

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

**Einfluss der MR-Kontrastmittel MultiHance[®],
Omniscan[®] und Teslascan[®]
auf humane embryonale Lungenfibroblasten und
humane Nabelschnurendothelzellen**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der
Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Jennifer Hemsen
aus
Moers**

2012

Dekan: Professor Dr. I.B. Autenrieth
1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. J. Wiskirchen
2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. O. Kagan

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	6
1.1 Das Prinzip der Magnetresonanztomographie	6
1.2 Der Einsatz von Kontrastmitteln in der MRT	8
1.3 Folgende Kontrastmittel werden in der MRT eingesetzt	8
1.3.1 Gadodiamid, Omniscan®	9
1.3.2 Gadobensäure (Dimegluminsalz), Multi-Hance®	10
1.3.3 Mangofidipir, Teslascan®	12
1.4 Anwendungsgebiete der Magnetresonanztomographie	15
1.5 Problematik	16
1.6 Ziel der Arbeit	17
2. Material und Methoden	18
2.1 Materialien für die Zellkulturen	18
2.1.1 Zellen	18
2.1.2 Kulturmedium	18
2.1.3 Medienzusätze	19
2.1.4 Trypsin-Lösung	20
2.1.5 Phosphatgepufferte Salzlösung (“Phosphate-Bufferde-Saline“, PBS)	20
2.1.6 Sterilbank	20
2.1.7 Kontrastmittel	21
2.2 Methoden	27
2.2.1 Auftauen	27
2.2.2 Passagieren	28
2.2.3 Proliferationskinetik (PK)	29
2.2.4 Koloniebildungsassay (KoBi)	30

3. Ergebnisse	31
3.1 Proliferationskinetik, humane embryonale Lungenfibroblasten (Hel)	
3.1.1 MultiHance [®] , Inkubation 4 h, humane embryonale Lungenfibroblasten	32
3.1.2 MultiHance [®] , Inkubation 24 h, humane embryonale Lungenfibroblasten	34
3.1.3 Teslascan [®] , Inkubation 4 h, humane embryonale Lungenfibroblasten	35
3.1.4 Teslascan [®] , Inkubation 24 h, humane embryonale Lungenfibroblasten	37
3.1.5 Omniscan [®] , Inkubation 4 h, humane embryonale Lungenfibroblasten	38
3.1.6 Omiscan [®] , Inkubation 24 h, humane embryonale Lungenfibroblasten	40
3.1.7 Vergleich der Kontrastmittel	42
3.2 Proliferationskinetik humane Nabelschnurendothelzellen (HUVEC)	43
3.2.1 MultiHance [®] , Inkubation 24 h, Nabelschnurendothelzellen	43
3.2.2 Teslascan [®] , Inkubation 24 h, Nabelschnurendothelzellen	44
3.2.3 Omiscan [®] , Inkubation 24 h, Nabelschnurendothelzellen	46
3.2.4 Vergleich der Kontrastmittel, 20x, Nabelschnurendothelzellen	47
3.3 Koloniebildungsassay, humane embryonale Lungenfibroblasten	48
3.3.1 Koloniebildungsassay, humane Lungenfibroblasten Inkubationszeit 4h	49
3.3.2 Koloniebildungsassay, humane Lungenfibroblasten Inkubationszeit 24 h	50
3.4 Koloniebildungsassay, humane Nabelschnurendothelzellen	52
3.4.1 Koloniebildungsassay, Nabelschnurendothelzellen, Inkubationszeit 24 h	52

3.5 Statistik	54
4. Diskussion	70
4.1 Regelungen der Gabe von MRT-Kontrastmitteln während der Schwangerschaft	70
4.2 Klinische Studien über die Effekte von Kontrastmitteleinsatz während der Schwangerschaft	71
4.3 Effekte von Kontrastmitteln im Tiermodell	72
4.3.1 Magnevist®	73
4.3.2 MultiHance®	73
4.3.3 Teslascan®	75
4.4 Effekte von Kontrastmitteln in vitro	76
4.4.1 Omniscan®	76
4.4.2 MultiHance®, Omniscan®	77
4.5 Zusammenfassung bisheriger Studien	77
4.6 Eigene Untersuchungen	79
4.6.1 Wahl der Zellen	79
4.6.2 Proliferationskinetik	79
4.6.3 Koloniebildungsassay	79
4.7 Stabilität der Kontrastmittel	82
4.8 Schlussfolgerungen	83
5. Zusammenfassung	86
6. Literaturverzeichnis	88
7. Danksagung	95
8. Curriculum vitae	97

1. Einleitung

1.1 Die Magnetresonanztomographie

Das Prinzip der Magnetresonanztomographie

Die Magnetresonanztomographie (MRT) ist ein bildgebendes Verfahren, das in der medizinischen Diagnostik zur Darstellung von Struktur und Funktion der Gewebe und Organe im menschlichen Körper eingesetzt wird.

In der MRT werden sehr starken Magnetfelder sowie elektromagnetische Wechselfelder im Radiofrequenzbereich zur Diagnostik und Bildgewinnung eingesetzt.

Im Folgenden soll das Prinzip der MRT vereinfacht dargestellt werden:

Atomkerne mit einfach ungerader Protonen- und/oder Neutronenzahl haben einen kreisähnlichen Eigendrehimpuls, den so genannten Kernspin.

Die elektrische Ladung rotiert mit den Protonen und bildet so ein eigenes kleines Magnetfeld. Im menschlichen Körper werden die Wasserstoffatome für die Bildgebung in der MRT genutzt. Diese Kernspins sind ohne Einwirkung eines Magnetfeldes nicht ausgerichtet. Bringt man sie aber nun wie in der MRT in ein starkes Magnetfeld, so erfolgt ihre Ausrichtung entlang der Magnetfeldlinien parallel oder antiparallel. Dabei entsprechen die Kreiselbewegungen entlang der Magnetfeldlinien der Geschwindigkeit und somit der Frequenz der Stärke des Magnetfeldes (Präzessionsgeschwindigkeit/-frequenz bzw. Larmor-Frequenz in Hz oder MHz). Durch elektrische Hochfrequenzwellen (Radiowellen), welche eine den Protonen identische Frequenz und Geschwindigkeit aufweisen, kann die Ausrichtung des Kernspins beeinflusst werden. Die Protonen nehmen die Hochfrequenzenergie auf und reagieren darauf mit einer Richtungsänderung. Dabei nimmt die Longitudinalmagnetisierung ab, die Transversalmagnetisierung zu.

Sobald die Hochfrequenzstrahlung endet, bewegen sich die Kernspins in ihre Ausgangslage zurück. Das daraus entstehende elektromagnetische

Induktionsfeld wird auf einer Empfänger-Spule aufgefangen, was als Kernrelaxation bezeichnet wird.

Die Signale, die hierbei von den Wasserstoffatomen zurückgesendet werden, werden von einem Computer analysiert und zur Erzeugung des Bildes verwendet.

Die Zeit, die die Wasserstoffkerne benötigen, um in den Gleichgewichtszustand zurückzukehren, bezeichnet man als Relaxationszeit.

Man unterscheidet zwei Relaxationszeiten:

Die T1-Relaxationszeit, welche aus Longitudinalrelaxationszeit oder Spin-Gitter-Relaxationszeit genannt wird und ungefähr 300-2000 ms lang ist.

Die T2-Relaxationszeit, auch Transversalrelaxationszeit oder Spin-Spin-Relaxationszeit genannt. Sie ist ungefähr 30-150 ms lang.

Die Repititionszeit (TR) bezeichnet die Zeit zwischen zwei aufeinander folgenden Hochfrequenzimpulsen. Die Echozeit (TE) ist die Zeit, die verstreicht von der Anregung der Wasserstoffkerne bis zu der Ankunft des Antwortsignals.

Wählt man eine lange TR- und TE-Zeit, so werden Bilder erzeugt, die stärker von den T2-Werten des Gewebes abhängen. Wählt man hingegen ein kurze TR- und TE-Zeiten, so erhält man Bilder, die stärker T1-abhängig sind.

So kann man die relative Signalintensität unterschiedlicher Gewebe beeinflussen, um schließlich das zu untersuchende Organ oder das Krankheitsbild bestmöglich darzustellen. Die verschiedenen Körpergewebe senden charakteristische MRT-Signale, aus denen sich ableitet, ob sie auf dem entsprechenden Bild weiß, grau oder schwarz erscheinen.

Die MRT verwendet starke Magneten mit einer Feldstärke zwischen 1 und 7,0 Tesla.

1.2 Der Einsatz von Kontrastmitteln in der MRT

Bei der MRT hängt die bildliche Darstellung von anatomischen Strukturen und pathologischen Veränderungen vom Signalkontrast zwischen den angrenzenden normalen und pathologischen Geweben ab.

Mit der Einführung der Magnetresonanztomographie glaubte man zunächst, dass man aufgrund des hervorragenden Gewebekontrastes keine Kontrastmittel benötigt. Bald stellte man jedoch fest, dass auch bei der MRT ähnlich wie bei der Computertomographie spezielle Kontrastmittel weitere, diagnostisch hilfreiche Informationen liefern können. Zum Beispiel führt eine Verkürzung der T1- und T2-Relaxationszeit durch das Kontrastmittel zu einer Signalverstärkung bei T1-gewichteten Bildern und zu einer Signalabnahme bei T2-gewichteten Bildern.

1.3 Folgende Kontrastmittel werden in der MRT eingesetzt

Heute stehen für die Magnetresonanztomographie im Wesentlichen vier Substanzklassen an Kontrastmitteln zur Verfügung:

- niedermolekulare Gadoliniumchelate
- höher konzentrierte Gadoliniumchelate
- superparamagnetische Eisenperoxidpartikel und
- hepatobiliäre Kontrastmittel

Die in dieser Arbeit verwendeten Kontrastmittel Omniscan[®] und MultiHance[®] gehören zu den höher konzentrierten gadoliniumhaltigen Kontrastmitteln.

Das Gadoliniumion ist, aufgrund von sieben ungepaarten Elektronen, eine sehr stark paramagnetische Substanz. Da dieses Schwermetallkation über toxische Eigenschaften verfügt, ist es nicht in freier Form anzuwenden, sondern immer an einen Liganden gebunden. Bei diesen Gadoliniumkomplexen unterscheidet

man in ihrem Aufbau lineare von nicht-linearen und ionische von nicht-ionischen Komplexen (46).

1.3.1 Gadodiamid, Omniscan®

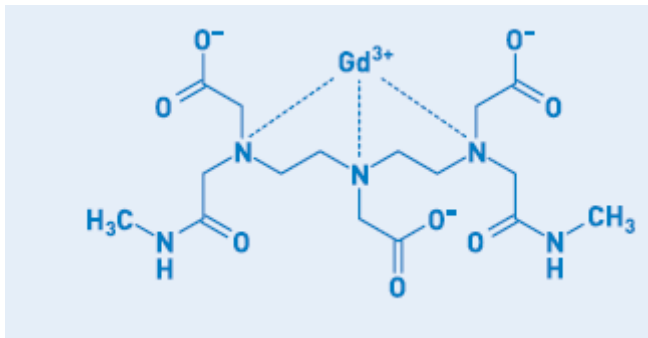


Abb.1.1: chemische Strukturformel von Gadodiamid, Omniscan®

Die Strukturformel von Omniscan® zeigt, dass es sich um ein nicht-ionisches, lineares Molekül handelt.

Pharmakodynamik

Omniscan® ist ein nicht-ionisches paramagnetisches Kontrastmittel, welches seine Anwendung zum Beispiel in der kranialen und spinalen Magnetresonanztomographie und in der allgemeinen Magnetresonanztomographie des ganzen Körpers inklusive der Ganzkörper-Angiographie findet. Der Gadoliniumkomplex ist hierbei für den kontrasterhöhenden Effekt in der Magnetresonanztomographie verantwortlich. Die T1-Relaxationszeit wird unter dem Einfluss des Gadoliniumions verkürzt, worauf eine Erhöhung der Signalintensität resultiert und wodurch wiederum eine Bildkontrasterhöhung in T1-gewichteten Bildern erzielt wird. Somit wird die Erkennung pathologischer Strukturen oder Läsionen in verschiedenen Körperteilen einschließlich des ZNS erleichtert.

Pharmakokinetik

Nach intravenöser Bolusgabe verteilt sich Gadodiamid recht zügig in der Extrazellulärflüssigkeit. Seine Halbwertszeit der Verteilung beträgt ungefähr vier Minuten, die Eliminationshalbwertszeit 70 Minuten. Die Elimination des unveränderten Gadodiamid erfolgt renal. Vier Stunden nach Injektion lassen sich 85% der verabreichten Dosis im Urin nachweisen. Eine Plasma-Proteinbindung ist nicht nachzuweisen.

1.3.2 Gadobensäure (Dimegluminsalz), MultiHance® (Gd-BOPTA)

MultiHance® ist ein paramagnetisches Kontrastmittel für die MRT-Diagnostik. Es wird vor allem eingesetzt zur Erkennung fokaler Leberläsionen, z.B. bei hepatozellulärem Karzinom, bei der Bildgebung des Gehirns und des Rückenmarks. In der Leberdiagnostik bewirkt MultiHance® bei T1-gewichteter Darstellung eine Verstärkung der Signalintensität in normalem Parenchym, so dass nach einigen Minuten ein Kontrast zu fokalen Leberläsionen sichtbar wird. Weiterhin wird MultiHance® zu ca. 5-8% hepatobiliär eliminiert.

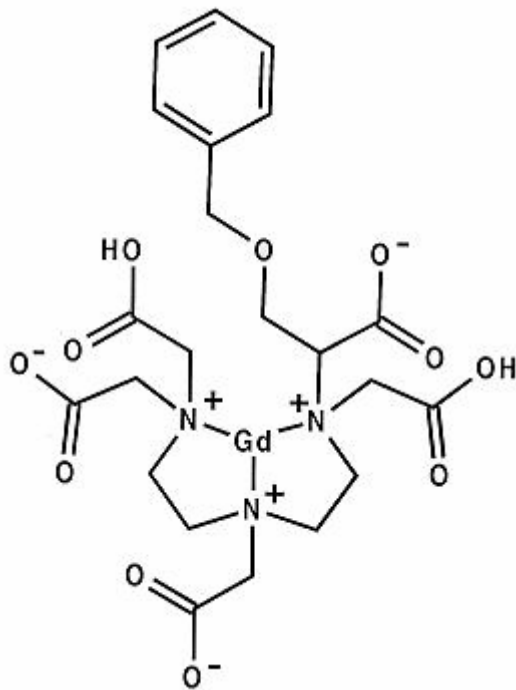


Abb. 1.2: chemische Strukturformel von Gadobenat Dimeglumin MultiHance[®] (Gd-DOPTA)

Bei MultiHance[®] handelt es sich um ein lineares ionisches Molekül.

Pharmakodynamik

Das Gadoliniumchelate Gadobensäure, Dimegluminsalz, verkürzt sowohl die T1 als auch in geringerem Maße die T2-Relaxationszeit.

Bei T1-gewichteter Darstellung der Leber führt der Einsatz von MultiHance[®] bei der MRT zu einer deutlichen und anhaltenden Verstärkung der Signalintensität des normalen Leberparenchyms. Somit kann eine verbesserte Detektion von Leberläsionen erzielt werden. In der Bildgebung des ZNS ermöglicht MultiHance[®] ein verbessertes Enhancement von normalem Gewebe ohne Blut-Hirn-Schranke, extraaxialen Tumoren und von Tumoren, die mit einer Störung der Blut-Hirn-Schranke einhergehen.

Pharmakokinetik

Nach intravenöser Injektion verteilt sich die Substanz im Plasma und im Extrazellulärraum. Die Verteilungs- und Eliminationszeiten liegen zwischen 0,085 und 0,117 Stunden bzw. zwischen 1,17 und 1,68 Stunden.

Nach einer schnellen Elimination des Gadobenat-Ions aus dem Plasma erfolgt die Ausscheidung vor allem renal und in geringerem Umfang auch über die Galle.

Das Gadobenat-Ion durchdringt die intakte Blut-Hirn-Schranke nicht, so dass es zu keiner Anreicherung im normalen Hirngewebe oder in Läsionen mit intakter Blut-Hirn-Schranke kommt. Bei einer Schrankenstörung, wie sie für maligne Tumoren oder Gefäßmissbildungen typisch ist, kann das Ion jedoch in die Läsion vordringen

1.3.3 Mangofidipir, Teslascan®

Ähnlich wie MultiHance® eignet sich Teslascan® ganz besonders zur Darstellung der Leber, da diese Substanzen von der Leber aufgenommen werden und eine partielle Ausscheidung über eine aktive biliäre Exkretion erfolgt. Mangafodipir (Mn-DPDP, Teslascan®) ist ein paramagnetisches Manganchelat und wurde dediziert zur Darstellung der Leber entwickelt (70).

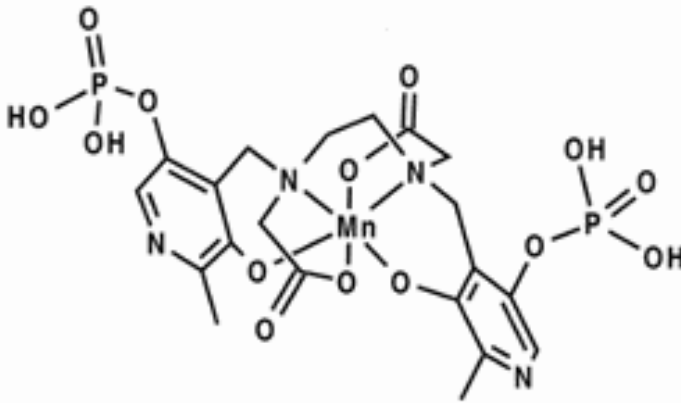


Abb. 1.3: chemische Strukturformel von Mangafodipir, Teslascan®

Bei Teslascan® handelt es sich um ein nicht-ionisches Molekül.

Pharmakodynamik

Teslascan® wird als Trinatriumhydrogensalz eingesetzt und ist ein Manganatkomplexsalz. Mangafodipir ist ein Chelatkomplex bestehend aus dem Metall Mangan, welches paramagnetische Eigenschaften besitzt und somit für die Kontrasterhöhung in der MRT verantwortlich ist, und dem Liganden Fodipir, Dipyridoxyl-Diphosphat. Teslascan® wird als diagnostisches Hilfsmittel bei Patienten eingesetzt, bei denen mittels MRT Läsionen (beispielsweise Metastasen) in der Leber nachgewiesen und von lebereigenem Gewebe differenziert werden sollen.

Weiterhin kann Teslascan® beispielsweise auch bei der Bildgebung des Pankreas eingesetzt werden. Nach der intravenösen Verabreichung des Kontrastmittels wird das Mangan freigesetzt und von gesundem Leber- und Pankreasgewebe besser aufgenommen als von pathologisch verändertem.

Teslascan® verkürzt die T1-Relaxationszeit des Zielgewebes und somit kommt es zu einem Anstieg der Signalintensität z.B. des Leberparenchyms in T1-gewichteten Aufnahmen. Die kontrastverstärkte Bildgebung setzt 15 bis 20 Minuten nach Infusionsbeginn ein und hält ungefähr vier Stunden an.

Pharmakokinetik

Das Mangan-(II)-Ion und der Ligand Fodipir haben unterschiedliche pharmakokinetische Eigenschaften und Metabolismen.

Die initiale Plasma-Halbwertszeit von Mangan beträgt ungefähr 20 Minuten mit einer deutlichen Aufnahme in Leber, Pankreas, Nieren und Milz.

Das Verteilungsvolumen für Mangan liegt zwischen 0,5 und 1,5 Liter/kg.

In vitro beträgt die Proteinbindung von Mangan im menschlichen Vollblut ungefähr 27%. Die initiale Plasma-Halbwertszeit von Fodipir liegt bei circa 50 Minuten, die Proteinbindung ist zu vernachlässigen.

Nach intravenöser Verabreichung wird Mangafodipir-Trinatrium dephosphoryliert, so dass Manganionen vor allem im Austausch mit Zinkionen des Plasmas freigesetzt werden. Daraus entstehen die zwei Hauptmetaboliten Mangandipyridoxylethylen-

diaminobiessigsäure (MnPLED) und Zinkpyridoxylethyldiaminobiessigsäure (ZnPLED). Der Ligand wird innerhalb eines Tages zu über 90% über den Urin ausgeschieden. Das Mangan (~20%) wird innerhalb der ersten 24 Stunden über den Urin elimiert, der Rest in den darauf folgenden Tagen mit dem Fäzes.

Bei den superparamagnetischen Eisenoxidpartikeln (SPIO und USPIO) handelt es sich um Partikel, welche von den Zellen des retikuloendothelialen Systems (RES) aufgenommen werden und zu einer Verkürzung der Relaxationszeit führen.

Die Arbeit dieser Kontrastmittel hängt also ganz offenbar von der Präsenz von RES-Zellen ab. Diese sind in pathologischen Geweben nicht vorhanden, somit werden z.B. Läsionen aus leberfremden Gewebe in ihrem Signal nicht oder nur kaum beeinflusst und dadurch vom gesunden Lebergewebe besser abgrenzbar.

1.4 Anwendungsgebiete der Magnetresonanztomographie

Die Magnetresonanztomographie stellt in der Radiologischen Diagnostik eines der zunehmend wichtigsten und vielseitigsten bildgebenden Verfahren dar.

Anfang der achtziger Jahre war die MRT der Diagnostik zerebraler Pathologien vorbehalten. Das Spektrum der möglichen Untersuchungen und Anwendungsgebiete erweiterte sich im Laufe der Zeit jedoch enorm. Dies liegt zum Einen an neuen Empfängerspulen, verbesserten Messequenzen, leistungsstärkeren Geräten mit höherer Feldstärke, zum Anderen an der Verwendung – teils gewebespezifischer – Kontrastmittel. Im Vergleich zu anderen bildgebenden Verfahren, wie zum Beispiel dem Röntgen oder der Computertomographie, ist bei der Magnetresonanztomographie vor allem die fehlende Strahlenbelastung hervorzuheben. Weitere Vorteile sind die hohe örtliche Auflösung in Kombination mit dem hervorragenden Gewebekontrast. Diese Vorteile und die Tatsache, dass die MRT die Möglichkeit der dynamischen Untersuchung bietet, machen deutlich, warum die MRT zunehmend sowohl bei gynäkologischen oder neonatalen Fragestellungen eingesetzt wird.

So beschrieb Tanaka 2001 den pränatalen Einsatz der MRT zur Beurteilung der Intaktheit und Beschaffenheit der Plazenta (42, 44, 59), denn Anomalien von Uterus und Plazenta sind mit der MRT zunehmend gut darzustellen und zu beurteilen.

Ebenfalls verwendet wird die MRT in der Schwangerschaft zur Abklärung von abdominellen und cerebralen Beschwerden (17, 19, 69). Zusätzlich dient die MRT der Beantwortung vieler weiterer Fragestellungen bei schwangeren Frauen; so findet sie zum Beispiel auch Anwendung bei der Abklärung und Kontrolle malignomsuspekter Befunde (17, 39, 49). Beispielsweise können infarzierte Myome oder Ovarialtumoren MR-tomographisch besser dargestellt werden als sonographisch.

