis or continuous ambulatory peritoneal dialysis
Acad. Radiol. 1998;5(7):491-502

[49] Kanal E., Broome D.R., Martin D.R., Thomsen H.S.
Response to FDA's may 23, 2007, nephrogenic systemic fibrosis update
Radiology 2008;246:11-14

[50] Kanal E., Barkovich A.J., Bell C., Borgstede J.P., Bradley W.G. Jr., Froelich J.W., Gilk T., Gimbel J.R., Gosbee J., Kuhni-Kaminski E., Lester J.W. Jr., Nyenhuis J., Parag Y., Schaefer D.J., Sebek-Scoumis E.A., Weinreb J., Zaremba L.A., Wilcox P., Lucey L., Sass N.; ACR Blue Ribbon Panel on MR Safety.
ACR guidance document for safe MR practices: 2007
Am. J. Roentgenol. 2007;188(6):1447-1474

[51] Kasprian G., Balassy C., Brugger P.C., Prayer D.
MRI of normal and pathological fetal lung development
Eur. J. Radiol. 2006;57(2):261-270

[52] Kaviratne M., Hesse M., Leusink M., Cheever A.W., Davies S.J., McKerrow J.H., Wakefield L.M., Letterio J.J., Wynn T.A.
IL-13 activates a mechanism of tissue fibrosis that is completely TGF β -independent
J. Immunol. 2004;173(6):4020-4029

[53] Kitani A., Fuss I., Nakamura K., Kumaki F., Usui T., Strober W.
Transforming growth factor (TGF)- β 1-producing regulatory T-cells induce Smad-mediated interleukin 10 secretion that facilitates coordinated immunoregulatory activity and amelioration of TGF β 1-mediated fibrosis
J. Clin. Invest. 2000;105(1):61-70

[54] Kolodsick J.E., Toews G.B., Jakubzick C., Hogaboam C., Moore T.A., McKenzie A., Wilke C.A., Chrisman C.J., Moore B.B.

Protection from fluorescein isothiocyanate-induced fibrosis in IL-13-deficient, but not IL-4-deficient mice results from impaired collagen synthesis by fibroblasts
J. Immunol. 2004 Apr 1;172(7):4068-4076

[55] Lee C.G., Homer R.J., Zhu Z., Lanone S., Wang X., Koteliansky V., Shipley J.M., Gotwals P., Noble P., Chen Q., Senior R.M., Elias J.A.
Interleukin 13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor- β 1
J. Exp. Med. 2001;194(6):809-821

[56] Lee E.S., Chan J., Shuter B., Tan L.G., Chong M.S., Ramachandra D.L., Dawe G.S., Ding J., Teoh S.H., Beuf O., Briguet A., Tam K.C., Choolani M., Wang S.C.
Microgel iron oxide nanoparticles for tracking human fetal mesenchymal stem cells through magnetic resonance imaging
Stem Cells 2009;27:1921-1931

[57] Lindl T., Lewandowski B., Schreyögg S., Stäudte A.
An evaluation of the in vitro cytotoxicities of 50 chemicals by using an electrical current exclusion method versus the neutral red uptake and MTT assays
Altern. Lab. Anim. 2005; 33(6): 591-601

[58] Liu X., Ashtari M., Leonidas J.C., Chan Y.
Magnetic resonance imaging of the fetus in congenital intrathoracic disorders: preliminary observations
Pediatr. Radiol. 2001;31(6):435-439

[59] Mantel P.Y., Schmidt-Weber C.B.
Transforming growth factor beta: recent advances on its role in immune tolerance
Methods Mol. Biol. 2011;677:303-38

[60] Marckmann P., Skov L., Rossen K., Dupont A., Damholt M.B., Heaf J.G., Thomsen H.S.
Nephrogenic systemic fibrosis: suspected causative role of gadodiamide used for contrast-enhanced magnetic resonance imaging
J. Am. Soc. Nephrol. 2006;17(9):2359-2362

[61] Marcos H.B., Semelka R.C., Worawattanakul S.
Normal placenta: gadolinium-enhanced dynamic MR imaging
Radiology. 1997;205(2):493-496

[62] McCullough P.A., Adam A., Becker C.R., Davidson C., Lameire N., Stacul F., Tumlin J.; CIN Consensus Working Panel.
Epidemiology and prognostic implications of contrast induced nephropathy
Am. J. Cardiol. 2006;98(6A):5K-13K

- [63] Meran S., Thomas D.W., Stephens P., Enoch S, Martin J., Steadman R., Phillips A.O.
Hyaluronan facilitates transforming growth factor-beta-1 mediated fibroblast proliferation
J. Biol. Chem. 2008 Mar;283(10):6530-6545
- [64] Michaely H.J., Thomsen H.S., Reiser M.F., Schoenberg S.O.
Nephrogene systemische Fibrose (NSF) – Implikationen für die Radiologie
Radiologie 2007;47:785-793
- [65] Moore B.B., Paine R. 3rd, Christensen P.J., Moore T.A., Sitterding S., Ngan R., Wilke C.A., Kuziel W.A., Toews G.B.
Protection from pulmonary fibrosis in the absence of CCR2 signalling
J. Immunol. 2001 Oct 15;167(8):4368-4377
- [66] Morcos S.K., Haylor J.
Pathophysiology of nephrogenic systemic fibrosis: a review of experimental data
World J. Radiol. 2010 Nov 28;2(11):427-433
- [67] Morcos S.K.
Extracellular gadolinium contrast agents: differences in stability
Eur. J. Radiol. 2008;66(2):175-179
- [68] Moreno-Romero J.A., Segura S., Mascaró J.M. Jr., Cowper S.E., Julià M., Poch E., Botey A., Herrero C.
Nephrogenic systemic fibrosis: a case series suggesting gadolinium as a possible aetiological factor
Br. J. Dermatol. 2007 Oct;157(4):783-7.
- [69] Nicklas A.H., Baker M.E.
Imaging strategies in the pregnant cancer patient
Semin. Oncol. 2000;27(6):623-632
- [70] Novak Z., Thurmond A.S., Ross P.L., Jones M.K., Thornburg K.L., Katzberg R.W.
Gadolinium-DTPA transplacental transfer and distribution in fetal tissues in rabbits
Invest. Radiol. 1993;28(9):828-830
- [71] Okada S., Katagiri K., Kumazaki T., Yokoyama H.
Safety of gadolinium contrast agent in hemodialysis patients
Acta. Radiol. 2001;42(3):339-341
- [72] Okazaki O., Murayama N., Masubuchi M., Nomura H., Hokusui H.
Placental transfer and milk secretion of gadodiamide injection in rats
Arzneimittelforschung. 1996;46(1):83-86

- [73] Okuda Y., Sagami F., Tirone P., Morisetti A., Bussi S., Masters R.E. Reproductive and developmental toxicity study of gadobenate dimeglumine formulation (E7155) (3)-study of embryo-fetal toxicity in rabbits by intravenous administration
J. Toxicol. Sci. 1999;24 Suppl 1:79-87
- [74] Ong C., Wong C., Roberts C.R., Teh H.S., Jirik F.R. Anti-IL-4 treatment prevents dermal collagen deposition in the tight-skin mouse model of scleroderma
Eur. J. Immunol. 1998;28(9):2619-2629
- [75] Pardo A., Selman M. Matrix metalloproteinases in aberrant tissue remodelling
Proc. Am. Thorac. Soc. 2006;3(4):383-388
- [76] Patel S.J., Reede D.L., Katz D.S., Subramaniam R., Amorosa J.K. Imaging the pregnant patient for nonobstetric conditions: algorithms and radiation dose considerations
Radiographics. 2007;27(6):1705-1722
- [77] Pietsch H., Pering C., Lengsfeld P., Walter J., Steger-Hartmann T., Golfier S., Frenzel T., Hütter J., Weinmann H.J., Sieber M.A. Evaluating the role of zinc in the occurrence of fibrosis of the skin: a preclinical study
J. Magnet. Reson. Imaging 2009;30(2):374-383
- [78] Pietsch H., Lengsfeld P., Steger-Hartmann T., Löwe A., Frenzel T., Hütter J., Sieber M.A. Impact of renal impairment on long-term retention of gadolinium in the rodent skin following the administration of gadolinium-based contrast agents
Invest. Radiol. 2009;44(4):226-233
- [79] Pintaske J., Bantleon R., Kehlbach R., Claussen C.D., Wiskirchen J., Schick F. Effect of concentration of SH U 555A labeled human melanoma cells on MR spin echo and gradient echo signal decay at 0,2, 1,5 and 3T
MAGMA 2006;19:71-77
- [80] Prince M.R., Arnoldus C., Frisoli J.K. Nephrotoxicity of high-dose gadolinium compared with iodated contrast
J. Magn. Reson. Imaging. 1996;6(1):162-166
- [81] Puttagunta N.R., Gibby W.A., Smith G.T. Human in vivo comparative study of zinc and copper transmetallation after administration of magnetic resonance contrast agents
Invest. Radiol. 1996;31(12):739-742
- [82] Quan T.E., Cowper S., Wu S.P., Bockenstedt L.K., Bucala R.