Immer häufiger wird die MRT auch im Rahmen der Abklärung pränataler Pathologien verwendet. Vor allem dann, wenn ein vorausgegangener Ultraschall nicht genügend Klarheit über die Diagnose gibt und noch zusätzliche

Informationen, die der Ultraschall alleine nicht liefert, benötigt werden, um eine weitere Behandlung zu planen oder zu ermöglichen (4, 18, 28, 32, 33, 40, 64). Ein weiteres Anwendungsgebiet der MRT ist ihr Einsatz als molekulares Bildgebungsverfahren. Hierbei werden mit Eisenoxid markierte Zellen sichtbar gemacht und somit insbesondere Migrationseigenschaften verschiedener Zelllinien und Endorgankonzentrationen darstellbar (3, 14).

1.5 Problematik

Die nicht vorhandene Strahlenbelastung der MRT ist ein wesentlicher Vorteil dieses Verfahrens bei der Untersuchung schwangerer Frauen. Der Einsatz von Kontrastmitteln ist bei bestimmten Fragestellungen sehr vorteilhaft, um eindeutige Ergebnisse erzielen zu können. So ist die intravenöse Kontrastmittelapplikation z.B. bei Ovarialkarzinomen sehr hilfreich und auch unverzichtbar bei der Abklärung von suspekten Mamma-Befunden.

In den meisten Fällen werden gadoliniumhaltige Kontrastmittel wie zum Beispiel MultiHance[®], Omniscan[®] oder Magnevist[®] verwendet, aber auch der Einsatz manganhaltiger Kontrastmittel wie zum Beispiel Teslascan[®] scheint bei einigen Fragestellungen berechtigt.

Während man davon ausgehen kann, dass der Einsatz eines Kontrastmittels für die Schwangere keine zusätzlichen Risiken mit sich bringt, kann man bis heute eine mögliche Schädigung des Fetus durch das Kontrastmittel nicht sicher ausschließen.

Die MRT-Kontrastmittel können allesamt die Plazenta passieren und gelangen somit in den fetalen Kreislauf, werden von den Nieren des Fetus filtriert, ausgeschieden, dann oral wieder aufgenommen und reabsorbiert (51). Dies veranschaulicht, dass die Kontrastmittel auch im fetalen Kreislauf, in eventuell sogar höheren Konzentrationen als bei der Mutter, nachzuweisen sind.

Ob und inwiefern das fetale Wachstum durch diese Konzentration beeinträchtigt werden kann, wurde bisher vor allem aus ethischen Gründen in vivo nur in geringem Umfang und somit unzureichend untersucht. Eine routinemäßige

Kontrastmittelapplikation wird daher derzeit nicht empfohlen und sollte nur mit strenger Indikationsstellung erfolgen.

Eine Arbeit von Okuda (52) beschreibt zum Beispiel einen deutlichen schädigenden Einfluss auf Kaninchenembryonen bei einer täglichen Gadoliniumapplikation mit einer Dosis von 0,9 mmol/kg Körpergewicht. Unter anderem wird sogar ein frühes intrauterines Absterben des Embryos beobachtet.

Im Gegensatz dazu konnten bei einer Exposition mit Gadolinium im ersten Schwangerschaftstrimester von 26 Frauen keine fetalen Veränderungen festgestellt werden (15).

Insgesamt herrscht somit bei geringer und inhomogener Datenlage Unklarheit und Unsicherheit über eine mögliche Schädigung des Ungeborenen oder auch von Stammzellen bei der molekularen Bildgebung.

Diese Sorge und Unsicherheit auf Seiten der Untersucher und natürlich auch der betroffenen Patienten führt zu einer eher ablehnenden Haltung gegenüber einem letztlich viel versprechenden Bildgebungsverfahren.

1.6 Ziel der Arbeit

Mit zellbiologischen Untersuchungsverfahren sollen die biologischen Wirkungen verschiedener in der Radiologischen Diagnostik verwendeter MRT-Kontrastmittel

(Omniscan[®], MultiHance[®], Teslascan[®]) auf humane embryonale Lungenfibroblasten und humane Nabelschnurendothelzellen untersucht werden. Ziel ist es, den Einfluss dieser drei Kontrastmittel bezüglich der Proliferation und der Koloniebildungsfähigkeit fetaler Zellkulturen zu evaluieren.

Folgende Fragen sollen beantwortet werden:

- Führen die Kontrastmittel zu einer Veränderung des Wachstumsverhaltens der untersuchten Zelllinien?

- Gibt es unterschiedliche Effekte bezüglich Proliferation und Koloniebildung in Abhängigkeit von der eingesetzten Dosis eines Kontrastmittels?
- Gibt es Toxizitätsunterschiede im Vergleich der Kontrastmittel miteinander (bei gleicher Dosis)?
- Gibt es Unterschiede der Toxizität im Hinblick auf die untersuchten Zelllinien?

2. Material und Methoden

2.1 Materialien für die Zellkulturen

2.1.1 Zellen

Für die Laborversuche wurden humane embryonale Lungenfibroblasten (HEL) und humane Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) verwendet. Die humanen embryonalen Lungenfibroblasten wurden von der American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA) bezogen, expandiert und ein Stamm von kryokonservierten Aliquots angelegt. Die humanen Nabelschnurendothelzellen wurden von der Firma PromoCell in Heidelberg bezogen.

2.1.2 Kulturmedium

Das verwendete Kulturmedium hat die Aufgaben, den Zellen in vitro alle lebenswichtigen Stoffe zur Verfügung zu stellen. Weiterhin werden durch das Kulturmedium Abbauprodukte abgefangen und durch Puffersysteme neutralisiert.

Als Basismedium wird bei den Versuchsreihen mit den humanen embryonalen Lungenfibroblasten Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) von Gibco-BRL (Karlsruhe, Deutschland, Cat.-No.: 41965) verwendet. Unter sterilen Bedingungen wird diesem Basismedium fetales Kälberserum (FCS, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) und Antibiotika zugefügt.

Für die Versuchsreihen mit den humanen Nabelschnurendothelzellen dient eine Mischung aus Dulbecco's Mod Eagle Medium (DMEM) von Gibco-BRL (16%) und Nutrient Mixture F-12 (HAM) von Gibco (64%) (Karlsruhe, Deutschland) als Basismedium.

Unter sterilen Bedingungen wird diesem Gemisch fetales Kälberserum (FCS), ein Antibiotikum, ECGS-BD (endothelial cell growth supplement, 30µg/ml) (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) und eine Heparin-Stammlösung (50µg/ml) zugefügt.

2.1.3 Medienzusätze

Fetales Kälberserum (FCS)

Fetales Kälberserum enthält eine Vielzahl von Proteinen. Unter diesen Proteinen befinden sich auch Wachstumsfaktoren, die für das Kultivieren von Zellen in Zellkulturgefäßen notwendig sind. In den durchgeführten Versuchen wurden dem Grundmedium DMEM jeweils 10% FCS für die Proliferationskinetik und 20% für den Koloniebildungsassay hinzugefügt. Das verwendete FCS wurde in Aliquots bei -20°C eingefroren und für jeden neuen Medienansatz frisch aufgetaut.

Antibiotika

Um eine Kontamination des Kulturmediums mit Bakterien und somit ein verändertes Zellwachstum zu verhindern, wird dem Grundmedium eine bestimmte Antibiotikamenge hinzugefügt. Die Antibiotikallösung enthielt 100 µg/ml Streptomycin und 100 IE/ml Penicillin (Biochrom, Berlin, Deutschland). Die Lagerung des Antibiotikums erfolgte in Aliquots bei -20°C. Für jeden Medienansatz wurde die benötigte Menge aufgetaut..

2.1.4 Trypsin-Lösung

Adhärent wachsende Zelllinien wie die verwendeten humanen embryonalen Lungenfibroblasten müssen zunächst vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst werden, um sie subkultivieren zu können. Es wird hierfür das proteolytische Enzym Trypsin verwendet. Bei sachgerechter Anwendung werden die Zellen nicht geschädigt, sondern nur vereinzelt, indem die extrazellulären Proteine (Adhäsionsmoleküle) gespalten werden. Trypsin ist als Trypsin-EDTA-Lösung (PromoCell, Heidelberg, Deutschland) erhältlich und besteht aus 0,5 g/l (0,05%) Trypsin und 0,2 g/l (0,53mM) EDTA.

Diese Lösung wird bei 4°C gelagert und kurze Zeit vor Gebrauch auf 37°C im Wasserbad erwärmt.

2.1.5 Phosphatgepufferte Salzlösung (“Phosphate-Buffered-Saline“ PBS)

Vor dem Passagieren der Zellen mit der Trypsin/EDTA-Lösung werden die Zellen zweimal gründlich mit PBS gewaschen. Dadurch werden die Medienreste in der Kulturflasche, welche die enzymatische Wirkung des Trypsins erheblich beeinträchtigen können, entfernt.

Für die Versuche wurde das gebrauchsfertige Dulbecco's PBS w/o Ca²⁺+Mg²⁺ (Gibco, Karlsruhe, Deutschland) verwendet.

2.1.6 Sterilbank

Alle Versuche mit den Zellkulturen wurden unter einer Laminar-Flow-Sterilbank, welche ein keimfreies Arbeiten ermöglicht, durchgeführt.

Vor jedem Arbeitsbeginn wurde die Bank für 30 Minuten bei Umluft mit UV-C-Licht bestrahlt und danach mit 70%igem Alkohol gereinigt und desinfiziert.

Des Weiteren wurde die Sterilbank nach Arbeitsende ebenfalls mit 70%igem Alkohol desinfiziert. Zum Arbeiten wurden sterile Einmal-Pasteurpipetten und Plastikpipetten bis max. 50 ml verwendet.

2.1.7 Kontrastmittel

Folgende Kontrastmittel sollen hinsichtlich ihres möglichen toxischen Potentials auf die humanen embryonalen Lungenfibroblasten und die humanen Umbilikalvenen-Endothelzellen untersucht werden:

- MultiHance® (Altana Pharma, Konstanz)
- Teslascan® (Nycomed Amersham, München)
- Omniscan® (Nycomed Amersham, München)

Folgende Dosierungen wurden in vitro ausgetestet:

- Das Einfache der klinisch eingesetzten Dosis (1x)
- Das Fünffache der klinisch eingesetzten Dosis (5x)
- Das Zehnfache der klinisch eingesetzten Dosis (10x)
- Das Zwanzigfache der klinisch eingesetzten Dosis (20x)

Zur Dosisbestimmung orientiert man sich an einem 70 kg schweren Patienten mit 5 Liter Blut.

Tab. 1: eingesetzte Dosismengen der Kontrastmittel

		1x	5x	10x	20x
MultiHance®	0,5M → 0,1mM/kg	33,6 µl	168 µl	336 µl	672 µl
Teslascan®	0,01mM → 5µM/kg	84 µl	420 µl	840 µl	1680 µl
Omniscan®	0,5M → 0,1mM/kg	33,6 µl	168 µl	336 µl	672 µl

Die Humanen embryonalen Fibroblasten (Hel 299, CCL-137, ATCC, Rockville, MD, USA) wurden für 4 und für 24 Stunden mit den oben genannten Kontrastmitteln und –dosen inkubiert.

Die Humanen Nabelschnurendothelzellen (Huvec, CRL-1730, ATCC, Rockville, MD, USA) wurden für 24 Stunden mit den oben genannten Kontrastmitteln in zehnfach- und zwanzigfacher Dosis inkubiert.

MultiHance®

Wirkstoff: Gadobensäure als Dimegluminsalz.
Verschreibungspflichtig.

Zusammensetzung: 1 ml MultiHance® (0,5) enthält 334 mg (0,5M) Gadobensäure als Dimegluminsalz, Wasser für Injektionszwecke.

Anwendung: In der MRT-Diagnostik bei Patienten mit bekanntem oder Verdacht auf Leberkarzinom zur Erkennung von Läsionen und Metastasen und in der MRT-Diagnostik des Gehirns und des Rückenmarkes zur Erkennung von Läsionen. Weiterhin findet MultiHance® Anwendung in der MR-Angiographie.

Dosierung: ZNS und MRA
Für Erwachsene:
0,1 mmol/kg KG (0,2 ml/kg KG)

Leber:
Für Erwachsene:

0,05 mmol/kg KG (0,1 ml/kg KG)

Gegenanzeigen: Überempfindlichkeit gegenüber der Inhaltsstoffe oder anderen Gadolinumchelaten; eingeschränkte Nierenfunktion (Kreatinin-Clearance \leq 30 ml/min); Überempfindlichkeit gegenüber Benzylalkohol; Aufgrund fehlender Daten wird die Verwendung von MultiHance® bei Patienten unter 18 Jahren und bei Schwangeren nicht empfohlen. Bei Verabreichung von

MultiHance[®] sollte für 24 Stunden mit dem Stillen ausgesetzt werden.

Nebenwirkungen: häufig: Kopfschmerzen, Übelkeit, Reaktionen an der Injektionsstelle
gelegentlich: Parästhesien, Schwindel, AV-Block I°, Hypotonie, Diarrhoe, Erbrechen, Mundtrockenheit, Juckreiz, Fieber, Schüttelfrost, Schmerzen an der Injektionsstelle, verändertes EKG (verlängerte QT-Strecke),
selten: Tremor, Ohnmacht, Konjunktivitis, Rhinitis, Tachykardie, Vorhofflimmern, Arrhythmie, ventrikuläre Extrasystolen, Bradykardie, Dyspnoe, Laryngospasmus, Stauungslunge, Dyspepsie, Hypersalivation, Obstipation, Stuhlinkontinenz, Myalgie, verlängerte PR-Strecke im EKG, Herzstillstand, anaphylaktoide Reaktion

Teslascan®

Wirkstoff 0,01 mmol/l Lösung zur intravenösen Infusion enthält:
Arzneilich wirksamer Bestandteil: 1 ml enthält 7,57 mg Mangafodipir-Trinatrium wasserfrei (entspr. 0,01 mmol pro ml).

Zusammensetzung: Weitere Bestandteile sind geringe Mengen Ascorbinsäure, Natriumchlorid, Natriumhydroxid und/oder Salzsäure zur pH-Einstellung und außerdem Wasser für Injektionszwecke.

Anwendung: Teslascan® wird in der Magnetresonanztomographie der Leber bei Patienten mit Verdacht auf Lebermetastasen oder Leberzellkarzinom eingesetzt.

Dosierung: Die empfohlene Dosierung beträgt 0,5 ml/kg KG (5µmol/kg KG) für Erwachsene. Bei einem KG über 100 kg sind 50 ml ausreichend.

Gegenanzeigen: Teslascan® darf nicht verwendet werden während der Schwangerschaft, bei Überempfindlichkeit gegenüber dem Präparat oder seinen Bestandteilen, bei Phäochromozytom, bei schweren Nieren- und Lebererkrankungen (Child-Pugh C-Stadium). Teslascan® soll während der Stillzeit nicht angewendet werden. Kann auf Teslascan® nicht verzichtet werden, so ist das Stillen ab dem Zeitpunkt der Gabe des Kontrastmittels zu unterbrechen und die Muttermilch nach der Kontrastmittelgabe über die Dauer von 14 Tagen zu verwerfen.

Nebenwirkungen: häufig: Kopfschmerzen, Übelkeit, Wärmegefühl/Flush
gelegentlich: Überempfindlichkeitsreaktionen (Urticaria, Rhinitis, Pharyngitis), Schwindel, Dysgeusie, Parästhesien,

Palpitationen, Erbrechen, Abdominalschmerz, Diarrhoe, Schmerzen an der Injektionsstelle, Fieber

(sehr) selten: Hypertonie, Sehstörungen, Meteorismus

Weitere: Erhöhung der Transaminasen und der Bilirubinwerte, anaphylaktoide Reaktionen

Omniscan[®]

Wirkstoff: Gadodiamid (GdDTPA-BMA) 1 ml Injektionslösung enthält Gadodiamid 287 mg (entspr. 0,5 mmol Gadodiamid / ml bzw. 78,67 mg Gd / ml)

Hilfsstoffe: Weitere Bestandteile sind geringe Mengen Ascorbinsäure, Natriumchlorid, Natriumhydroxid und/oder Salzsäure zur pH-Einstellung (6,0-7,0), außerdem Wasser für Injektionszwecke.

Anwendung: Kraniale und spinale Magnetresonanztomographie (MRT) und allgemeine Magnetresonanztomographie des Körpers inklusive Ganzkörperangiographie. Omniscan[®] wird eingesetzt zur Kontrastverstärkung und damit zur Verbesserung der Darstellung von abnormen Strukturen oder Tumoren in den verschiedenen Körperregionen einschließlich ZNS.

Dosierung: kraniale und spinale MRT
für Erwachsene und Kinder ab 1 Jahr: 0,1 mmol/kg KG bis zu einem Körpergewicht von 100 kg (entspr. 0,2 ml/kg KG).

Nur für Erwachsene:

Wenn Hirnmetastasen vermutet werden, kann eine Dosis von 0,3 mmol/kg KG (entsprechend 0,6 ml/kg KG) bis zu einem Körpergewicht von 100 kg appliziert werden. Bei einem höheren Körpergewicht sind 60 ml in der Regel ausreichend.

Ganzkörper-MRT

Für Erwachsene:

0,1 mmol/kg KG bis zu einem Körpergewicht von 100 kg (darüber hinaus sind 20 ml gewöhnlich ausreichend)

Für Kinder ab 1 Jahr:

0,1 mmol/kg KG (0,2 ml/kg KG)

Ganzkörperangiographie

Für Erwachsene:

0,1 mmol/kg KG. Für die Diagnostik von abdominellen und iliakalen Stenosen ist eine Dosierung von 0,3 mmol/kg KG (0,6 ml/kg KG) von Vorteil.

Gegenanzeigen: Omniscan[®] darf bei Patienten mit bekannter Überempfindlichkeit gegen Gadodiamid oder die Hilfsstoffe nicht angewendet werden.

Omniscan[®] ist kontraindiziert bei Patienten mit schweren Nierenfunktionsstörungen (GFR < 30 ml/min/1,73 m²), ebenfalls bei Dialysepatienten. Eine Kontraindikation besteht ebenfalls bei Patienten mit transplantierte Leber oder bei Patienten, die sich einer Lebertransplantation unterziehen.

Über die Anwendung von Omniscan[®] bei Schwangeren liegen wenige Erfahrungen vor. Deshalb ist die

Verwendung des Präparates während der Schwangerschaft nicht zu empfehlen, es sei denn, eine kontrastverstärkte MRT-Untersuchung ist unbedingt notwendig. Omniscan® sollte während der Stillzeit nicht angewendet werden.

Nebenwirkungen: häufig: Kopfschmerz, Schwindel, Übelkeit, lokales Wärme-, Kälte-, oder Druckgefühl
gelegentlich: Schläfrigkeit, Geschmacks- oder Geruchssensationen, Schmerzen an der Injektionsstelle
Weitere NW: anaphylaktoide Reaktionen (bis zum Schock), Angstgefühl, Konvulsion, Parästhesien, Sehstörung, Tachykardie, Dyspnoe, Diarrhö, nephrogene systemische Fibrose, Arthralgie, Anstieg der Transaminasen

2.2 Methoden

2.2.1 Auftauen

Für jede Versuchsreihe wird ein Aliquot der kryokonservierten Zellen in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut.

Für die weiteren Vorgänge wird als Vorlage eine Kulturflasche (25 cm² Becon Dickinson, New Jersey, USA) mit 5 ml warmen Kulturmedium befüllt.

Die Zellen werden sofort nach dem Auftauen in die Kulturflasche überführt. Die Zellen und ihre Anwuchsrate werden nach ungefähr 4-6 h mikroskopisch beurteilt. Sind die Zellen vital und beträgt ihre Anwuchsrate wenigstens 70%, so können sie weiter verwendet werden.

Ist dies nicht der Fall, werden sie verworfen.

Anschließend wird das alte durch frisches Kulturmedium ersetzt. Dadurch entfernt man das zytotoxische DMSO. DMSO wird dem Kryomedium hinzugegeben, um einer Kristallbildung bzw. Bersten der Zellen vorzubeugen.

2.2.2 Passagieren

Zum Passagieren wird Folgendes benötigt und sollte vor Beginn jeder Passage bereitstehen:

Sterile Pasteurpipetten, sterile Pipetten, Trypsin steril, Medium steril, PBS steril, neue Kulturgefäße und das Cell Analyser System (CASY TT, Roche Diagnostics, Mannheim). Die Passagen dienen dazu, die bei längerer Zellkonfluenz einsetzende Kontaktinhibition zu vermeiden und somit ein gleichmäßiges Wachstumsverhalten zu garantieren.

Zu Beginn der Passage wird das Kulturmedium abgesaugt, die Zellkulturflasche mit 5ml PBS gespült und erneut abgesaugt. Danach wird der Zellrasen mit 1 ml der Trypsin/EDTA-Lösung benetzt.

Um eine optimale Wirkung des Trypsins zu erlangen, werden die Kulturflaschen mit dem vorgewärmten Trypsin für ungefähr 5 Minuten im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Je dichter der Zellmonolayer und je älter die Zellen sind, desto länger muss das Trypsin einwirken.

Nach der Inkubation sind die Zellen in der Regel vom Boden der Kulturflasche gelöst, was immer mikroskopisch überprüft wird.

Trypsin wird inaktiviert, indem man in die Flaschen je 5 ml Medium hinzu gibt. Durch kräftiges Resuspendieren werden die Zellen vereinzelt und man erhält eine möglichst gleichmäßige Einzelzellsuspension. Der Flasche wird ein bestimmtes Volumen (100µl) entnommen, um die Zellzahl zu bestimmen. Die Zellzahlbestimmung wird mittels einer Zellzähl- und Analysegerätes (CASY TT, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) durchgeführt.

Anschließend werden dann je 200.000 Zellen auf die vorbereiteten Kulturflaschen verteilt.

2.2.3 Proliferationskinetik (PK)

Die Proliferationskinetik wird durchgeführt, um die Vermehrungsgeschwindigkeit und die maximal erreichbare Zelldichte der Zellen unter Einwirkung von verschiedenen Kontrastmitteln in verschiedener Konzentration und Inkubationszeiten zu untersuchen.

Proliferationskinetik mit den humanen embryonalen Lungenfibroblasten (HEL)

Über einen Zeitraum von insgesamt 21 Tagen wurde die Proliferationskinetik der Zellen erfasst. Dabei wurde das Wachstumsverhalten der mit Kontrastmittel inkubierten Zellen mit einer Kontrollgruppe verglichen.

Die Inkubation der Zellen mit dem Basismedium und den Kontrastmitteln MultiHance[®], Teslascan[®] und Omniscan[®] erfolgt für jeweils vier und 24 Stunden. Die Kontrastmittel werden jeweils in einfacher, fünffacher, zehnfacher und zwanzigfacher Dosis der empfohlenen Dosis dem Basismedium zugefügt. Zur Untersuchung der Auswirkungen der verschiedenen Kontrastmitteln in verschiedenen Konzentrationen auf das Wachstumsverhalten auf humane embryonale Lungenfibroblasten werden nach der Inkubation zu Beginn der Proliferationskinetik jeweils 30.000 Zellen pro Kulturgefäß (25cm²) ausgesät und je 5 ml Basismedium zugefügt.

Im Brutschrank werden die Zellen inkubiert und erhalten bei 37°C optimale Wachstumsbedingungen.

An den Stopptagen (Tag 4, Tag 7, Tag 11, Tag 14, Tag 18 und Tag 21) wird pro Bedingung die Zellzahl aus einem Kulturgefäß bestimmt. Die Versuchsreihe wird insgesamt dreimal wiederholt.

Parallel bestimmt man die Zellzahl einer Kontrolle ohne Zugabe von Kontrastmittel.

Proliferationskinetik humane Nabelschnurendothelzellen (HUVEC)

Die Inkubation erfolgt für 24 Stunden mit der zehnfachen und zwanzigfachen Dosis der klinisch angewandten Dosis. Nach der Inkubation werden jeweils 30.000 Zellen in die Kulturflaschen ausgesät und 5 ml Basismedium zugefügt.

Die Zellzählung erfolgt bei den humanen Nabelschnurendothelzellen an Tag 3, Tag 7, Tag 10, Tag 14 und Tag 17.

An jedem Stopptag erfolgt bei den jeweils verbleibenden Kulturgefäßen ein Medienwechsel.

2.2.4 Koloniebildungsassay (KoBI)

Mithilfe des Koloniebildungsassays kann die Klonierungseffizienz der Zellen nach unterschiedlichen Behandlungsarten bestimmt werden (unterschiedliche Kontrastmittel, unterschiedliche Konzentrationen der Kontrastmittel, unterschiedliche Einwirkzeit der Kontrastmittel).

Für den Assay werden den Medien ebenfalls die Kontrastmittel MultiHance[®], Teslascan[®] und Omniscan[®] in jeweils einfacher, fünffacher, zehnfacher und zwanzigfacher Konzentration zugefügt. Die Einwirkzeit der kontrastmittelhaltigen Medien auf die Zellen beträgt hier ebenfalls vier bzw. 24 Stunden. Danach werden die Zellen mittels Trypsin abgelöst, die Zellzahl bestimmt und für den Versuch eingestellt. Die Aussaat für den Koloniebildungsassay erfolgt nach Beendigung der jeweiligen Inkubationsbedingung in zwei 6-Well-Platten (Multiwell 6 Well, Becton Dickinson, New Jersey, USA).

Es werden für jede Bedingung pro Stichprobe zwölf „wells“ mit jeweils 500 behandelten Zellen in 2ml Medium mit 20% FCS bestückt.

Die Platten werden anschließend 10 Tage im Brutkasten inkubiert. Danach wird der Versuch gestoppt.

Darauf folgt die Fixierung der Kolonien in den Platten, wofür der Medienüberstand verworfen und die Zellen mit PBS gewaschen werden.

Die folgende Fixierung der Kolonien erfolgt mit 3,5%igem Formaldehyd und 70% Alkohol für jeweils 10 Minuten. Bevor die Platten gefärbt werden, müssen

sie an der Luft trocknen. Die Färbung erfolgt mit Coomassie (Serva R Tablette). Die Tablette wird vor Verwendung in Methanol, 7,5% Eisessig und Aqua dest. aufgelöst. Die Fixierung dauert etwa zehn Minuten. Danach erscheinen die Zellen blau und somit wird eine mikroskopische Auswertung möglich. Es werden alle Klone gezählt, die aus mehr als 50 Zellen bestehen. Alle Konglomerate, die aus weniger als 50 Zellen bestehen, gelten als beschädigt und werden nicht berücksichtigt.

3. Ergebnisse

3.1 Proliferationskinetik, humane embryonale Lungenfibroblasten (Hel)

Mithilfe der Proliferationskinetik kann überprüft werden, ob es durch die verwendeten Kontrastmittel MultiHance[®], Teslascan[®] und Omniscan[®] zu einer Proliferationshemmung in den untersuchten Zelllinien (Hel, HUVEC) kommt.

Interessant wäre zu beobachten, ob ein Kontrastmittel einen wesentlich größeren Einfluss auf die Proliferationskinetik der Zellen hat als ein anderes Kontrastmittel. Weiterhin wird der Effekt der Dosisabhängigkeit der Kontrastmittel auf das Zellwachstum fokussiert und darauf, ob einer der beiden Zelllinien empfindlicher reagiert.

Die folgenden Grafiken geben einen Überblick über die Proliferationskinetiken nach Inkubation mit den Kontrastmitteln im Vergleich zu der jeweiligen Kontrollgruppe.

3.1.1 MultiHance[®], Inkubation 4 h, humane embryonale Lungenfibroblasten

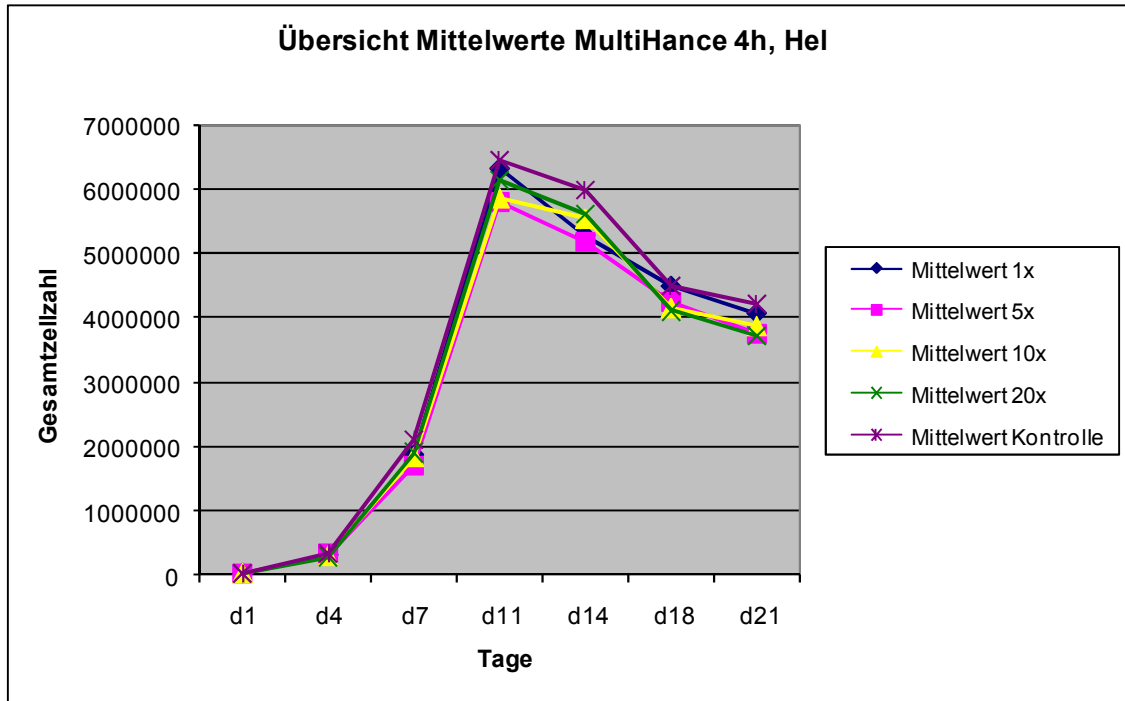


Abb 3.1: Verlauf der Proliferationskinetik der humanen embryonalen Lungenfibroblasten nach vier Stunden Inkubation mit MultiHance[®] in ein-, fünf-, zehn- und zwanzigfacher Dosis.

Die Grafik zeigt einen vergleichbaren Verlauf der Kurven bei allen eingesetzten Dosierungen des Kontrastmittels.

Die Zellen vermehren sich nach Inkubation mit MultiHance[®] bis zum Tag 11, an dem die Zellen ihre maximale Gesamtzellzahl erreichen.

Diese unterscheidet sich bei den verschiedenen eingesetzten Dosen nur geringfügig. Die höchste Gesamtzellzahl an Tag 11 liegt bei der Kontrollgruppe mit 6.469.333 Zellen vor, die niedrigste bei der fünffachen Konzentration mit einer Gesamtzellzahl von 5.808.333. Dieser Unterschied ist statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$).

Am letzten Stopptag (Tag 21) erreichen die Gesamtzellzahlen ein Minimum und liegen ebenfalls wieder dicht beieinander. Die Kontrollgruppe erreicht ebenfalls wieder die höchste Zellzahl mit 4.228.333 Zellen. Die geringste Zellzahl ergibt

sich nach Inkubation mit MultiHance® in zwanzigfacher Dosis mit 3.724.667 Zellen ($p > 0,05$).

Tab. 3.1: Mittelwerte und Standardabweichung der Gesamtzellzahlen der humanen embryonalen Lungenfibroblasten nach Inkubation mit MultiHance® für vier Stunden. MW= Mittelwert, Stabw.= Standardabweichung

	1.Tag	4.Tag	7.Tag	11.Tag	14.Tag	18.Tag	21.Tag
MW1x	30.000	315.333	1.875.000	6.332.667	5.291.667	4.501.667	4.079.000
Stabw.	0	49.541	438.432	593.553	751.995	474.218	369.089
MW 5x	30.000	319.000	1.701.000	5.808.333	5.186.000	4.250.667	3.749.667
Stabw.	0	35.553	201.129	396.601	786.592	549.419	456.892
MW 10x	30.000	300.000	1.839.000	5.867.000	5.548.000	4.157.333	3.877.667
Stabw.	0	80.430	389.247	442.614	816.199	340.196	398.117
MW 20x	30.000	293.667	1.908.667	6.151.333	5.632.333	4.122.000	3.724.667
Stabw.	0	21.455	502.384	427.674	413.316	548.650	275.335

3.1.2 MultiHance[®], Inkubation 24 h, humane embryonale Lungenfibroblasten

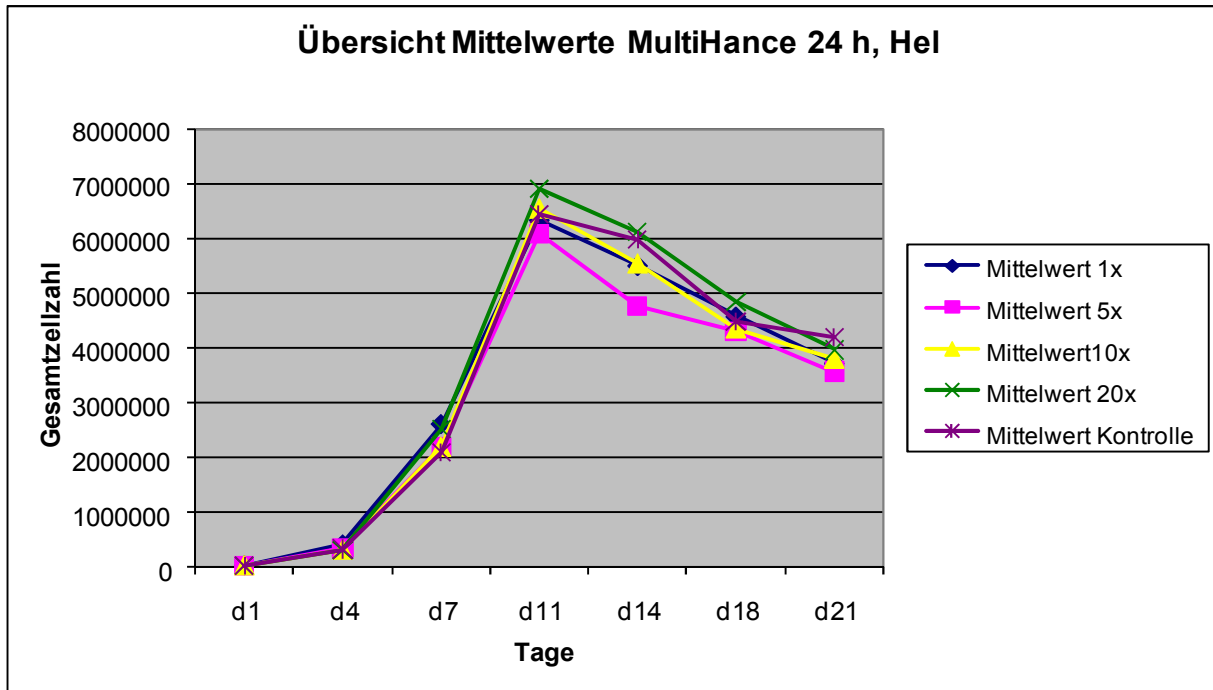


Abb. 3.2: Verlauf der Proliferationskinetik der humanen embryonalen Lungenfibroblasten nach 24 Stunden Inkubation mit MultiHance[®] in ein-, fünf-, zehn- und zwanzigfacher Dosis.

Erneut werden die maximalen Gesamtzellzahlen bei den vier eingesetzten Dosierungen und auch bei der Kontrollgruppe an Tag 11 erreicht. Die Zahlen liegen wie auch bei der vierstündigen Inkubationszeit dicht beieinander. Die höchste Gesamtzellzahl wird bei Inkubation mit der zwanzigfachen Dosis erreicht (6.914.000 Zellen), die niedrigste bei Inkubation mit der fünffachen Dosis (6.087.667 Zellen). Es liegt kein statistisch signifikanter Unterschied vor ($p > 0,05$). Die Zellzahl der Kontrollgruppe beträgt am elften Tag 6.469.333. Am letzten Stopptag weist die Kontrollgruppe jedoch mit 4.228.333 Zellen die höchste Zellzahl auf, die niedrigste findet sich nach Inkubation mit der fünffachen Dosis mit 3.574.750 Zellen ($p > 0,05$).

Die Wachstumskurve der Zellen, welche mit der fünffachen Dosis inkubiert wurden, zeigt an Tag 14 eine Abweichung von den übrigen Kurven. Die Gesamtzellzahl an diesem Tag (4.767.000 Zellen) liegt 21% ($p > 0,05$) unter der der Kontrollgruppe (6.010.667), nähert sich dieser jedoch bis Tag 21 wieder an.

Tab. 3.2: Mittelwerte und Standardabweichung der Gesamtzellzahlen der humanen embryonalen Lungenfibroblasten nach Inkubation mit MultiHance® für 24 Stunden, MW = Mittelwert, Stabw. = Standardabweichung

	1.Tag	4.Tag	7.Tag	11.Tag	14.Tag	18.Tag	21.Tag
MW 1x	30.000	413.000	2.618.000	6.350.333	5.516.000	4.583.333	3.727.750
Stabw.	0	33.287	338.004	548.199	679.424	398.339	1.041.364
MW 5x	30.000	335.000	2.202.333	6.087.667	4.767.000	4.318.000	3.574.750
Stabw.	0	95.504	686.088	873.203	566.506	789.098	980.318
MW 10x	30.000	315.667	2.196.667	6.560.667	5.554.000	4.365.333	3.810.500
Stabw.	0	25.423	827.416	142.567	370.490	520.859	1.045.920
MW 20x	30.000	318.333	2.527.333	6.914.000	6.140.750	4.846.667	3.978.000
Stabw.	0	69.241	440.573	197.575	744.156	486.318	1.039.309

3.1.3 Teslascan®, Inkubation 4 h, humane embryonale Lungenfibroblasten

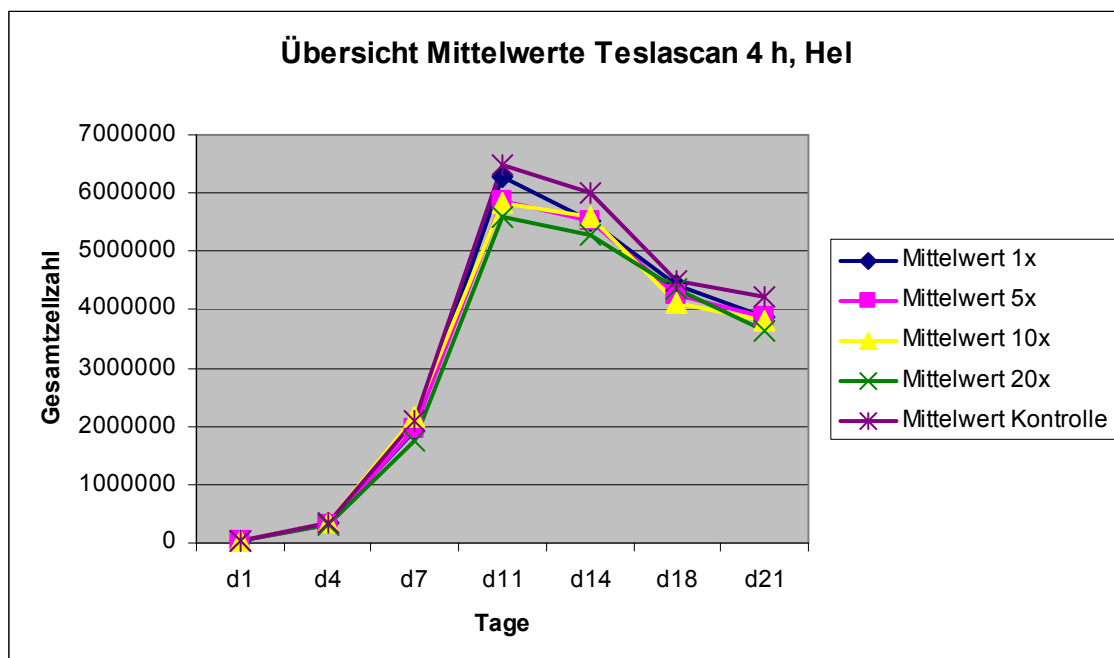


Abb. 3.3: Verlauf der Proliferationskinetik der humanen embryonalen Lungenfibroblasten, nachdem sie vier Stunden mit Teslascan® in ein-, fünf-, zeh- und zwanzigfacher Dosis inkubiert wurden.

Auch nach vierstündiger Inkubation mit Teslascan® zeigt die Wachstumskurve einen recht einheitlichen Verlauf. Die höchsten Gesamtzellzahlen werden wieder an Tag 11 erreicht.

Den bis dahin größten Zuwachs sieht man mit 6.469.333 Zellen bei der Kontrollgruppe, den geringsten mit 5.289.000 Zellen bei Inkubation mit Teslascan® in zwanzigfacher Dosis.

An Stopptag 21 findet man bei der Kontrollgruppe wieder die höchste Zellzahl (4.228.333 Zellen) und bei der zwanzigfachen Dosis die geringste (3.626.667).

An allen Stopptagen besteht zwischen den gemessenen Gesamtzellzahlen kein statistisch signifikanter Unterschied ($p > 0,05$).

Tab. 3.3: Mittelwerte und Standardabweichung der Gesamtzellzahlen der humanen embryonalen Lungenfibroblasten nach Inkubation mit Teslascan® für vier Stunden, MW = Mittelwert, Stabw. = Standardabweichung

	1.Tag	4.Tag	7.Tag	11.Tag	14.Tag	18.Tag	21.Tag
MW 1x	30.000	339.500	1.906.667	6.290.333	5.516.667	4.414.000	3.883.333
Stabw.	0	44.643	326.345	196.291	220.926	175.348	413.384
MW 5x	30.000	308.250	1.968.250	5.876.000	5.526.333	4.270.333	3.871.750
Stabw.	0	50.704	440.253	491.027	418.237	324.676	441.304
MW 10x	30.000	356.250	2.148.333	5.834.667	5.597.333	4.109.000	3.819.333
Stabw.	0	61.646	331.582	336.352	211.245	422.167	197.145
MW 20x	30.000	320.000	1.765.000	5.581.000	5.289.000	4.350.667	3.626.667
Stabw.	0	83.606	287.522	467.013	347.538	353.851	486.732

3.1.4 Teslascan[®], Inkubation 24 h, humane embryonale Lungenfibroblasten

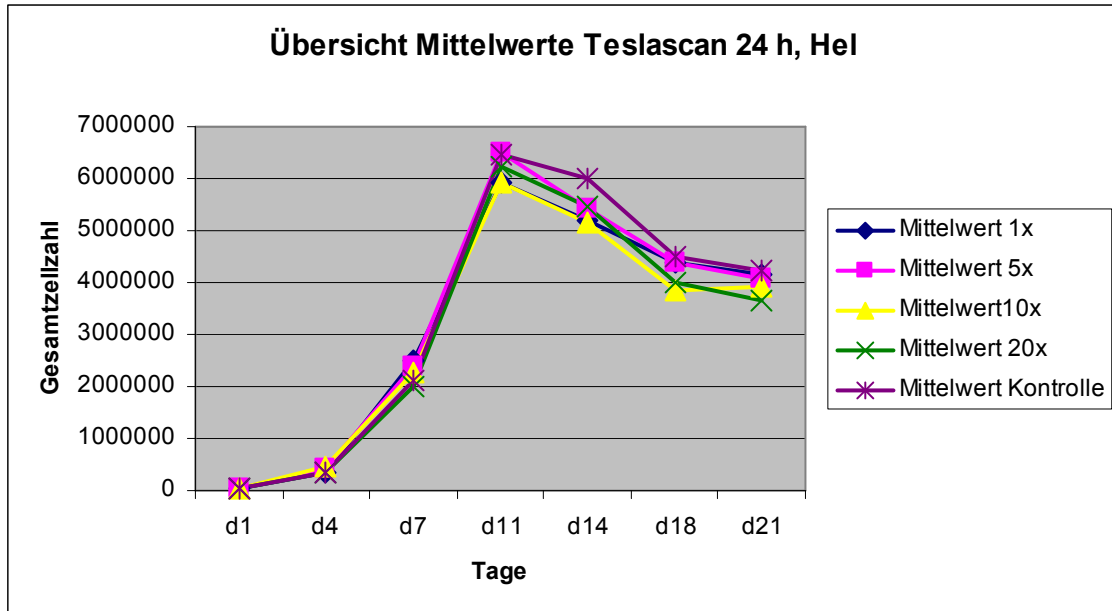


Abb. 3.4: Verlauf der Proliferationskinetik der humanen embryonalen Lungenfibroblasten, nachdem sie 24 Stunden mit Teslascan[®] in ein-, fünf-, zehn- und zwanzigfacher Dosis inkubiert wurden.

Auch nach 24-stündiger Inkubation mit Teslascan[®] zeigen die Wachstumskurven der humanen embryonalen Lungenfibroblasten einen recht ähnlichen Verlauf mit einer maximalen Gesamtzellzahl aller Kurven am 11. Tag. Die höchste Zellzahl an Stopptag 11 wird bei den Zellen nach Inkubation mit der fünffachen Dosis erreicht (6.512.000 Zellen), die niedrigste nach Inkubation mit der einfachen Dosis (5.915.333 Zellen). Es liegt hierbei kein statistisch signifikanter Unterschied vor ($p > 0,05$). Die Gesamtzellzahl der Kontrollgruppe an Tag 11 beträgt 6.469.333.