Circulating fibrocytes: collagen-secreting cells of the peripheral blood
Int. J. Biochem. Cell. Biol. 2004;36(4):598-606

[83] Reimer P., Vosshenrich R.
Kontrastmittel in der MRT: Substanzen, Wirkungen, Pharmakologie, Zulassung
Radiologe 2004;44:273-283

[84] Roberts A.B., Russo A., Felici A., Flanders K.C.
Smad3: a key player in pathogenetic mechanisms dependent on TGF β
Ann. N.Y. Acad. Sci. 2003 May;995:1-10

[85] Rodrigo E., Fernandez-Fresnedo G., Ruiz J.C., Piñera C., Heras M., de
Francisco A.L., Sanz de Castro S., Cotorruelo J.G., Zubimendi J.A., Arias M.
Assessment of glomerular filtration rate in transplant recipients with severe
renal insufficiency by Nankivell, modification of diet in renal disease (MDRD)
and Cockcroft-Gault equations
Transplant. Proc. 2003;35:1671-1672

[86] Rofsky N.M., Pizzarello D.J., Duhaney M.O., Falick A.K., Prendergast N.,
Weinreb J.C.
Effect of magnetic resonance exposure combined with gadopentetate
dimeglumine on chromosomes in animal specimens
Acad. Radiol. 1995;2(6):492-496

[87] Rofsky N.M., Pizzarello D.J., Weinreb J.C., Ambrosino M.M., Rosenberg
C.
Effect on fetal mouse development of exposure to MR imaging and
gadopentetate dimeglumine
J. Magn. Reson. Imaging. 1994;4(6):805-807

[88] Rydahl C., Thomsen H., Marckmann P.
High prevalence of nephrogenic systemic fibrosis in chronic renal failure
patients exposed to gadodiamide, a gadolinium-containing magnetic resonance
contrast agent
Invest. Radiol. 2008;43(2):141-144

[89] Sadowski E.A., Bennett L.K., Chan M.R., Wentland A.L., Garrett A.L.,
Garrett R.W., Djamali A.
Nephrogenic systemic fibrosis: risk factors and incidence estimation
Radiology 2007;243(1):148-157

[90] Sandler N.G., Mentink-Kane M.M., Cheever A.W., Wynn T.A.
Global gene expression profiles during acute pathogen-induced pulmonary
inflammation reveal divergent roles for Th1 and Th2 responses in tissue repair
J. Immunol. 2003;171(7):3655-3667

[91] Sato M., Muragaki Y., Saika S., Roberts A.B., Ooshima A.

Targeted disruption of TGF β 1/Smad3 signalling protects against renal tubulointerstitial fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction
J. Clin. Invest. 2003;112(10):1486-1494

[92] Schmidt M., Sun G., Stacey M.A., Mori L., Mattoli S.
Identification of circulating fibrocytes as precursors of bronchial myofibroblasts in asthma
J. Immunol. 2003 Jul 1;171(1):380-389

[93] Schwenzer N.F., Bantleon R., Maurer B., Kehlbach R., Herberts T., Claussen C.D., Rodegerdts E.
In vitro evaluation of magnetic resonance imaging at 3.0 tesla on clonogenic activity, proliferation, and cell cycle in human embryonic lung fibroblasts
Invest. Radiol. 2007;42(4):212-217

[94] Sieber M.A., Pietsch H., Walter J., Haider W., Frenzel T., Weinmann H.J.
A preclinical study to investigate the development of nephrogenic systemic fibrosis: a possible role for gadolinium-based contrast agents
Invest. Radiol. 2008;43(1):65-75

[95] Sohn Y.S., Kim M.J., Kwon J.Y., Kim Y.H., Park Y.W.
The usefulness of fetal MRI for prenatal diagnosis
Yonsei. Med. J. 2007;48(4):671-677

[96] Soltys R.A.
Summary of preclinical safety evaluation of gadoteridol injection
Invest. Radiol. 1992;27 Suppl 1:S7-11

[97] Spencer A., Wilson S., Harpur E.
Gadolinium chloride toxicity in the mouse
Hum. Exp. Toxicol. 1998;17:633-637