Am letzten Stopptag weist die Kontrollgruppe die höchste Zellzahl mit 4.228.333 Zellen auf, die niedrigste findet sich nach Inkubation mit der zwanzigfachen Dosis mit 3.636.333 Zellen ($p > 0,05$).

Tab. 3.4: Mittelwerte und Standardabweichung der Gesamtzellzahlen der humanen embryonalen Lungenfibroblasten nach Inkubation mit Teslascan® für 24 Stunden. MW = Mittelwert, Stabw. = Standardabweichung

	1.Tag	4.Tag	7.Tag	11.Tag	14.Tag	18.Tag	21.Tag
MW 1x	30.000	365.333	2.483.250	5.915.333	5.206.667	4.390.000	4.145.400
Stabw.	0	106.791	868.377	131.341	302.252	321.441	276.606
MW 5x	30.000	416.333	2.397.667	6.512.000	5.430.667	4.391.333	4.074.000
Stabw.	0	32.192	169.459	387.190	507.075	437.893	253.679
MW 10x	30.000	445.333	2.277.333	5.917.333	5.153.667	3.834.667	3.921.000
Stabw,	0	25.813	312.714	626.882	361.243	467.021	462.040
MW 20x	30.000	339.667	2.005.667	6.248.500	5.456.500	3.997.667	3.636.333
Stabw.	0	56659,8035	343564,162	496.649	433.615	496034,609	506504,031

3.1.5 Omniscan®, Inkubation 4 h, humane embryonale Lungenfibroblasten

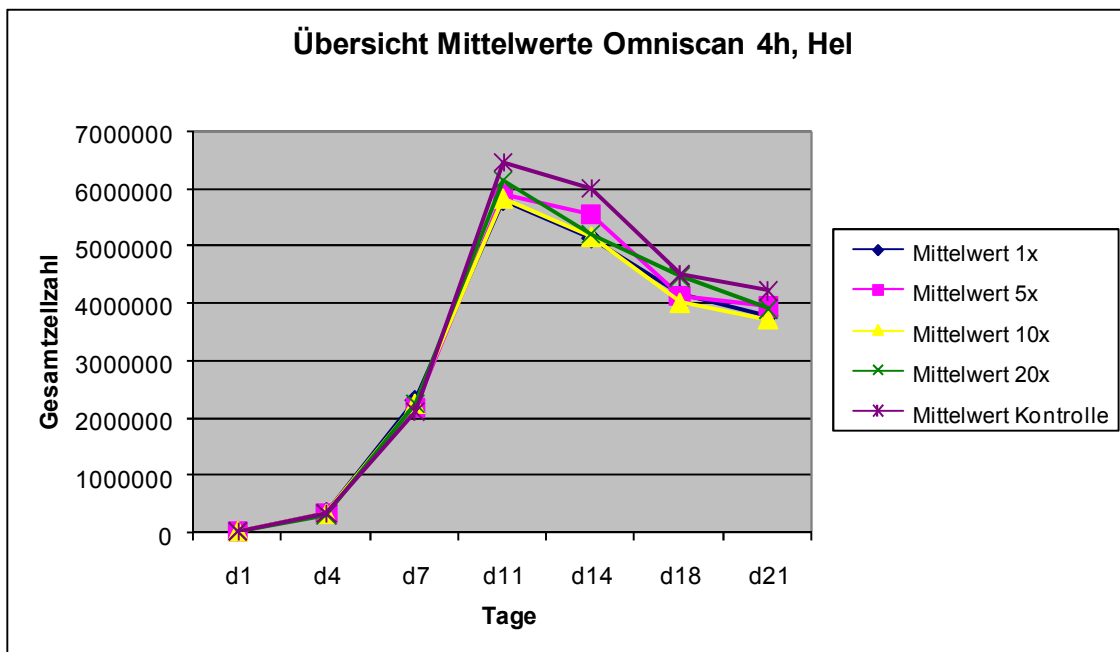


Abb. 3.5: Verlauf der Proliferationskinetik der humanen embryonalen Lungenfibroblasten nach vier Stunden Inkubation mit Omniscan® in ein-, fünf-, zehn- und zwanzigfacher Dosis.

Am elften sowie am 21. Tag erreicht die Wachstumskurve der Kontrollgruppe die höchsten Gesamtzellzahlen mit 6.469.333 bzw. 4.228.333 Zellen.

Demgegenüber steht eine Zellzahl von 5.807.333 nach Inkubation mit der einfachen Dosis Omniscan[®] bzw. eine Zellzahl von 3.730.333 nach Inkubation mit der zehnfachen Dosis Omniscan[®] ($p>0,05$).

Tab. 3.5: Mittelwerte und Standardabweichung der Gesamtzellzahlen der humanen embryonalen Lungenfibroblasten nach Inkubation mit Omniscan[®] für 4 Stunden. MW = Mittelwert, Stabw. = Standardabweichung

	1.Tag	4.Tag	7.Tag	11.Tag	14.Tag	18.Tag	21.Tag
MW 1x	30.000	354.667	2.317.333	5.807.333	5.149.250	4.156.000	3.798.667
Stabw.	0	91.194	490.516	192.786	659.598	399.291	189.273
MW 5x	30.000	344.667	2.182.667	5.899.333	5.562.750	4.122.000	3.942.333
Stabw.	0	77.694	352.757	352.554	603.660	222.108	275.780
MW 10x	30.000	331.000	2.253.000	5.838.333	5.171.333	4.016.667	3.730.333
Stabw,	0	95.598	394.714	432.334	324.679	95.291	226.990
MW 20x	30.000	324.667	2.263.333	6.152.000	5.212.333	4.471.000	3.914.000
Stabw.	0	56.536	169.356	370.065	558.726	207.422	345.547

3.1.6 Omniscan[®], Inkubation 24 h, humane embryonale Lungenfibroblasten

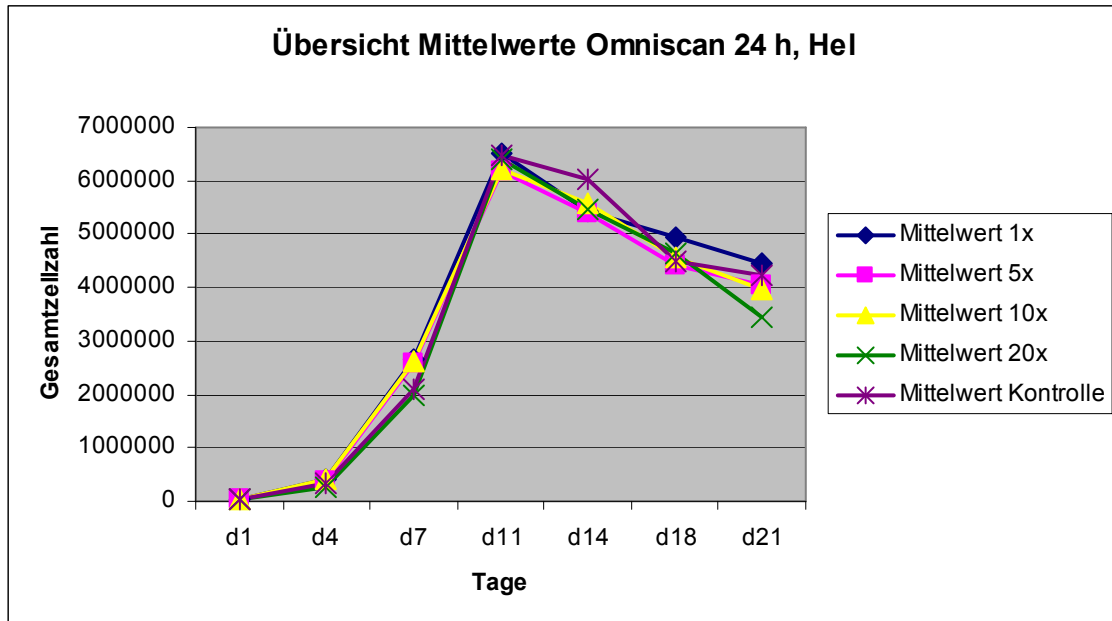


Abb. 3.6. Verlauf der Proliferationskinetik der humanen embryonalen Lungenfibroblasten, nach 24stündiger Inkubation mit Omniscan[®] in ein-, fünf-, zehnfach-, zwanzigfachen Dosis.

Die maximalen Gesamtzellzahlen werden wieder an Tag 11 erreicht.

Die Zellen, welche mit der einfachen Dosis Omniscan[®] inkubiert wurden, zeigten bis zu diesem Tag die stärkste Wachstumstendenz und erreichen eine Gesamtzellzahl von 6.517.667, demgegenüber stehen die Zellen nach Inkubation mit der fünffachen Dosis mit einer Zellzahl von 6.168.500 Zellen. Die Kontrollgruppe weist an diesem Tag 6.469.333 Zellen auf ($p > 0,05$).

Am letzten Stopptag erreichen die Zellen, die mit der zwanzigfachen Dosis inkubiert wurden, eine Zellzahl von 3.433.000. Die Zellen, welche mit der einfachen Dosis inkubiert wurden, erreichen eine Zellzahl von 4.464.333. Somit besteht eine Differenz von ungefähr 23% ($p > 0,05$).

Die Differenz zur Kontrollgruppe (4.228.333 Zellen) beträgt an Tag 21 ungefähr 19%

($p > 0,05$).

Tab. 3.6: Mittelwerte und Standardabweichung der Gesamtzellzahlen der humanen embryonalen Lungenfibroblasten nach Inkubation mit Omniscan® für 24 Stunden. MW = Mittelwert, Stabw. = Standardabweichung

	1.Tag	4.Tag	7.Tag	11.Tag	14.Tag	18.Tag	21.Tag
MW 1x	30.000	398.333	2.653.667	6.517.667	5.416.667	4.929.000	4.464.333
Stabw.	0	33.020	494.108	492.002	312.033	563.024	581.751
MW 5x	30.000	377.667	2.589.000	6.168.500	5.380.333	4.428.000	4.044.000
Stabw.	0	126.065	831.076	541.820	573.502	229.367	181.849
MW 10x	30.000	402.333	2.610.750	6.205.750	5.585.000	4.553.000	3.964.667
Stabw.	0	94.113	646.408	752.766	672.062	469.646	339.833
MW 20x	30.000	277.667	1.976.000	6.416.333	5.453.333	4.630.333	3.433.000
Stabw.	0	129881,998	563.718	461497,923	371962,812	243771,067	992234,347

3.1.7 Vergleich der Kontrastmittel

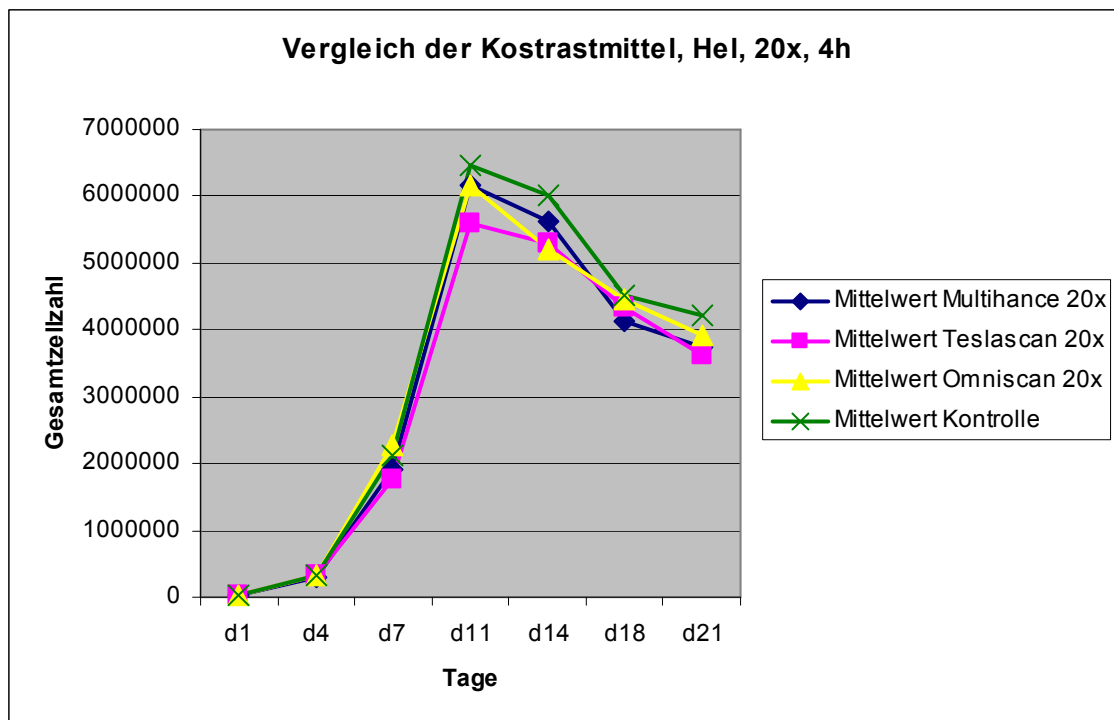


Abb. 3.7: Proliferationskinetik der humanen embryonalen Lungenfibroblasten, nachdem sie vier Stunden entweder mit MultiHance[®], Teslascan[®] oder Omniscan[®] in zwanzigfacher Dosis inkubiert wurden.

Die Kontrollgruppe erreicht sowohl an Tag 11 als auch an Tag 21 die höchste Zellzahl (6.469.333 bzw. 4.228.333 Zellen). Die niedrigsten Zellzahlen findet man jeweils nach Inkubation mit Teslascan[®] (zwanzigfache Dosis) mit 5.581.000 bzw. 3.626.667 Zellen.

Somit ergibt sich jeweils eine Differenz von ungefähr 14%. An allen Stopptagen ergeben sich zwischen den verschiedenen Kontrastmitteln keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$).

Es kommt bei allen Kontrastmitteln zu einem recht einheitlichen Zellwachstum bis zum 11. Tag. Danach folgt ein negatives Wachstum, es kommt also zum Absterben der Zellen durch Kontaktinhibition.

3.2 Proliferationskinetik humane Nabelschnurendothelzellen (HUVEC)

Die folgenden Grafiken geben einen Überblick über die Verläufe der Proliferationskinetiken der humanen Nabelschnurendothelzellen.

3.2.1 MultiHance[®], Inkubation 24 h, Nabelschnurendothelzellen

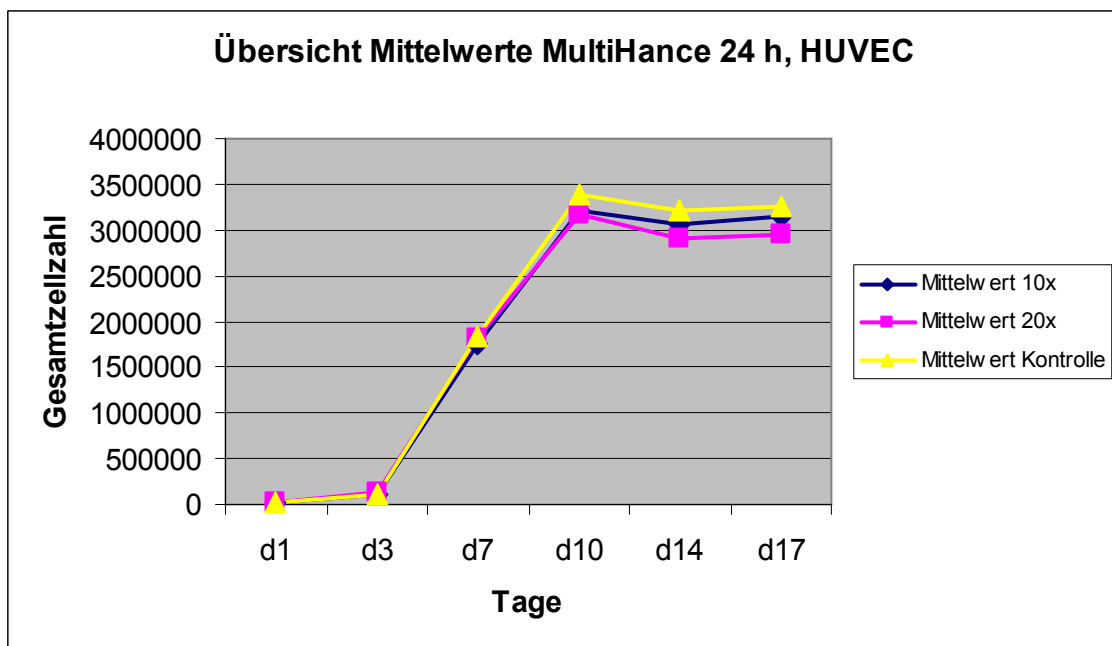


Abb. 3.9: grafische Übersicht der humanen Nabelschnurendothelzellen nach 24stündiger Inkubation mit MultiHance[®] in 10- bzw. 20facher Dosis.

Die Kurven zeigen insgesamt einen sehr einheitlichen Verlauf.

Am Stopptag 14 liegt die Gesamtzellzahl der Kontrollgruppe mit 3.207.067 Zellen über den Zellzahlen nach Inkubation mit MultiHance[®] in zehnfacher Dosis (3.049.200 Zellen) und auch über den Zellzahlen nach Inkubation mit MultiHance[®] in zwanzigfacher Dosis (2.903.000 Zellen). Statistisch liegen jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zellzahlen an Stopptag 14 vor ($p > 0,05$). Gleiches gilt für den Stopptag 17 (Kontrollgruppe: 3.255.600 Zellen, nach Inkubation mit der zehnfachen Dosis: 3.158.200 Zellen, nach Inkubation mit der zwanzigfachen Dosis: 2.954.000 Zellen).

Tab. 3.8: Mittelwerte und Standardabweichung der Gesamtzellzahlen der Nabelschnurendothelzellen nach Inkubation mit MultiHance® für 24 Stunden. MW = Mittelwert, Stabw. = Standardabweichung

	1.Tag	3.Tag	7.Tag	10.Tag	14.Tag	17.Tag
MW 10x	30.000	107.733	1.756.167	3.205.867	3.049.200	3.158.200
Stabw.	0	10.555	296.576	235.708	366.556	299.318
MW 20x	30.000	126.690	1.822.667	3.169.467	2.903.000	2.954.000
Stabw.	0	15.389	291.251	219.490	470.319	324.094

3.2.2 Teslascan®, Inkubation 24 h, Nabelschnurendothelzellen

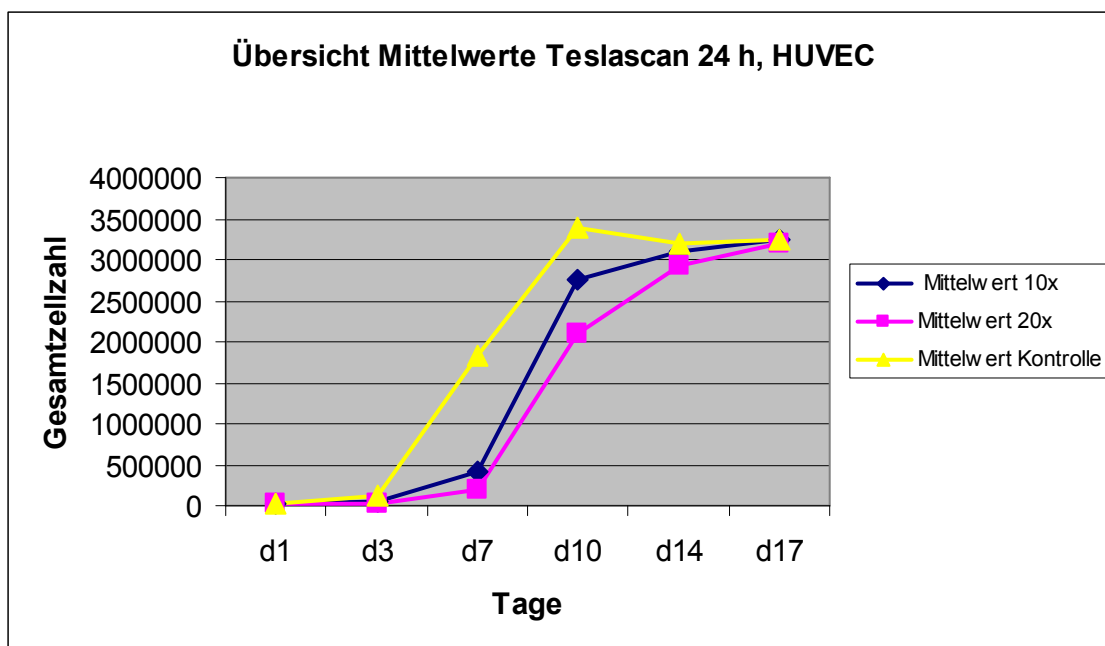


Abb. 3.10: Verlauf der Proliferationskinetik der humanen Nabelschnurendothelzellen, nachdem sie 24 Stunden mit Teslascan® in zehn- und zwanzigfacher Dosis inkubiert wurden.

Zu Beginn erkennt man, dass die Zellzahlen der Nabelschnurendothelzellen nach Inkubation mit Teslascan® deutlich unter der der Kontrollgruppe liegen. So beträgt die Zellzahl der Kontrollgruppe an Tag 7 1.830.833. Nach Inkubation mit der 20fachen Dosis des Kontrastmittels ergibt sich eine Zellzahl von 206.900

und ist somit um 89% geringer. Bei der zehnfachen Dosis ergibt sich an Tag 7 eine Zellzahl von 408.333, diese entspricht 22% der Kontrollgruppen-Zellzahl ($p < 0,05$). Nach Inkubation mit der zehnfachen Dosis zeigt sich auch ein statistisch signifikanter Unterschied der Zellzahlen im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p < 0,05$). Das heißt, dass nach Inkubation mit dieser Dosis im Verlauf signifikant niedrigere Zellzahlen erreicht werden.

Am letzten Stopptag lassen sich bei allen drei Zellgruppen sehr ähnliche Zellzahlen beobachten (MW Kontrolle: 2.506.200, MW 10x: 2.608.800, MW 20x: 2.581.800).

Somit scheinen sich die Zellen im Verlauf erholt zu haben.

Tab. 3.9: Mittelwerte und Standardabweichung der Gesamtzellzahlen der Nabelschnurendothelzellen nach Inkubation mit Teslascan® für 24 Stunden. MW = Mittelwert, Stabw. = Standardabweichung

	1.Tag	3.Tag	7.Tag	10.Tag	14.Tag	17.Tag
MW 10x	30.000	50.600	408.333	2.764.067	3.103.800	3.232.400
Stabw.	0	13.953	291.703	455.614	422.662	585.977
MW 20x	30.000	36.300	206.900	2.096.000	2.929.600	3.193.000
Stabw.	0	8.287	112.340	516.563	199.707	541.706

3.2.3 Omniscan[®], Inkubation 24 h, Nabelschnurendothelzellen

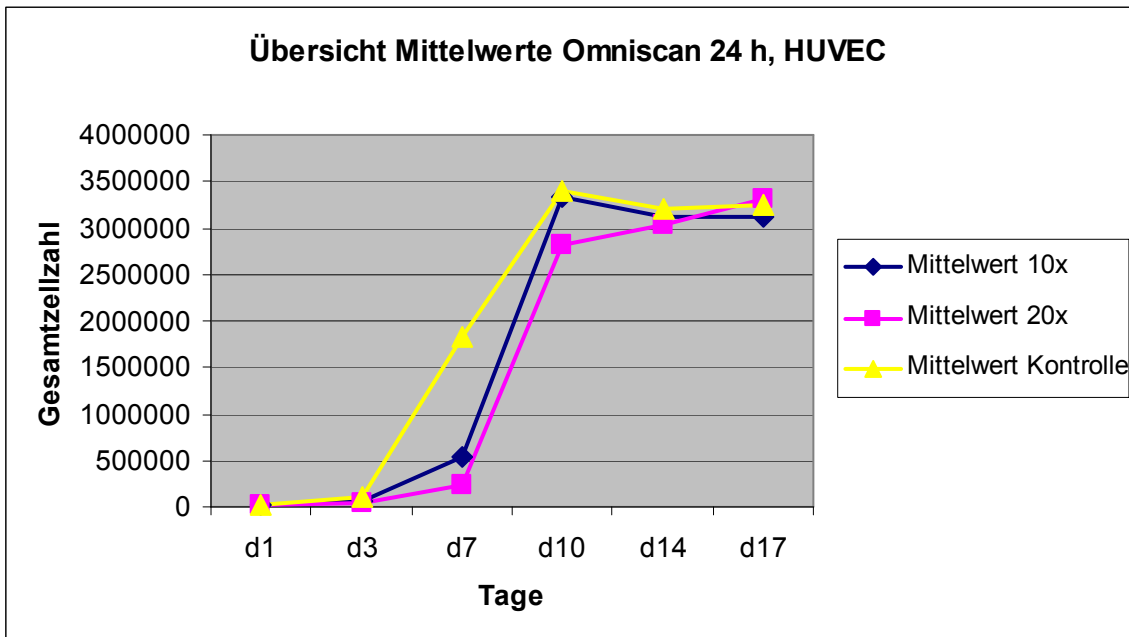


Abb. 3.9: Verlauf der Proliferationskinetik der humanen Nabelschnurendothelzellen, nachdem sie 24 Stunden mit Omniscan[®] in zehnfachen und zwanzigfachen Dosis inkubiert wurden.

Diese Grafik zeigt, dass die gemessenen Zellzahlen der mit dem Kontrastmittel inkubierten Zellen bis Tag 7 deutlich geringer sind als jene der Kontrollgruppe. Somit liegt die Zellzahl an Tag 7 der zehnfachen Dosis mit 542.500 Zellen 70% unter der Zellzahl der Kontrollgruppe (1.830.833 Zellen). Nach Inkubation mit der zwanzigfachen Dosis liegt sie mit 244.333 Zellen sogar 87% darunter ($p > 0,05$).

Im weiteren Verlauf erholen sich die Zellen scheinbar und die Kurven nähern sich bis zum Stopptag 17 an, so dass nur noch sehr geringe Unterschiede zu beobachten sind (MW Kontrolle: 2.506.200, MW 10x: 2.554.800, MW 20x: 2.743.800).

Über den zeitlichen Verlauf betrachtet liegen statistisch gesehen keine signifikanten Unterschiede zwischen der Zellzahlen der Kontrollgruppe jeweils im Vergleich zu den Zellzahlen nach Inkubation mit Omniscan[®] in zehnfachen bzw. zwanzigfachen Dosis ($p > 0,05$).

Tab. 3.10: Mittelwerte und Standardabweichung der Gesamtzellzahlen der Nabelschnurendothelzellen nach Inkubation mit Omniscan® für 24 Stunden. MW = Mittelwert, Stabw. = Standardabweichung

	1. Tag	3. Tag	7. Tag	10. Tag	14. Tag	17. Tag
MW 10x	30.000	70.850	542.500	3.324.067	3.112.600	3.107.600
Stabw.	0	28.266	258.880	269.016	376.844	488.035
MW 20x	30.000	35.740	244.333	2.827.400	3.028.800	3.311.200
Stabw.	0	15.013	152.585	667.807	346.995	492.766

3.2.4 Vergleich der Kontrastmittel, 20x, Nabelschnurendothelzellen

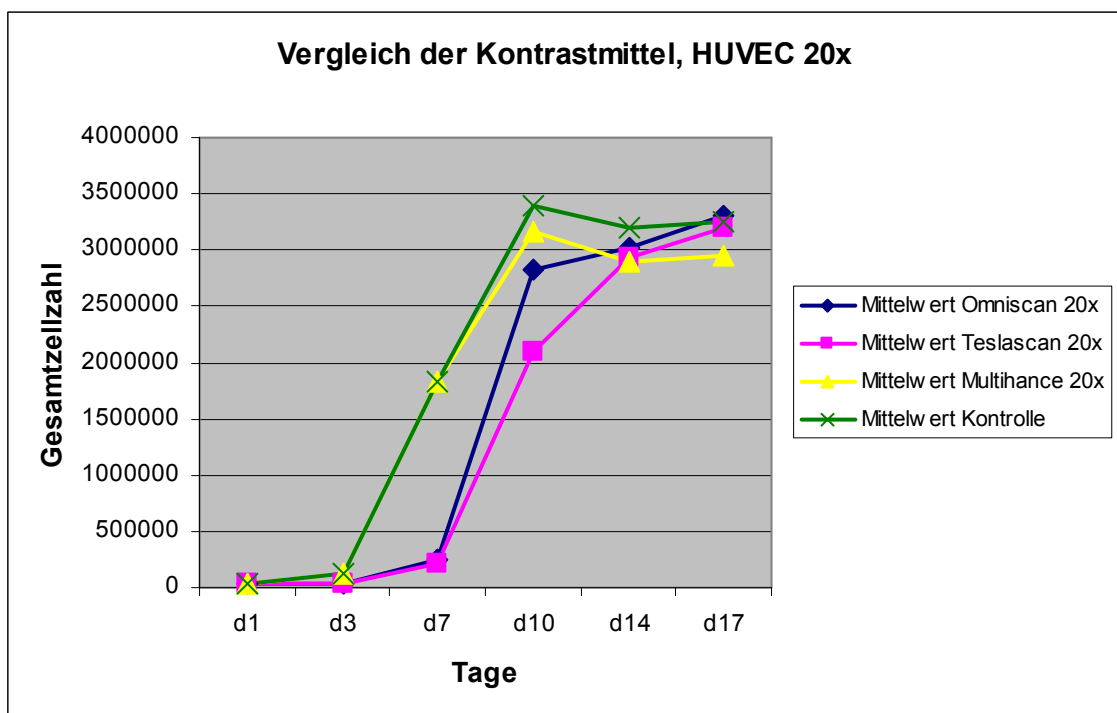


Abb. 3.10: Vergleich der Proliferationskinetik der humanen Nabelschnurendothelzellen, nachdem sie 24 Stunden entweder mit Omniscan®, Teslascan® oder MultiHance® in zwanzigfacher Dosis inkubiert wurden.

In den ersten Tagen lassen sich die höchsten Zellzahlen nach Inkubation mit MultiHance® messen. So liegt sie an Tag 7 bei 1.822.667 Zellen, während sich nach Inkubation mit Omniscan® und Teslascan® bei 244.333 bzw. 206.900

Zellen liegen und somit deutlich geringer sind. In den nächsten Tagen gleichen sich die Kurven jedoch an und an Tag 17 lassen sich nur noch geringe Abweichungen der Zellzahlen beobachten.

3.3 Koloniebildungsassay humane embryonale Lungenfibroblasten

Mit Hilfe der Koloniebildungsassays wird die klonogene Aktivität der Zellen erfasst, nachdem sie unterschiedlichen Bedingungen ausgesetzt waren. Dieser Test gilt in der Biologie als eines der Standardverfahren, um die Auswirkung unterschiedlicher Einflüsse auf Zellen zu beschreiben. Die klonogene Aktivität ist ein wichtiges Maß zur Beurteilung der Regenerationsfähigkeit sich teilender Zellen und ist deshalb ein sehr wichtiger Parameter bei Ursachen-Wirkungs-Analysen. Ein proliferationshemmender Effekt, z.B. hier verursacht durch ein Kontrastmittel, zeigt sich dementsprechend in einer Verminderung der klonogenen Aktivität. Das bedeutet, dass man anhand der ausgezählten Kolonien feststellen kann, inwiefern die Aktivität der Zellen durch die Inkubation mit einem bestimmten Kontrastmittel verändert und beeinflusst wird. Auch kann man beurteilen, ob eines der verwendeten Kontrastmittel einen deutlich größeren Einfluss auf die Zellen nimmt als ein anderes.

Im Vergleich mit dem Koloniebildungsassay der humanen Nabelschnurendothelzellen kann man schließlich noch beurteilen, ob eine der beiden Zelllinien empfindlicher auf eines der drei Kontrastmittel reagiert als die andere.

3.3.1 Koloniebildungsassay, humane Lungenfibroblasten, Inkubationszeit 4h

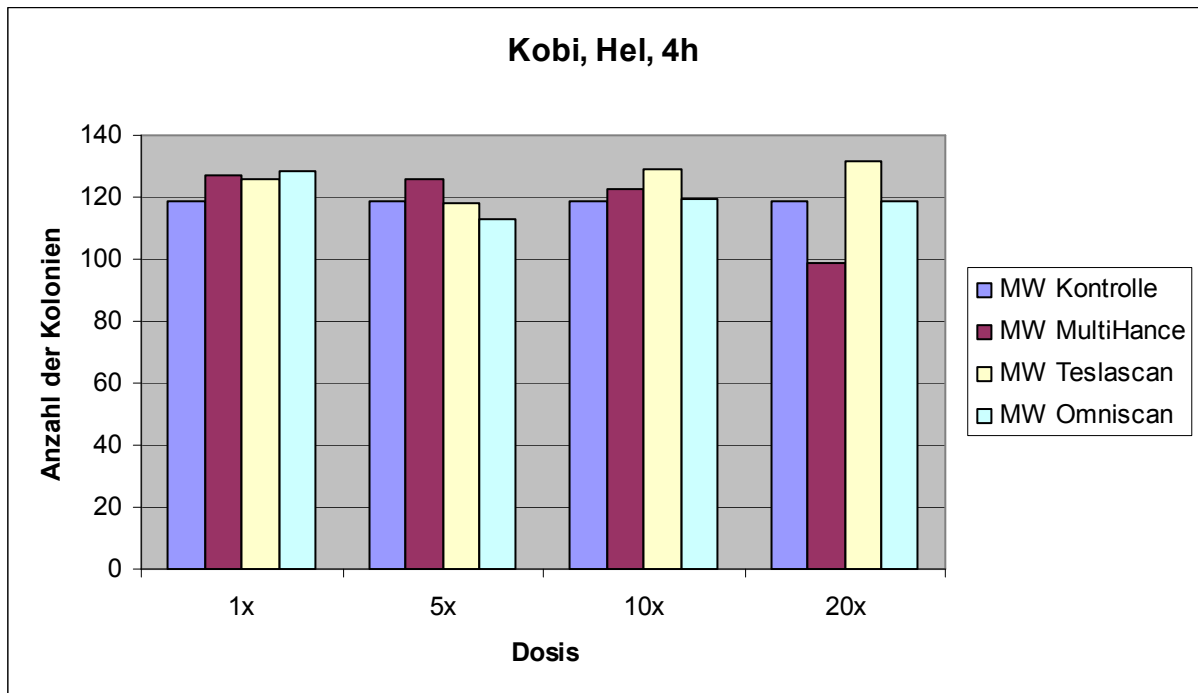


Abb. 3.11: Koloniebildungsfähigkeit der humanen embryonalen Lungenfibroblasten nach vierstündiger Inkubation mit MultiHance[®], Teslascan[®] und Omniscan[®] (ein-, fünf-, zehn- und zwanzigfache Dosis), jeweils im Vergleich zu der Kontrollgruppe. (MW=Mittelwert)

Die niedrigste Kolonieanzahl wird nach einer Inkubation der Zellen mit MultiHance[®] in zwanzigfacher Dosis erreicht und liegt bei 99 Kolonien (MW). Im Vergleich zu der Kontrollgruppe (im Mittel 119 Kolonien) besteht eine Reduktion von 17%. Jedoch liegt keine statistisch signifikante Differenz vor ($p > 0,05$).

Die höchste Kolonieanzahl wird nach vierstündiger Inkubation mit Teslascan[®] mit 132 Kolonien erreicht. Es errechnet sich eine um 11% höhere Kolonieanzahl im Vergleich zur Kontrollgruppe. Es zeigt sich jedoch keine statistische Signifikanz ($p > 0,05$).

Tab. 3.11: Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen des Koloniebildungsassays, humane Lungenfibroblasten, Inkubationszeit 4 h

	<u>1 x</u>	<u>5 x</u>	<u>10 x</u>	<u>20 x</u>
<u>MW</u> <u>MultiHance®</u>	127	126	123	99
<u>Stabw.</u>	12,09	12,23	9,18	11,07
<u>MW Teslascan®</u>	126	118	129	132
<u>Stabw.</u>	12,11	5,15	5,44	10,93
<u>MW Omniscan®</u>	129	113	120	118
<u>Stabw.</u>	12,13	1,48	9,00	3,15

3.3.2 Koloniebildungsassay, humane Lungenfibroblasten, Inkubationszeit 24 h

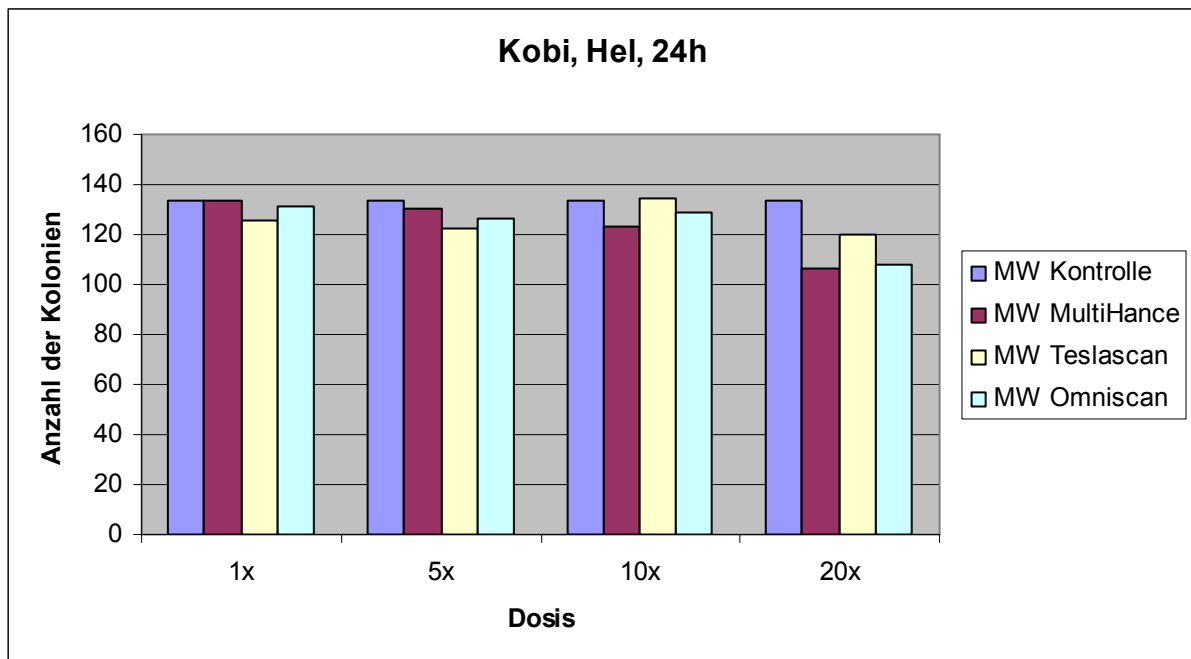


Abb. 3.12. Koloniebildungsfähigkeit der humanen embryonalen Lungenfibroblasten nach 24-stündiger Inkubation mit MultiHance®, Teslascan® und Omniscan® (ein-, fünf-, zehn- und zwanzigfache Dosis), jeweils im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Auch nach 24-stündiger Inkubationszeit ist die Koloniebildungsfähigkeit bei Verwendung von MultiHance[®] mit im Mittel 106 gezählten Kolonien im Vergleich zur Kontrollgruppe mit 134 Kolonien am meisten eingeschränkt; es ergibt sich eine Reduktion von 21% ($p > 0,05$). Nach Inkubation mit Omniscan[®] in höchster Konzentration sind 108 gezählten Kolonien nachweisbar. Im Vergleich mit der Kontrolle besteht ein Verringerung von 19% ($p > 0,05$).

Tab. 3.12: Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen des Koloniebildungsassays, humane Lungenfibroblasten, Inkubationszeit 24 h

	<u>1 x</u>	<u>5 x</u>	<u>10 x</u>	<u>20 x</u>
<u>MW</u> <u>MultiHance[®]</u>	134	131	123	106
<u>Stabw.</u>	6,60	15,34	16,61	2,32
<u>MW Teslascan[®]</u>	126	123	134	120
<u>Stabw.</u>	3,79	1,17	5,15	10,91
<u>MW Omniscan[®]</u>	131	126	129	108
<u>Stabw.</u>	13,24	10,98	19,28	11,81

3.4 Koloniebildungsassay humane Nabelschnurendothelzellen (HUVEC)

Die Nabelschnurendothelzellen wurden jeweils 24 Stunden mit den Kontrastmitteln in zehnfach- und zwanzigfacher Dosis inkubiert.

3.4.1 Koloniebildungsassay, Nabelschnurendothelzellen, Inkubationszeit 24 h

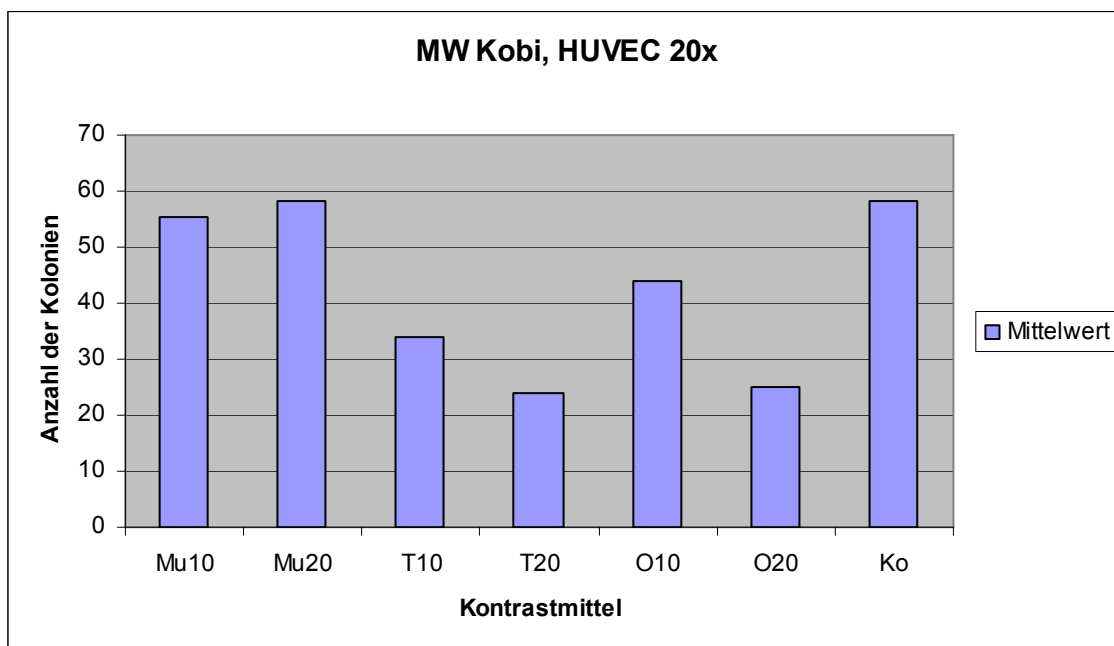


Abb.3.13.: Koloniebildungsfähigkeit der humanen Nabelschnurendothelzellen nach Inkubation mit MultiHance[®] (Mu), Teslascan[®] (T) und Omniscan[®] (O) (zehnfach- und zwanzigfache Dosis), im Vergleich zur Kontrollgruppe (Ko).

Diese Grafik zeigt deutlich, dass sich die Koloniebildungsfähigkeit unter der Einwirkung von MultiHance[®] sowohl in zehnfach- (im Mittel 55 Kolonien) als auch in zwanzigfacher Dosis (im Mittel 58 Kolonien) nicht von der Kontrollgruppe (im Mittel 58 Kolonien) unterscheidet ($p > 0,05$).

Im Gegensatz dazu ist die Fähigkeit zur Koloniebildung nach Inkubation mit Teslascan[®] in zehnfacher Dosis mit 34 Kolonien im Vergleich zur Kontrolle mit 58 Kolonien deutlich geringer ist (42% weniger Kolonien als in der Kontrollgruppe). Es zeigt sich ein statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$,

siehe auch unter "Statistik"). Nach Inkubation mit Teslascan® in der zwanzigfachen Dosis ergeben sich im Vergleich zur Kontrollgruppe sogar 59% weniger Kolonien (24 vs. 58 Kolonien)

($p > 0,05$).

Nicht ganz so stark, jedoch auch deutlich reduziert zeigt sich die Koloniebildung bei der Verwendung von Omniscan® in zehnfacher Dosis (44 vs. 58 Kolonien).

Omniscan® in zwanzigfacher Dosis (25 Kolonien) hat einen ähnlich hemmenden Einfluss auf die Koloniebildung der humanen Nabelschnurendothelzellen wie Teslascan® in zwanzigfacher Dosis. Hier liegt ein statistisch signifikant hemmender Effekt vor ($p < 0,05$).

Tab. 3.12: Mittelwerte und Standardabweichungen des Koloniebildungsassays, humane Nabelschnurendothelzellen, Inkubationszeit 24 h
Signifikante Werte (im Vergleich zur Kontrolle) sind fett hervorgehoben

	Mittelwert	Standardabweichung
Kontrolle	58	5,4
MultiHance® 10x	55	6,7
MultiHance® 20x	58,3	5,1
Teslascan® 10x	34	4,3
Teslascan® 20x	24	4,8
Omniscan® 10x	44	6,9
Omniscan® 20x	25,1	8,3

3.5 Statistik

Auswertung Proliferationskinetik

Die Proliferationskinetik folgt einem nicht-linearen Wachstum. Für diese Wachstumskurve wurde ein mathematisches Modell entwickelt, welches das Wachstumsverhalten und prägnante Punkte innerhalb der Wachstumskurve präzise wiedergibt und für alle Beobachtungen anwendbar ist. Somit werden die Wachstumskurven der Proliferationskinetik untereinander vergleichbar.