[98] Steger-Hartmann T., Hofmeister R., Ernst R., Pietsch H., Sieber M.A., Walter J.
A review of preclinical safety data for Magnevist (Gadopentetate Dimeglumine) in the context of nephrogenic systemic fibrosis
Invest. Radiol. 2010;45:520-528

[99] Strutz F., Zeisberg M., Renziehausen A., Raschke B., Becker V., van Kooten C., Müller G.
TGF-beta 1 induces proliferation in human renal fibroblasts via induction of basic fibroblast growth factor (FGF-2)
Kidney Int. 2001 Feb;59(2):579-592

[100] Tanaka Y.O., Sohda S., Shigemitsu S., Niitsu M., Itai Y.
High temporal resolution dynamic contrast MRI in a high risk group for placenta accreta
Magn. Reson. Imaging. 2001;19(5):635-642

- [101] Thomsen H.S.
Imaging patients with chronic kidney disease: CIN or NSF?
Radiol. Med. 2007;112:621-625
- [102] Ting W.W., Stone M.S., Madison K.C., Kurtz K.
Nephrogenic fibrosing dermopathy with systemic involvement
Arch. Dermatol. 2003 Jul;139(7):903-906
- [103] Tokuda A., Itakura M., Onai N., Kimura H., Kuriyama T., Matsushima K.
Pivotal role of CCR1-positive leukocytes in bleomycin-induced lung fibrosis in mice
J. Immunol. 2000 Mar 1;164(5):2745-2751
- [104] Todd D.J., Kagan A., Chibnik L.B., Kay J.
Cutaneous changes of nephrogenic systemic fibrosis: predictor of early mortality and association with gadolinium exposure
Arthritis Rheum. 2007;56(10):3433-3441
- [105] Torkzad M.R., Bremme K., Hellgren M.
Magnetic resonance imaging and ultrasonography in diagnosis of pelvic vein thrombosis during pregnancy
Thromb. Res. 2010;126(2):107-112
- [106] Tweedle M.F., Wedeking P., Kumar K.
Bisodistribution of radiolabeled, formulated gadopentetate, gadoteridol, gadoterate, and gadodiamide in mice and rats
Invest. Radiol. 1995;30(6):372-380
- [107] Varani J., DaSilva M., Warner R.L., Deming M.O., Barron A.G., Johnson K.J., Swartz R.D.
Effects of gadolinium-based magnetic resonance imaging contrast agents on human skin in organ culture and human skin fibroblasts
Invest. Radiol. 2009 Feb;44(2):74-81
- [108] Verswijvel G., Grieten M., Gyselaers W., Van Holsbeke C., Vandevenne J., Horvath M., Gelin G., Palmers Y.
MRI in the assessment of pregnancy related intrauterine bleeding: a valuable adjunct to ultrasound?
JBR-BTR. 2002;85(4):189-192
- [109] Wadas T.J., Sherman C.D., Miner J.H., Duncan J.R., Anderson C.J.
The biodistribution of [153Gd]Gd-labeled magnetic resonance contrast agents in a transgenic mouse model of renal failure differs greatly from control mice
Magn. Reson. Med. 2010;64(5):1274-1280
- [110] Wallace W.A., Ramage E.A., Lamb D., Howie S.E.

A type 2 (Th2-like) pattern of immune response predominates in the pulmonary interstitium of patients with cryptogenic fibrosing alveolitis (CFA)
Clin. Exp. Immunol. 1995 Sep;101(3):436-441

[111] Webb J.A., Thomsen H.S., Morcos S.K.; Members of Contrast Media Safety Committee of European Society of Urogenital Radiology (ESUR).
The use of iodated and gadolinium contrast media during pregnancy and lactation
Eur. Radiol. 2005;15(6):1234-1240

[112] Wermuth P.J., Del Galdo F., Jiménez S.A.
Induction of the expression of profibrotic cytokines and growth factors in normal peripheral blood monocytes by gadolinium contrast agents
Arthritis Rheum. 2009 May;60(5):1508-1518

[113] Wertman R., Altun E., Martin D.R., Mitchell D.G., Leyendecker J.R., O'Malley R.B., Parsons D.J., Fuller E.R. 3rd, Semelka R.C.
Risk of nephrogenic systemic fibrosis: evaluation of gadolinium chelate contrast agents at four American universities
Radiology. 2008;248(3):799-806

[114] White G.W., Gibby W.A., Tweedle M.F.
Comparison of Gd(DTPA-BMA) (Omniscan) versus Gd(HP-DO3A) (ProHance) relative to gadolinium retention in human bone tissue by inductively coupled plasma mass spectroscopy
Invest. Radiol. 2006;41(3):272-278