Das mathematische Modell für die Proliferationskinetik der humanen embryonalen Lungenfibroblasten lautet:

$$\text{Wenn Tag} < T \quad y = \frac{A}{1 + \left(\frac{A}{30.000} - 1 \right) e^{-\delta(\text{Tag}-1)}}$$

$$\text{Wenn Tag} \geq T \quad y = \frac{A e^{-\beta(\text{Tag}-T)}}{1 + \left(\frac{A}{30.000} - 1 \right) e^{-(\text{Tag}-1)}}$$

Dabei ist A der asymptotische Wert und stellt somit die maximal erreichte Gesamtzellzahl in der Proliferationskinetik dar, delta (δ) ist die Steigung zu Beginn (anfängliche Wachstumsrate), beta (β) spiegelt die Abfallrate wieder und T ist der Tag, ab dem ein negatives Zellwachstum stattfindet, Zellen also absterben.

Das mathematische Modell für die Proliferationskinetik der humanen Nabelschnurendothelzellen lautet:

$$\text{Wenn Tag} = 1 \quad y = 30.000$$

$$\text{Wenn Tag} > 1 \quad y = 30.000 + \frac{A - 30.000}{1 + \left(\frac{\text{Tag}50}{\text{Tag} - 1}\right)^c}$$

Dabei ist A wieder der asymptotische Wert. T50 ist die Zeit nach Beginn der Messung (T=1), an welchem y gleich dem Mittelwert von 30.000 und A ist, bzw. die Hälfte des maximalen Zuwachses A-30.000 erreicht wird. Zu diesem Zeitpunkt hat die Kurve einen Wendepunkt.

Also gilt an diesem Tag:

$$y = 30.000 + \frac{A - 30.000}{2} = \frac{30.000 + A}{2}.$$

C ist die Steigung im Wendepunkt der Kurve.

Für jede Kurve lassen sich nun diese Werte bestimmen und vergleichen.

Dafür werden für jede Bedingung und jeden Versuch die Parameter berechnet. Zum Vergleich untereinander ermittelt man dann die Mittelwerte aus den drei Versuchen.

Um die verschiedenen Wirkungen der Kontrastmittel auf die Zellen auf signifikante Unterschiede zu untersuchen, wurden jeweils die Werte A, also der asymptotische Wert miteinander verglichen.

Für die Auswertung interessieren folgende Fragestellungen:

- Gibt es signifikante Unterschiede in der Wirkung eines Kontrastmittels im Vergleich zu den anderen?
- Gibt es signifikante Unterschiede in der Wirkung eines Kontrastmittels abhängig von der eingesetzten Dosis oder der Inkubationszeit?
- Gibt es signifikante Unterschiede in der Wirkung eines Kontrastmittels im Hinblick auf die Zelllinie? Reagiert also eine Zelllinie empfindlicher hinsichtlich der Zellvermehrung auf die Inkubation mit einem Kontrastmittel als die andere Zelllinie?

Vergleich der Wirkung in Abhängigkeit von der eingesetzten Dosis (Inkubation 24h)

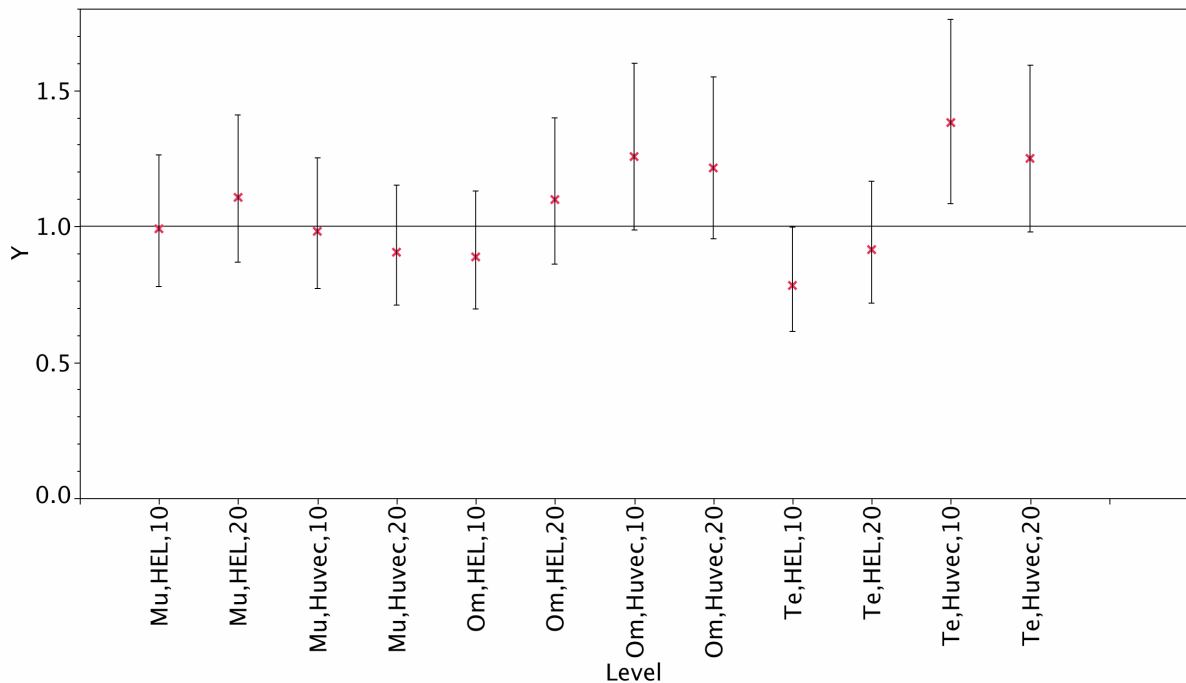


Abb.3.14: Overlay Plot, Auswertung Proliferationskinetik, Kontrastmittel im Vergleich zur Kontrollgruppe (y= Ratio)

Dieser Overlay-Plot zeigt mögliche signifikante Unterschiede der zehnfachen und zwanzigfachen Dosis eines Kontrastmittel im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle. In den Versuchen mit den humanen embryonalen Lungenfibroblasten zeigt sich ein signifikanter Unterschied bei Teslascan® in der zehnfachen Dosis (Lower 95%: 0,71, Upper 95%: 0,996). Alle anderen Kontrastmittel zeigen keine wesentlichen Unterschiede.

In den Versuchen mit den humanen Nabelschnurendothelzellen zeigt sich ebenfalls ein Unterschied bei Teslascan® in zehnfacher Dosis im Vergleich zur Kontrolle (Lower 95%: 1,083, Upper 95%: 1,760).

Bei der Inkubation der Zellen mit Teslascan® in zehnfacher Dosis zeigt sich sowohl bei den humanen embryonalen Lungenfibroblasten als auch bei den humanen Nabelschnurendothelzellen signifikante Unterschiede hinsichtlich des untersuchten Wertes A im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Während die Inkubation der humanen Lungenfibroblasten mit Teslascan® zu einem deutlich geringeren Wert A führt, erreichen die Nabelschnurzellen einen höheren Wert im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Die humanen embryonalen Lungenfibroblasten erreichen nach Inkubation von Teslascan® (10x) einen über die drei Versuche V1-V3 gemittelten Wert A von 5625382,18.

Der Wert A der Kontrollgruppe beträgt 7299622,74.

Nach Inkubation mit Teslascan® wird an Tag 21 also eine maximale Gesamtzellzahl erreicht, die um 23% geringer ist als die der Zellen der Kontrollgruppe.

Die Kontrollgruppe der humanen Nabelschnurendothelzellen erreicht am 17. Tag eine maximale Gesamtzellzahl von 3657470,21. Nach 24-stündiger Inkubation mit Teslascan® in zehnfacher Dosis beträgt die maximal erreichbare Gesamtzellzahl 5091220,13 und ist somit um 28% höher.

Erhöht man die Dosis von Teslascan® auf das Zwanzigfache, ist jedoch kein weiterer Anstieg zu beobachten. Mit einer maximal erreichbaren Gesamtzellzahl von 4676440,90 liegt die Zellzahl dennoch 22% über der Zellzahl der Kontrolle. Dieser Unterschied kann statistisch jedoch nicht als signifikant gewertet werden ($p > 0,05$).

Auswertung Koloniebildungsassay

In den Koloniebildungsassays wird die klonogene Aktivität der Zellen unter bestimmten Bedingungen (Inkubation mit KM unterschiedlicher Dosis) beobachtet.

Mit dem Overlay Plot werden die Daten der Koloniebildungsassays grafisch dargestellt.

Es wird jede Dosis eines Kontrastmittels mit der ‚Dosis‘ 0 (Kontrollgruppe) verglichen.

Tab. 3.13: Übersicht der Koloniebildungsassays mit Mittelwert (Ratio (%)), Standardfehler (Ratio (%)) und 95% - Konfidenzintervall. Signifikante Werte sind fett hervorgehoben.

Kontrastmittel	Zelllinie	Dosis	Std.Fehler (Ratio(%))	Mittelwert (Ratio(%))	Low 95%	Up 95%
MultiHance [®]	Hel	1	2,76	100,14	88,26	112,03
MultiHance [®]	Hel	5	6,94	97,91	68,01	127,81
MultiHance [®]	Hel	10	7,28	92,45	61,11	123,78
MultiHance[®]	Hel	20	1,30	79,69	74,12	85,27
MultiHance [®]	Huvec	10	2,86	95,00	82,70	107,30
MultiHance [®]	Huvec	20	3,30	100,35	86,17	114,54
Omniscan [®]	Hel	1	6,23	98,16	71,38	124,95
Omniscan [®]	Hel	5	5,31	94,45	71,60	117,30
Omniscan [®]	Hel	10	8,75	96,49	58,83	134,15
Omniscan [®]	Hel	20	5,68	81,65	57,23	106,07
Omniscan [®]	Huvec	10	7,89	75,87	41,91	109,83
Omniscan[®]	Huvec	20	9,69	43,23	1,54	84,93
Teslascan [®]	Hel	1	1,92	94,13	85,89	102,37
Teslascan[®]	Hel	5	0,96	91,98	87,85	96,11
Teslascan [®]	Hel	10	2,82	100,64	88,50	112,78
Teslascan [®]	Hel	20	5,22	89,83	67,38	112,27
Teslascan[®]	Huvec	10	1,99	58,15	49,61	66,69
Teslascan[®]	Huvec	20	3,12	41,16	27,72	54,59

Koloniebildungsassay humane Nabelschnurendothelzellen

Im Folgenden werden signifikante Werte zusätzlich grafisch dargestellt.

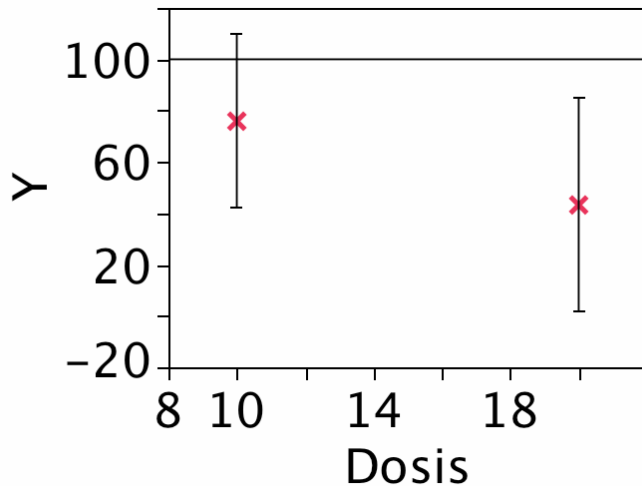


Abb. 3.15: Overlay Plot, Koloniebildungsassay, Omniscan[®], Huvec
(y = Ratio (%))

Aus dieser grafischen Darstellung des Overlay Plot lässt sich ablesen, dass sich die Wirkung von Omniscan[®] auf humane Nabelschnurendothelzellen in zwanzigfacher Dosis statistisch signifikant unterscheidet von der Wirkung der Kontrollgruppe (lower95%: 1,54, upper95%: 84,93) ($p < 0,05$). Wenn man die Zellen 24 Stunden mit Omniscan[®] in einer zwanzigfachen Dosis inkubiert, ist die klonogene Aktivität der Zellen im Vergleich zu den Zellen der Kontrollgruppe deutlich reduziert.

Für die Kontrollgruppe ließ sich ein Mittelwert von 58 gebildeten Kolonien berechnen (Stabw.: 5,4).

Nach Inkubation mit Omniscan[®] (20x) sind es 25 Kolonien (Stabw.: 8,3), das heißt, die Koloniezahl ist im Vergleich zu der Kontrolle um circa 57% geringer.

Wählt man die zehnfache Dosis Omniscan[®], so erhält man eine gemittelte Koloniezahl von ungefähr 44 (Stabw.: 6,9), welche um 24% geringer ist als die der Kontrollgruppe. Diese reduzierte Anzahl der Kolonien ist statistisch jedoch nicht signifikant ($p > 0,05$).

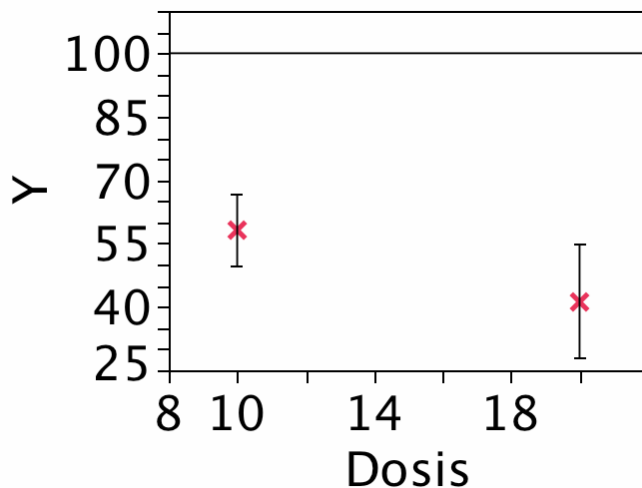


Abb. 3.16: Overlay Plot, Koloniebildungassay, Teslascan[®], Huvec
(y = Ratio (%))

Aus dieser grafischen Darstellung lässt sich ablesen, dass die klonogene Aktivität der Zellen sich signifikant von der Aktivität der Kontrollgruppe unterscheidet, wenn eine 24-stündige Inkubation mit Teslascan[®] sowohl in zehnfacher (lower95%: 49,61, upper95%: 66,69) als auch zwanzigfacher Dosis (lower95%: 27,72, upper95%: 54,59) stattfand.

Die Koloniebildungs- und Regenerationsfähigkeit der Zellen ist nach Inkubation mit Teslascan[®] in zwanzigfacher Dosis stärker reduziert als nach Inkubation mit der zehnfachen Dosis ($p < 0,05$).

Nach 24-stündiger Inkubation mit Teslascan[®] in zehnfacher Dosis ergibt sich eine gemittelte Koloniezahl von ungefähr 34 Kolonien (Stabw.: 4,3). Im Vergleich zur Kontrolle ist somit die Anzahl der Kolonien um 41% geringer ($p < 0,05$).

Nach Inkubation mit der zwanzigfachen Dosis liegt die Anzahl der Kolonien bei 24 Kolonien (Stabw.: 4,8), ist also um 49% geringer im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0,05$).

Somit zeigt Teslascan[®] in zwanzigfacher Dosis in diesem Setting den größten hemmenden Effekt auf die Koloniebildungsfähigkeit der humanen embryonalen Nabelschnurendothelzellen.

Koloniebildungsassay humane embryonale Lungenfibroblasten

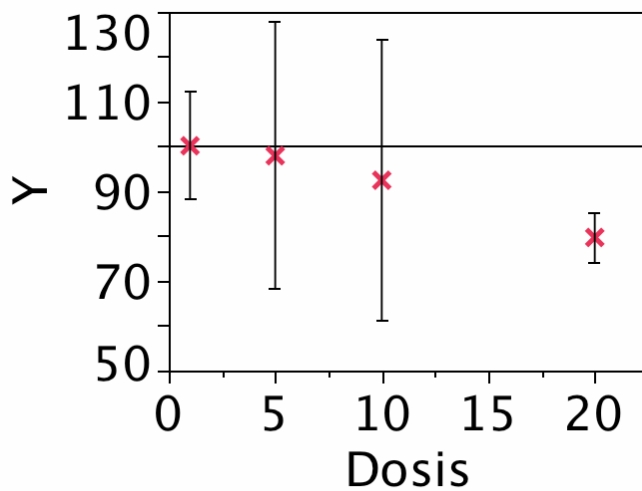


Abb. 3.17: Overlay Plot, Koloniebildungsassay, MultiHance[®], Hel (y = Ratio (%)), 24-stündige Inkubation

Diese graphische Darstellung des Overlay Plot beschreibt die Wirkung auf die klonogene Aktivität nach 24-stündiger Inkubation der humanen embryonalen Lungenfibroblasten mit MultiHance[®].

Es zeigt sich im Vergleich zur Kontrollgruppe ein signifikanter Unterschied bei Einsatz der zwanzigfachen Dosis (lower95%: 74,12, upper95%: 85,93) ($p < 0,05$), jedoch nicht bei der ein-, fünf- und zehnfachen Dosis.

Nach 24-stündiger Inkubation mit der zwanzigfachen Dosis beträgt die mittlere Kolonieanzahl 106 (Stabw. 2,32).

Im Vergleich zur Kontrolle ist die Anzahl der Kolonien hier um 21% geringer.

Die mittlere Kolonieanzahl liegt bei einfacher Dosis bei 134 Kolonien (Stabw.: 6,60), bei fünffacher Dosis bei 131 Kolonien (Stabw.: 15,34) und bei zehnfacher Dosis bei 123 Kolonien (Stabw.: 16,61).

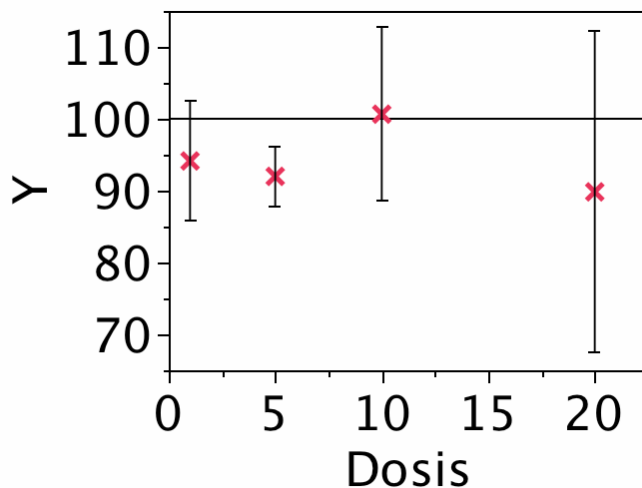


Abb. 3.18: Overlay Plot, Koloniebildungsassay, Teslascan[®], Hel
(y = Ratio (%))

Aus dieser Grafik kann man die Wirkung von Teslascan[®] auf die klonogene Aktivität der Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe ablesen. Man sieht einen signifikanten Unterschied bei der fünffachen Dosis (lower95%: 87,85, upper95%: 96,11) des Kontrastmittels, nicht jedoch bei ein-, zeh- und zwanzigfacher Konzentration.

Die mittlere Kolonieanzahl bei fünffacher Dosis beträgt 123 Kolonien (Stabw.: 1,17), ist also im Vergleich zur Kontrolle um 8% geringer, durch die statistisch ermittelten Intervalle jedoch signifikant geringer ($p < 0,05$).

Vergleich der Koloniebildungsassays zwischen den beiden Zelllinien

Für diesen Vergleich mittelt man die Werte der drei Versuchsreihen (V1-V3) und gibt sie prozentual im Vergleich zum dazugehörigen Kontrollwert wider (Ratio = KM/Ko).

Signifikante Unterschiede werden durch die "Oneway Analysis of Ratio" deutlich.

Die Rauten spiegeln die Intervalle der gemessenen Werte wider.

Wenn sich die Rauten der zwei Zelllinien nicht überschneiden, liegt ein signifikanter Unterschied vor.

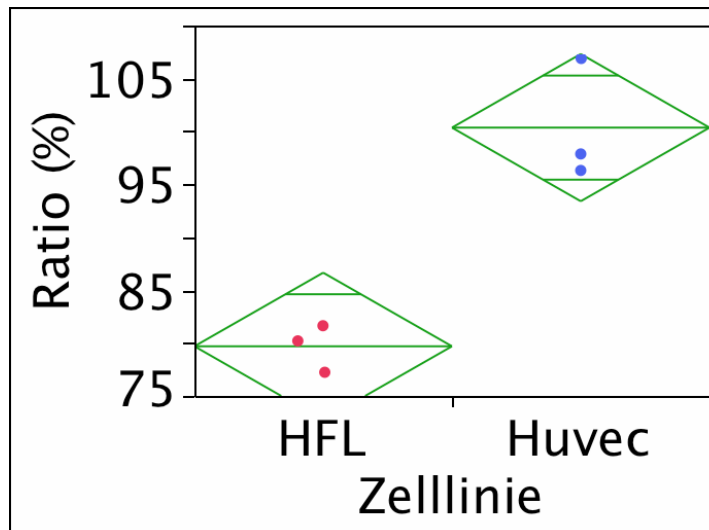


Abb. 3.19: Oneway Analysis of Ratio (%), MultiHance[®], zwanzigfache Dosis

Mit dieser Grafik wird gezeigt, dass sich die Wirkung von MultiHance[®] auf die klonogene Aktivität der humanen embryonalen Lungenfibroblasten signifikant unterscheidet von der Wirkung auf die humanen Nabelschnurendothelzellen ($p < 0,05$). Die mittlere Kolonieanzahl der humanen Nabelschnurendothelzellen beträgt ungefähr 58 Kolonien, ebenso die der Kontrollgruppe; somit ergibt sich eine Ratio von nahezu 100%.

Im Gegensatz dazu beträgt die mittlere Kolonieanzahl der Lungenfibroblasten 106 Kolonien, die der Kontrollgruppe 134; somit errechnet sich eine Ratio von 79%.

Die Ratio der gezählten Kolonien der Lungenfibroblasten ist signifikant kleiner als die Ratio der gezählten Kolonien der Nabelschnurzellen. Das bedeutet, dass die Lungenfibroblasten hinsichtlich ihrer klonogenen Aktivität wesentlich empfindlicher reagieren als die Nabelschnurzellen (nach Inkubation mit MultiHance[®] in zwanzigfacher Dosis).

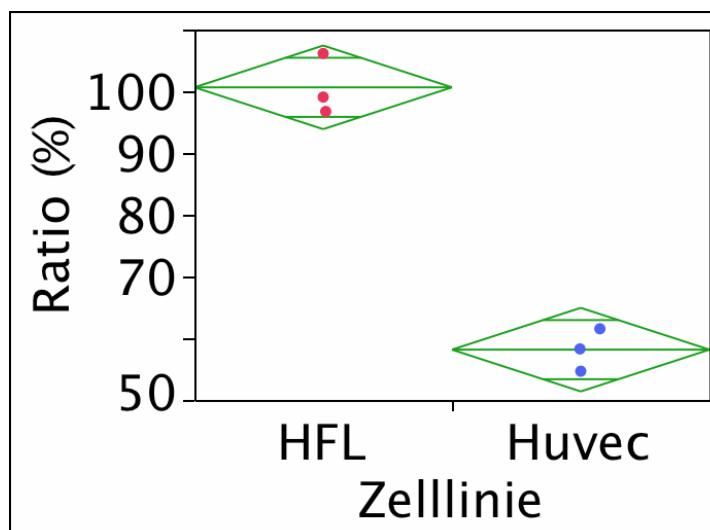


Abb. 3.20: Oneway Analysis of Ratio (%), Teslascan[®], zehnfache Dosis

Aus dieser Grafik erkennt man einen signifikanten Unterschied der klonogenen Aktivität der zwei Zelllinien. Nach 24-stündiger Inkubation mit Teslascan[®] in zehnfacher Dosis ist die Aktivität der Endothelzellen wesentlich geringer als die Aktivität der Lungenfibroblasten ($p < 0,05$).

Für die Lungenfibroblasten ergibt sich eine mittlere Gesamtkolonieanzahl von 134, für die Kontrollgruppe ergeben sich ebenfalls circa 134 Kolonien, so dass sich eine Ratio von nahezu 100% ergibt.

Die Nabelschnurzellen weisen nach Inkubation mit Teslascan[®] eine mittlere Kolonieanzahl von ungefähr 34 auf. Bei einer mittleren Kolonieanzahl der Kontrollgruppe von 58 ergibt sich eine Ratio von ungefähr 59%.

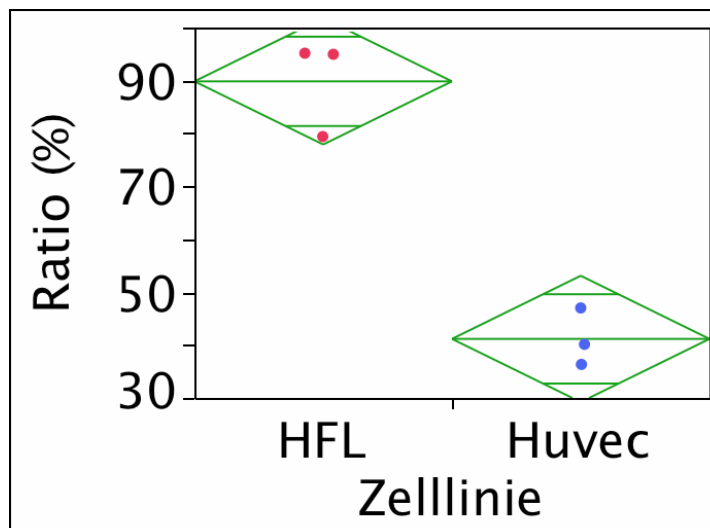


Abb. 3.21: Oneway Analyse of Ratio (%), Teslascan[®], zwanzigfache Dosis

Aus dieser Grafik erkennt man einen statistisch signifikanten Unterschied in der klonogenen Aktivität der Nabelschnurzellen verglichen zu den Lungenfibroblasten nach 24-stündiger Inkubation mit Teslascan[®] in zwanzigfacher Dosis.

Die klonogene Aktivität der Endothelzellen ist signifikant niedriger ($p < 0,05$).

Bei den Nabelschnurzellen ergibt sich eine mittlere Gesamtkolonieanzahl von 24, bei der Kontrollgruppe von 58. Daraus ergibt sich eine Ratio von 41%.

Bei den Lungenfibroblasten hingegen errechnet sich bei einer Kolonieanzahl von 120 und einer Kolonieanzahl der Kontrollgruppe von 134 eine Ratio von knapp 90%.

Zusammenfassend lässt sich also Folgendes festhalten:

Proliferationskinetik Lungenfibroblasten:

Statistisch signifikant unterschiedlich zur Kontrolle ist nur Teslascan[®] in zehnfacher Dosis. Im Gegensatz zu den Kontrastmitteln MultiHance[®] und Omniscan[®] hat Teslascan[®] eine hemmende Wirkung auf die Proliferationskinetik der Lungenfibroblasten.

Proliferationskinetik Nabelschnurendothelzellen:

Hier zeigt keines der drei Kontrastmittel hemmende Effekte auf das Wachstum der Zellen.

Koloniebildungsassay Lungenfibroblasten:

Einen deutlichen Unterschied zu der Koloniebildung der Kontrollgruppe zeigen die Zellen nach Inkubation mit MultiHance® in 20-facher Dosis. Die Fähigkeit zur Koloniebildung ist signifikant reduziert.

Eine ebenfalls signifikant niedrigere Koloniezahl wird nach Inkubation mit Teslascan® in fünffacher Dosis beobachtet.

Koloniebildungsassay Nabelschnurendothelzellen:

Einen signifikanten hemmenden Effekt auf die Koloniebildung hat die Inkubation mit Omniscan® in zwanzigfacher Dosis.

Teslascan® hat sowohl in zehnfacher als auch in zwanzigfacher Dosis einen deutlich hemmenden Einfluss auf die Fähigkeit, Kolonien zu bilden.

Koloniebildungsassay: Vergleich der beiden Zelllinien:

Es zeigt sich, dass die humanen Lungenfibroblasten nach 24-stündiger Inkubation mit MultiHance® hinsichtlich ihrer klonogenen Aktivität wesentlich empfindlicher reagieren als die Nabelschnurendothelzellen.

Weiterhin zeigt sich, dass die Nabelschnurendothelzellen auf die Inkubation mit Teslascan® sowohl in zehnfacher Dosis als auch in zwanzigfacher Dosis hinsichtlich ihrer klonogenen Aktivität signifikant empfindlicher reagieren als die Lungenfibroblasten.

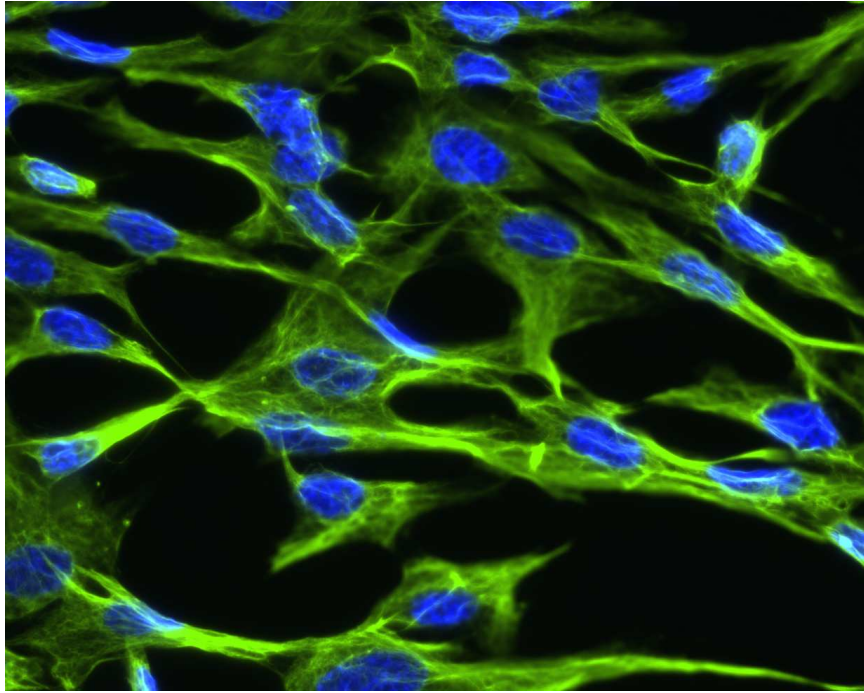


Abb. 3.21: Humane embryonale Lungenfibroblasten. Die typische spindelförmige Form der Zellen ist in Vimentinfärbung gut erkennbar (DAPI-Kernfärbung + Vimentin, Kontrolle 40fach)

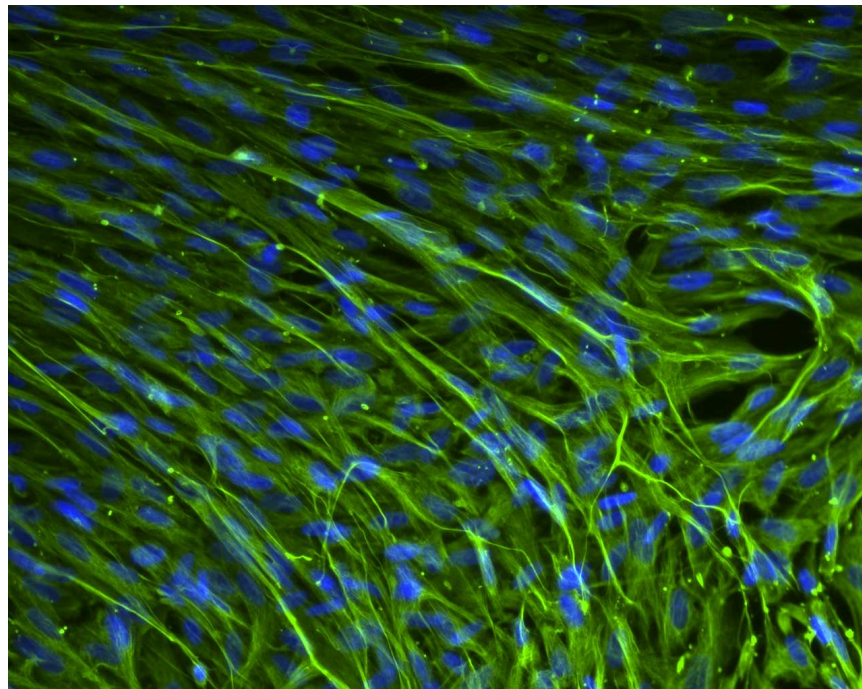


Abb. 3.22: Dichter Zellrasen der spindelförmigen Lungenfibroblasten nach Inkubation mit MultiHance® (DAPI-Kernfärbung + Vimentin, MultiHance®, 20fache Dosis, 20fach)

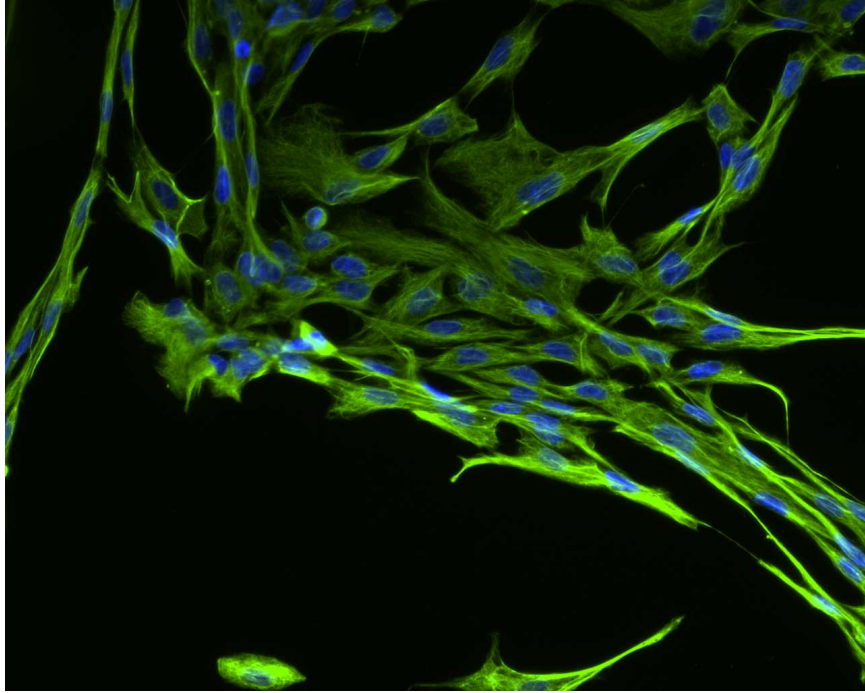


Abb. 3.23: Humane embryonale Lungenfibroblasten (DAPI-Kernfärbung + Vimentin, Omniscan[®], 20fache Dosis, 20fach)

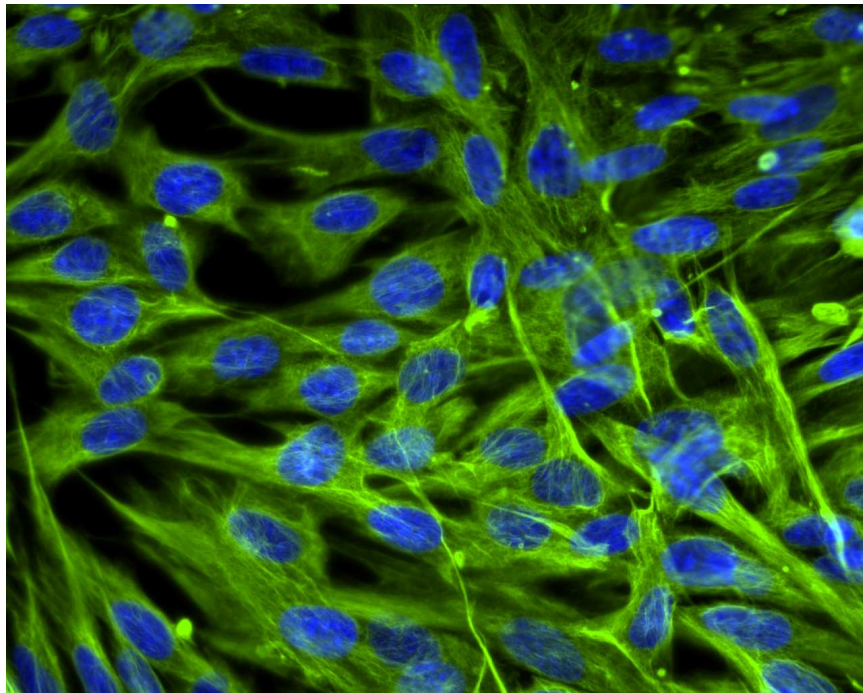


Abb. 3.24: Humane embryonale Lungenfibroblasten (DAPI-Kernfärbung + Vimentin, Teslascan[®], 20fache Dosis, 40fach)

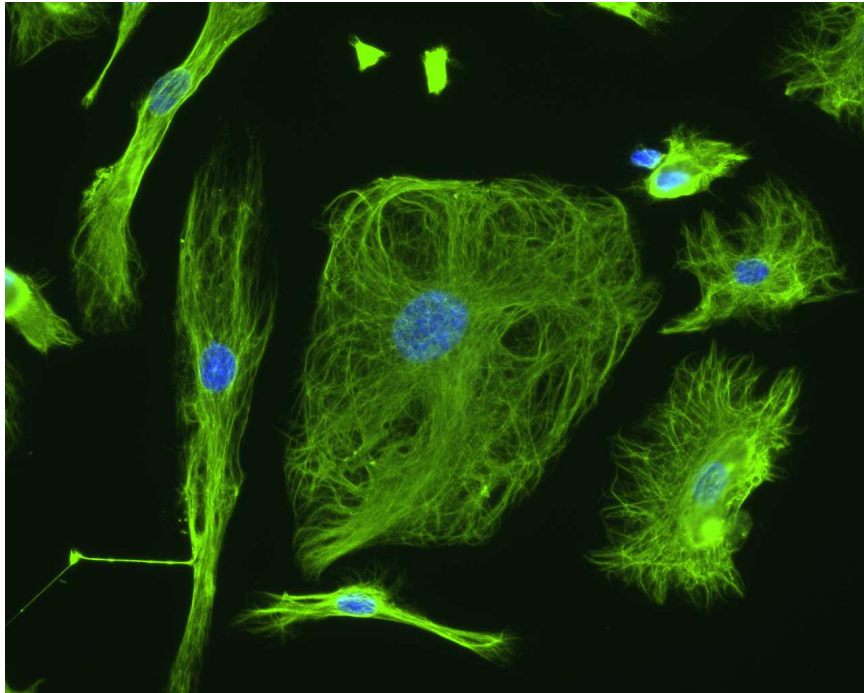


Abb. 3.25: Die charakteristische Form der Endothelzellen ist gut zu erkennen (Humane Nabelschnurendothelzellen, DAPI-Kern-färbung + Vimentin, 20fach)

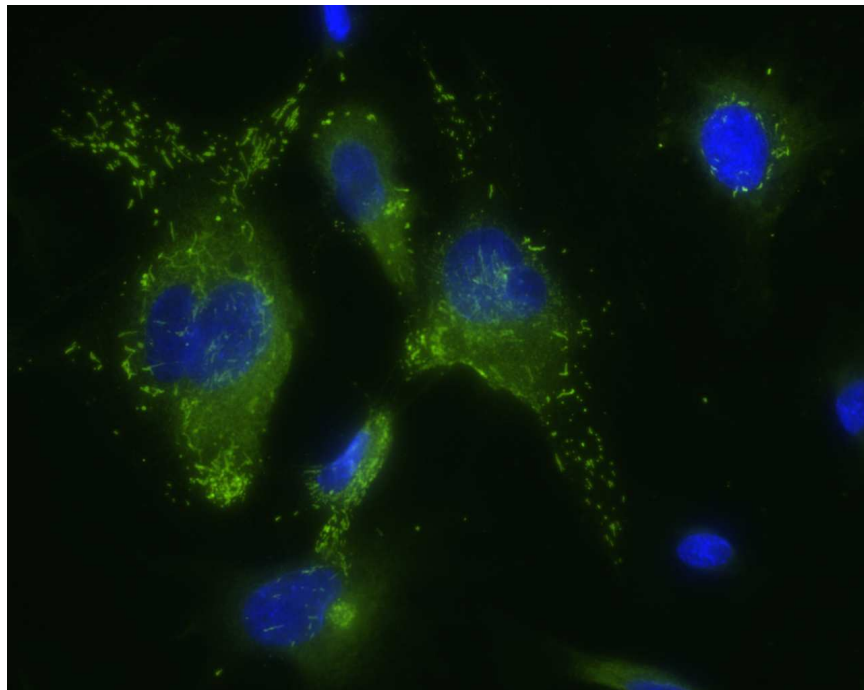


Abb. 3.26: Endothelzellen, bei denen eine immnhistochemische Färbung des vWF mit der DAPI-Kernfärbung + Vimentin kombiniert wurde (40fach).

4. Diskussion

Wenn bei schwangeren Patienten eine kontrastmittelverstärkte MRT-Untersuchung durchgeführt werden muss, ist eine Exposition des Fetus mit Kontrastmitteln die Folge. Somit stellt sich dann die Frage nach der Gefährdung des Fetus durch die geplante Untersuchung und den daraus resultierenden Konsequenzen.

Ein Blick in den Beipackzettel oder in die Rote Liste[®] ist oft wenig hilfreich, zumal auch die Gefährdungseinstufungen bei Medikamenten aus der gleichen Klasse nicht einheitlich sind.

Eine Kontrastmittelexposition von Schwangeren allein zu Studienzwecken ist ethisch nicht vertretbar und somit ist es schwierig, bei der leider sehr spärlich vorhandenen Informationsfülle, genaue Aussagen über die teratogenen Eigenschaften der verschiedenen Kontrastmittel zu machen.

4.1 Regelungen der Gabe von MRT-Kontrastmitteln während der Schwangerschaft

Gedacht werden muss an Störungen während der hochkomplexen Entwicklungsvorgänge in der Organogenese. Durch Einwirkung von teratogenen Medikamenten kann es in diesem Zeitraum zu Fehlbildungen unterschiedlichsten Ausmaßes kommen.

Die ESUR (European Society of Urogenital Radiology; <http://www.esur.org>) hat nach ausführlicher Literaturrecherche zu dieser Problematik eine Empfehlung zum Einsatz von Kontrastmitteln während der Schwangerschaft und Stillzeit erarbeitet.

Die aktuellste Fassung von 2009 gibt folgende Entscheidungshilfen zum Einsatz von gadoliniumhaltigen MRT-Kontrastmitteln:

Einsatz während der Schwangerschaft: Bei streng zu stellender Indikation darf die geringstmögliche Dosis eines möglichst stabilen gadoliniumhaltigen Kontrastmittels der Schwangeren verabreicht werden. Bei fachgerechter Handhabung sind keine besonderen Tests des Neugeborenen erforderlich.

Einsatz während der Stillzeit: Das Stillen sollte für bis 24 Stunden nach der Kontrastmittelgabe pausiert werden.

Schwangere oder stillende Mütter mit eingeschränkter Nierenfunktion: Auf die Gabe von gadoliniumhaltigen Kontrast-Mitteln sollte verzichtet werden.

Eine Differenzierung hinsichtlich des Applikationszeitpunktes (1., 2., 3. Trimenon) wird nicht vorgenommen. Vor Anwendung eines gadoliniumhaltigen Kontrastmittels soll eine Schwangerschaft ausgeschlossen werden.

4.2 Klinische Studien über die Effekte von Kontrastmitteleinsatz während der Schwangerschaft

Bis Heute gibt es nur sehr wenige klinische Studien, die über den Einsatz von Kontrastmitteln während der Schwangerschaft und mögliche Folgen für den Fetus berichten.

De Santis (15) berichtete 2007 über eine prospektiv angelegte Studie, an der insgesamt 26 schwangere Frauen teilnahmen.

Alle diese Frauen haben sich im ersten Trimenon ihrer Schwangerschaft einer kontrastunterstützten MRT aus den verschiedensten Gründen unterziehen müssen.

Der Zeitraum der Kontrastmittelverabreichung lag in der frühen Embryonalphase, nicht jedoch die Organogenese.

Nach Entbindung wurde das Augenmerk auf Geburtsfehler und frühkindliche Komplikationen gerichtet.

Diese Studie zeigte jedoch weder Komplikationen auf Seiten der Mütter, noch bei den Neugeborenen.

Nebenbefundlich wurden bei einem Neugeborenen zwei Hämangiome diagnostiziert, ein chirurgischer Eingriff war nicht vonnöten.

Zwei der 26 Frauen erlitten eine Fehlgeburt. Jedoch ergaben sich auch bei der Untersuchung des Abortmaterials keinerlei Hinweise auf angeborene Missbildungen oder Ähnliches.

In einer Studie von Marcos (44), in der die Möglichkeiten der Darstellung der Plazenta mittels MRT und Gabe eines gadoliniumhaltigen Kontrastmittels bei elf schwangeren Frauen untersucht wurden, kamen alle Neugeborene gesund auf die Welt und es gab keine Anhalt auf eine intrauterine Wachstumsretardierung.

4.3 Effekte von Kontrastmitteln im Tiermodell

Der Vorteil von Experimenten mit Tieren liegt ganz offenbar darin, dass man Auswirkungen auf einen Gesamtorganismus beobachten und untersuchen kann. Im Vergleich zu In-vitro-Experimenten sind somit eher vergleichende Schlussfolgerungen bezüglich des Gesamtorganismus Mensch möglich.

Jedoch muss man bedenken, dass humane Zellen über andere Zellorganellen, Reparaturmechanismen, Ionenkanäle und Enzyme verfügen und somit insgesamt eine andere Reaktion auf toxische Substanzen hervorrufen können, als die untersuchten tierischen Zellen.