[115] Wible J.H., Troup C.M., Hynes M.R., Galen K.P., MacDonald J.R., Barco S.J., Wojdyla J.K., Periasamy M.P., Adams M.D.
Toxicological assessment of gadoversetamide injection (OptiMARK), a new contrast-enhancement agent for use in magnetic resonance imaging
Invest. Radiol. 2001;36:401-412

[116] Wiesinger B., Kehlbach R., Hensen J., Bebin J., Bantleon R., Schwenzer N., Spira D., Claussen C.D., Wiskirchen J.
Effects of magnetic resonance imaging contrast agents on human umbilical vein endothelial cells and evaluation of magnetic resonance contrast media triggered transforming growth factor-beta induction in dermal fibroblasts (HSF) as a model for nephrogenic systemic fibrosis
Invest. Radiol. 2011;46:71-76

[117] Wiesinger B., Kehlbach R., Bebin J., Hensen J., Bantleon R., Schmehl J., Dietz K., Claussen C.D., Wiskirchen J.
Effects of MRI contrast agents on human embryonic lung fibroblasts
Invest Radiol. 2010 Sep;45(9):513-519.

[118] Wiginton C.D., Kelly B., Oto A., Jesse M., Aristimuno P., Ernst R., Chaljub G.

Gadolinium-based contrast exposure, nephrogenic systemic fibrosis, and gadolinium detection in tissue

Am. J. Roentgenol. 2008 Apr;190(4):1060-1068

[119] Williams S.F., Meek S.E., Moraghan T.J.
Spurious hypocalcemia after gadodiamide administration
Mayo Clin. Proc. 2005;80(12):1655-1657

[120] Wiskirchen J., Groenewaeller E.F., Kehlbach R., Heinzelmann F., Wittau M., Rodemann H.P., Claussen C.D., Duda S.H.
Long-term effects of repetitive exposure to a static magnetic field (1,5 T) on proliferation of human fetal lung fibroblasts
Magn. Reson. Med. 1999;41(3):464-468

[121] Wynn T.A.
Cellular and molecular mechanisms of fibrosis
J. Pathol. 2008 Jan;214(2):199-210

[122] Zhang H.L., Ersoy H., Prince M.R.
Effects of gadopentetate dimeglumine and gadodiamide on serum calcium, magnesium, and creatinine measurements
J. Magn. Reson. Imaging 2006;23(3):383-387

Danksagung

Ich danke Herrn Professor C. D. Claussen und meinem Doktorvater PD Dr. J. Wiskirchen für die Möglichkeit der Promotion in ihrer Abteilung.

Mein Dank gilt Herrn Dr. med. Benjamin Wiesinger für die Ausarbeitung des Themas sowie für die Anregungen und die konstruktive Beurteilung während des Schreibprozesses.

Herrn Professor Dr. K. Dietz gebührt mein Dank für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung der erhobenen Daten.

Ich möchte auch meiner Kommilitonin Jennifer Hensen danken, durch deren Präsenz sich die Durchführung des experimentellen Teils sehr angenehm gestaltet hat.

Herrn Dipl. biol. Rainer Kehlbach gilt mein besonderer Dank. Seine hervorragende Einführung in die Zellkulturarbeit und seine Anregungen bei der Versuchsdurchführung haben mir ein schnelles selbständiges Arbeiten ermöglicht. Darüber hinaus stand er mir mit wertvollen Ratschlägen in allen Phasen der Doktorarbeit zur Seite.

Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name: Julie Bébin
Geburtsdatum/-ort: 12.04.1983 in Saarbrücken
Nationalität: deutsch, französisch
Familienstand: ledig

Schulbildung

1993-2002 Deutsch-Französisches Gymnasium Saarbrücken
1998/1999 Brother André High School Markham, Ontario,
Kanada

Hochschulausbildung

2003-2010 Medizinstudium an der Universität Tübingen
2006/2007 Medizinstudium an der Universidad Miguel
Hernández Elche, Spanien
08/2008-07/2009 Praktisches Jahr in Valdivia (Chile), Tübingen und
Bordeaux, Wahlfach Neurologie
08.06.2010 2. Staatsexamen, Note: gut (2,0)

Beruflicher Werdegang

seit 07/2011 Assistenzärztin Klinik für Allgemein- und
Unfallchirurgie, Evangelisches Krankenhaus
Hubertus, Berlin