Der Vergleich von Ergebnissen aus Tiermodellen mit denen aus in-vitro-Studien bewegt sich ebenfalls in engen Grenzen. Es ist offensichtlich, dass Tiere auf äußere Stressfaktoren anders reagieren als eine In-vitro-Zellkultur.

4.3.1 Magnevist®

1992 berichtete Rofsky (57) über die Ergebnisse seines Tiermodells, in welchem die Effekte von gadoliniumhaltigen Kontrastmitteln auf die fetale Entwicklung von Mäusen untersucht wurden.

In dieser Studie wurden folgende Gruppen untersucht: keine Behandlung, intraperitoneale Injektion mit Kochsalzlösung, intraperitoneale Injektion mit Gadopentetate dimeglumine und MRT-Einwirkung und alleinige MRT-Einwirkung (1,5 Tesla).

Die applizierte Dosis des Gadopentetate dimeglumine (Magnevist®) entsprach ungefähr dem Hundertfachen der klinisch empfohlenen Dosis.

Etwa neun Tage nach der Injektion wurden die Tiere getötet und die Feten entnommen, gewogen und auf folgende Aspekte hin untersucht:

Größe des Wurfes, Anzahl der lebenden und toten Feten, Morphologie der Extremitäten, Ohr- und Augenentwicklung und Aussehen des Kopfes einschließlich des Mauls.

Weiterhin wurde der Uterus bezüglich Zeichen, die auf einen frühen intrauterinen Tod hinweisen könnten, untersucht.

Das Ergebnis der insgesamt 739 untersuchten Mäusefeten zeigt, dass es keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen gab.

4.3.2 MultiHance®

In einer Studie von Okuda (52) wurden Kaninchen hinsichtlich möglicher Komplikationen für Muttertier und intrauterine Entwicklung der Feten untersucht. Den Tieren wurde Gadobenate dimeglumine (MultiHance®) täglich in einer Dosis von 0,3, 0,9 oder 2,0 mmol/kg KG injiziert (klinisch eingesetzte Dosis: 0,1 mmol/kgKG).

Bei der täglich applizierten Dosis von 2,0 mmol/kg KG kam es zu einem initialen Gewichtsverlust des Muttertiers verbunden mit einer reduzierten Nahrungsaufnahme.

Zu einem schleichenden Gewichtsverlust bei im Verlauf reduzierter Nahrungsaufnahme kam bei der Dosis von 0,9 mmol/kg KG.

Es kam jedoch zu keiner ersichtlichen Benachteiligung der Tiere bei einer Dosis von 0,3 mmol/kg KG.

Im Hinblick auf die Feten kam es zu einer leicht erhöhten Inzidenz des frühen intrauterinen Todes sowohl bei einer Dosis von 2,0 mmol/kg KG als auch bei einer Dosis von 0,9 mmol/kg KG.

Feten, dessen Mütter mit einer Dosis von 2,0 mmol/kg KG behandelt wurden, fielen mit einer Mikrophthalmie und Retinafehlbildungen auf, weiterhin nahm die Zahl zusätzlicher und/oder verschmolzener Wirbel im Thorakolumbalbereich zu. Insgesamt ließen sich jedoch keine Benachteiligungen für Muttertiere und die fetale Entwicklung bei einer Dosis von 0,3 mmol/kg Körpergewicht beobachten.

Vergleichend soll erwähnt werden, dass die empfohlene klinische Dosis von MultiHance[®] beim Erwachsenen bei einer MRT der Leber 0,05 mmol/kg Körpergewicht, bei einer MRT des Gehirns oder des Rückenmarks 0,1 mmol/kg Körpergewicht und bei einer MRA ebenfalls 0,1 mmol/kg Körpergewicht beträgt.

In einer weiteren tierexperimentellen Studie aus dem gleichen Jahr von Kawaguchi (34) untersuchte man die Einflüsse auf die Fertilität und die embryofetale Entwicklung in weiblichen Ratten nach intravenöser Gabe von Gadobenate Dimeglumine (MultiHance[®]).

15 Tage vor der Paarung wurde 22 weiblichen Ratten das Präparat in einer Dosis von 0,3, 1,0 oder 2,0 mmol/kg KG täglich verabreicht.

Die Behandlung wurde bis zum 17. Tag der Tragezeit fortgesetzt. Am 20. Tag folgte die Tötung und Untersuchung der Tiere. Im Vergleich zu einer Kontrollgruppe gab es keine Unterschiede hinsichtlich dem Gewicht, der

Nahrungsaufnahme, dem Paarungsverhalten, der Wurfgröße, dem Gewicht des Fetus und dem Überleben und der Entwicklung der Feten.

Das Verhalten der Muttertiere zeigte keine Veränderungen im Vergleich zu den Kontrolltieren (Verhaltensauffälligkeiten, Sterblichkeit, Fehlgeburten, Körpergewicht und Nahrungsaufnahme).

Am 29. Tag der Tragezeit wurden die Tiere eingeschläfert, um nun die Feten untersuchen zu können. Gezählt wurden die lebenden und toten Feten, die Gesamtanzahl der Implantationen und die Corpi lutea.

Auch die Untersuchung der Feten ergab keine auffälligen Unterschiede im Vergleich zu der Kontrollgruppe.

4.3.3 Teslascan®

1995 untersuchte Blazak die Wirkung von Mangafodipir Trisodium (Teslascan®) in trächtigen Kaninchen (9).

Einer Gruppe von 22 Tieren wurde jeweils im Abstand von sechs Tagen das Kontrastmittel in einer Dosis von 5, 20, 40, oder 60 $\mu\text{mol/kg KG}$ intravenös verabreicht. Die Kontrollgruppe erhielt isotone Kochsalzlösung (klinisch eingesetzte Dosis: 5 $\mu\text{mol/kg KG}$).

Selbst bei der höchsten Dosis gab es bei den Muttertieren keine Anzeichen einer möglichen toxischen Reaktion. Es bestanden keine Auffälligkeiten bezüglich des Gewichts oder der Menge der Nahrungsaufnahme.

Die Feten wurden an Tag 29 hinsichtlich äußerlicher, viszeralen und skeletalen Abweichungen untersucht.

Bei der Dosis von 60 $\mu\text{mol/kg}$ zeigte sich ein deutlicher Anstieg von Fehlgeburten. Gehäufte viszerale oder skeletale Fehlbildungen konnten jedoch nicht beobachtet werden.

Eine vorausgehende ähnliche Studie von Treinen (61) mit Ratten zeigte von dieser Studie abweichende Ergebnisse:

Den Ratten wurde ab Tag 6 der Tragezeit täglich MnDPDP in einer Dosis von 0, 2, 5 oder 20 µmol/kg Körpergewicht injiziert. Toxische Auswirkungen auf die Muttertiere waren bei keiner der verwendeten Dosen zu beobachten.

Weiterhin gab es keinen Zusammenhang zwischen der eingesetzten MnDPDP-Dosis und der Größe des Wurfes, der Anzahl der lebenden und toten Feten und der Anzahl der Implantationen.

Jedoch war auffällig, dass nach Injektion des Muttertieres von MnDPDP in der höchsten Dosis das Gewicht der betroffenen Feten deutlich reduziert war. Weiterhin wurden zunehmend skeletale Fehlbildungen beobachtet. Eine Folgestudie zeigte, dass die Skelettfehlbildungen dosisabhängig sind, am ausgeprägtesten bei Feten von Muttertieren, welchen das Kontrastmittel an den Tagen 15, 16 und 17 der Tragezeit verabreicht wurde.

Diese Studien lassen vermuten, dass sich eine wiederholte Gabe einer hohen Dosis MnDPDP schädlich auf den heranwachsenden Fetus auswirkt.

4.4 Effekte von Kontrastmitteln in vitro

Der Vorteil von Studien mit Zellkulturen liegt in der experimentellen Reproduzierbarkeit. Weiterhin sind die experimentellen Parameter (z.B. Temperatur, CO₂-Gehalt, Wahl der Dosis der untersuchten Substanz) frei wählbar. Generell ist jedoch auch bei In-vitro-Studien Vorsicht geboten, wenn man die erzielten Ergebnisse auf den Gesamtorganismus des Menschen übertragen möchte.

Es gilt zu beachten, dass die einzelnen Zellen lediglich Parenchyme definierter Organe repräsentieren.

4.4.1 Omniscan®

2001 untersuchte Greisberg mögliche Auswirkungen von gadoliniumhaltigen Kontrastmitteln auf kultivierte Chondrozyten des Knochens (24).

Dem Medium der Zellen wurde Gadodiamide (Omniscan[®]) für 16 Tage in drei verschiedenen Dosen zugesetzt:

Die erste Gruppe erhielt 4 mmol/l Gadodiamide, die zweite erhielt das Fünffache dieser Dosis, eine dritte Gruppe das Zehnfache.

Somit erhielt die erste Gruppe eine alltagsübliche Dosis.

Schließlich wurden die Zellen hinsichtlich der Proteoglykanproduktion, der Zellproliferation und der Apoptose untersucht.

Die Zellproliferation nahm mit steigender Dosis ab, die Apoptoserate mit ebenfalls zunehmender Dosis zu.

Somit gibt es Hinweise darauf, dass Omniscan[®] eine Apoptose in Knorpelzellen bewirken kann, auch in klinisch täglich verwendeten Dosen.

4.4.2 MultiHance[®], Omniscan[®]

In einer weiteren in-vitro-Studie verglichen Heinrich et al 2007 die Toxizität von iodhaltigem Kontrastmitteln und gadoliniumhaltigen Kontrastmitteln auf renale Tubuluszellen (27).

In seinen Versuchen untersuchte er auch die Kontrastmittel Omniscan[®] und MultiHance[®].

Nach einer 24-stündigen Inkubation der Zellen mit Gadobenate dimeglumine (MultiHance[®]) in einer Konzentration von 125 mmol/l kam es zu einer signifikanten Nekrose der untersuchten Zellen, nicht jedoch nach Inkubation mit Omniscan[®] in gleicher Dosis.

4.5 Zusammenfassung bisheriger Studien

Klinische Studien sind besonders aussagekräftig bezüglich einer möglichen Toxizität von MRT-Kontrastmitteln bei Anwendung während der Schwangerschaft.

Leider sind sie rein zu Forschungszwecken schwer durchzuführen. Klinische Erfahrungsberichte liegen nur in sehr kleiner Anzahl vor. Negative

Auswirkungen auf Mutter oder Ungeborenes/Neugeborenes nach einer notwendigen Verabreichung eines gadoliniumhaltigen Kontrastmittels sind nicht dokumentiert.

Diese Datenlage ist jedoch so dünn, dass man von ihr ausgehend keine Entwarnung bezüglich möglicher toxischer Effekte auf Embryonen geben kann.

Bei einer Studie mit Kaninchen konnte man neunfach verabreichten Dosis der klinisch empfohlenen Dosis des gleichen Kontrastmittels MultiHance® eine leicht erhöhte Inzidenz des intrauterinen Fruchttodes feststellen, sowie zusätzliche fetale Fehlbildungen bei der zwanzigfachen der klinische empfohlenen Dosis (52). Bei einer ähnlich aufgebauten Studie mit Ratten konnten diese Beobachtungen nicht gemacht werden (34).

Somit ist es schwierig eine auf diesen widersprüchlichen Ergebnissen beruhende Richtlinie für den Gebrauch von MultiHance® bei Schwangeren auszusprechen. Es stellt sich vielmehr die Frage, ob bezüglich der Toxizität eines Kontrastmittels eine Abhängigkeit des jeweiligen Organismus besteht und somit auch der Zellart oder der Zelllinie.

Auch die Verabreichung von Teslascan® zeigt im Tierexperiment heterogene Auswirkungen.

Während es bei einer Studie ab dem Zwölfwache der klinisch empfohlenen Dosis zu einem Anstieg der Fehlgeburtenrate kommt, nicht jedoch zu einer Häufung von viszeralen oder skeletalen Fehlbildungen (9), kommt es bei einer anderen Studie bereits bei Verabreichung der vierfachen Dosis zu einem deutlich reduzierten Gewicht der Feten und zu skeletalen Fehlbildungen (61).

Da sich die Ergebnisse zweier ähnlicher Studien bei Kaninchen und Ratten unterscheiden, ist es auch hier nicht möglich, konkrete Schlüsse über die Wirkung von Teslascan® auf ein menschliches Ungeborenes zu ziehen. Auch hier stellt sich somit wieder die Frage nach einer möglichen Abhängigkeit vom Organismus und der Zellart.

4.6 Eigene Untersuchungen

Die bisher nur geringe Anzahl an Studien und Erfahrungen bezüglich dieser Problematik und die Diskrepanzen in den existierenden Studienergebnissen waren der Anlass, die vorliegende Studie durchzuführen.

4.6.1 Wahl der Zellen

In den Experimenten der vorliegenden Studie wurden zwei verschiedene Zelllinien verwendet, humane embryonale Lungenfibroblasten und humane Nabelschnurendothelzellen. Fibroblasten zeichnen sich durch eine gute Kultivierbarkeit aus.

Es ist sinnvoll, humane Zellen zu verwenden, da so eine Übertragung der Ergebnisse aus Zellkulturen humaner Zellen zur Einschätzung des Risikos für den Menschen einfacher ist (als z.B. bei Verwendung tierischer Zellen).

Embryonale Zellen bieten den Vorteil, dass sie sich in einer sehr empfindsamen Entwicklungsphase befinden und den Abschnitt der Organogenese (entspricht dem ersten Trimenon) widerspiegeln. Somit reagieren sie wahrscheinlich sensibler auf den Kontakt mit Kontrastmitteln.

4.6.2 Proliferationskinetik

Die Proliferationskinetik der Fibroblasten zeigt einen bei allen Bedingungen anzutreffenden typischen Verlauf:

Bis zum Tag 11 kommt es zu einem raschen Wachstum der Zellen. Nachdem sie an diesem Tag ihre maximale Gesamtzellzahl erreicht haben, kommt es durch Kontaktinhibition zu einem Absterben der Zellen.

Die Versuche mit den Fibroblasten zeigen in der Proliferationskinetik wenige signifikante Beeinträchtigungen des Wachstumsverhaltens der Zellen unter Einwirkung der jeweiligen Kontrastmittel.

Lediglich nach Inkubation mit Teslascan® in der zehnfachen der klinisch empfohlenen Dosis lässt sich ein statistisch signifikanter Unterschied

nachweisen (Abb. 3.4 und Abb. 3.14). Im Vergleich zu dem Wachstumsverhalten der Kontrollgruppe ist die Proliferationsfähigkeit der Zellen deutlich eingeschränkt.

Durch Anwendung eines mathematischen Modells, welches die Kurvenverläufe der Proliferationskinetik widerspiegelt, lässt sich für die Zellen nach Inkubation mit Teslascan® ein asymptotischer Wert (maximal erreichbare Zellzahl an Tag 21) von 5.525.382 ermitteln, welcher um 23% geringer ist als der entsprechende Wert der Kontrollgruppe.

Alle anderen verwendeten Kontrastmittel zeigen in der vorliegenden Studie keinen eindeutigen proliferationshemmenden Einfluss auf die Fibroblasten.

Auch tierexperimentelle Studien zeigten deutliche Fehlbildungen des Fetus nach Applikation von Teslascan® in der vierfachen der empfohlenen Dosis.

Da jedoch in der vorliegenden Studie bei der zwanzigfachen Dosis keine signifikanten Einflüsse auf das Proliferationsverhalten der Zellen mehr beobachtet werden können, ist es fraglich, ob man bei der zehnfachen Dosis von einer Schwellendosis reden kann.

Die Proliferationskinetik der Endothezellen zeigt ein differentes Wachstumsverhalten.

Bis zum Tag 10 zeigt sich ein konstantes Wachstum der Zellen. Etwa an Tag 10 erreichen sie ihre maximale Zellzahl und zeigen aufgrund einer Kontaktinhibition keine weitere Proliferation mehr. Jedoch kommt es im weiteren Verlauf auch nicht, wie es bei den Fibroblasten der Fall ist, zu einem Abfall der Zellzahlen.

Keines der drei Kontrastmittel hat einen statistisch signifikanten hemmenden Einfluss auf die Proliferationsfähigkeit der Endothelzellen.

Dass Teslascan® jedoch hemmend auf das Wachstumsverhalten der Fibroblasten wirkt, lässt vermuten, dass die Wirkung von Kontrastmitteln auch vom jeweiligen Zelltyp und somit vom Gewebe abhängt.

4.6.3 Koloniebildungsassay

Bei der Untersuchung der Koloniebildungsfähigkeit der Zellen zeigen sich deutlich mehr Einflüsse der Kontrastmittel als bei der Proliferationskinetik.

Diese Einflüsse sind jedoch bezüglich der beiden untersuchten Zelllinien nicht identisch.

Bei den Fibroblasten gibt es einen deutlichen hemmenden Effekt auf die Koloniebildung bei Inkubation der Zellen mit MultiHance[®] in höchster Dosis (Abb. 3.17) und Teslascan[®] in fünffacher Dosis (Abb. 3.18).

Die übrigen Kontrastmittel bzw. Dosen zeigen keinen signifikanten Einfluss auf die Koloniebildung der Zellen.

Im Hinblick auf die Klonierungsfähigkeit der Endothelzellen lässt sich beobachten, dass es durch die Inkubation von Omniscan[®] in zwanzigfacher Dosis und Teslascan[®] sowohl in zehnfachen als auch in zwanzigfachen Dosen zu einem hemmenden Effekt auf die Koloniebildung kommt.

Teslascan[®] wirkt also hemmend auf die Proliferation der Fibroblasten und auf die Koloniebildungsfähigkeit der Endothelzellen.

Auch in den tierexperimentellen Studien von Blazak und Treinen wurden toxische Effekte auf den Fetus bestätigt (9, 65).

Diese unterscheiden sich jedoch im Hinblick auf das untersuchte Tier.

Obwohl die Effekte von Teslascan[®] sich abhängig von der Zelllinie unterscheiden, lassen sich dennoch hemmende Einflüsse bei beiden Zelllinien beobachten.

Auch unter Omniscan[®] und MultiHance[®] in höchster Dosis ließen sich hemmende Einflüsse auf die Koloniebildung feststellen. Omniscan[®] bewirkt bei den Nabelschnurendothelzellen eine um 57% geringere Kolonieanzahl im Vergleich zur Kontrollgruppe. Nach Inkubation der Lungenfibroblasten mit MultiHance[®] kommt es zu einer um 21% geringeren Kolonieanzahl im Vergleich mit der Kontrollgruppe.

Heinrich, der die Wirkung von Omniscan® auf Chondrozyten untersuchte (29), bekam ähnliche Ergebnisse. Er konnte feststellen, dass mit steigender Dosis die Proliferation der Zellen abnahm. In der vorliegenden Studie jedoch kam es nicht zu einer Hemmung der Proliferation, sondern nur zu einer Hemmung der Koloniebildung, welche Heinrich nicht untersucht hatte.

4.7 Stabilität der Kontrastmittel

Um die Frage zu beantworten, welches der in dieser Studie untersuchten Kontrastmittel denn nun am besten geeignet ist, sollte man auch einen Blick auf die Stabilität des jeweiligen Kontrastmittels werfen.

Die extrazellulären gadoliniumhaltigen MRT-Kontrastmittel enthalten alle das hochtoxische Gd^{3+} -Ion. Das isolierte Ion an sich kann zu einer Milzdegeneration, zu einer Lebernekrose, einer Kalziumkanalblockade und zu einer Vielzahl von hämatologischen Veränderungen führen (49).

Die Transmetallierung, also die Freisetzung des Gadoliniumions hängt von der Stabilität des vorliegenden Chelates ab (54, 55).

Man unterteilt die gadoliniumhaltigen MRT-Kontrastmittel nach ihrer chemischen Strukturformel in ionische und nicht-ionische und makrozyklische und lineare Kontrastmittel.

Die Molekülstruktur bedingt auch die Stabilität der Kontrastmittel.

So entsteht durch eine zyklische Struktur eine starke Bindung zu dem Gadoliniumion. Im Gegensatz dazu bilden die linear aufgebauten Chelate offene, bewegliche Ketten, welche keine starke Bindung zu dem toxischen Gd^{3+} -Ion aufweisen (46).

Im Vergleich zwischen ionischen und nicht-ionischen Chelaten sind die ionisch aufgebauten die stabileren Verbindungen. Dies lässt sich damit erklären, dass die Bindung zwischen den negativ geladenen Carboxylgruppen und dem Gadoliniumion stärker ist als die Bindung zwischen Amiden oder Alkohol der nicht-ionischen Chelate und dem Ion (46).

Gadoliniumchelate, welche eine geringere Stabilität aufweisen, unterliegen leichter einer Transmetallierung und geben somit das Gadoliniumion frei (46). Dieses hochtoxische Ion wirkt als Kanalblocker an Kalziumkanälen und hemmt somit physiologische Vorgänge, die mit einem Kalziumeinstrom verbunden sind sowie einige Enzyme (29).

Das leberspezifische Kontrastmittel Gadobenate dimeglumine, also MultiHance[®], ist ein linearer ionischer Chelatkomplex. Gadodiamide, Omniscan[®], ist auch linear, jedoch nicht-ionisch. Damit wird deutlich, dass Omniscan[®] thermodynamisch weniger stabil ist als MultiHance[®].

Der Versuch, die geringe Stabilität von Omniscan[®] durch einen Überschuss an Chelator zu beheben, zeigt leider nicht den gewünschten Effekt, da es dennoch zu einer erhöhten Ansammlung von Gadolinium im Gewebe kommt und der Chelatüberschuss zu einer vermehrten Bindung körpereigener Ionen führt. Dies bedeutet, dass es dennoch zur Transmetallierung, also Freisetzung von Gadolinium kommt (17, 23, 57, 73).

Auch Frenzel untersuchte in einer Studie die unterschiedliche Stabilität von gadoliniumhaltigen Kontrastmitteln im Serum von gesunden Probanden.

Es konnte gezeigt werden, dass die Freisetzung des Gadoliniumions aller linearen Komplexe um einige Male höher war als angenommen. Nach 15 Tagen war die Gadoliniumfreisetzung aus den nicht-ionischen Kontrastmitteln ungefähr zehnmal höher als aus den ionischen linearen (21).

Diese unterschiedliche Stabilität ist bei der Anwendung von MRT-Kontrastmitteln - vor allem auch bei Schwangeren - zu bedenken. Mit der Verwendung einer stabilen Verbindung kann eine übermäßige Freisetzung des toxischen Gadoliniumions vermieden werden.

4.8 Schlussfolgerungen

Aufgrund der vorliegenden Studie und der bisherigen Datenlage kann eine Gefährdung des Ungeborenen durch eine kontrastmittelverstärkte MRT-Untersuchung der Schwangeren nicht sicher ausgeschlossen werden.

Aus diesem Grund sind die Indikationen für eine Gabe von Kontrastmitteln streng zu halten.

Nutzen und Risiken müssen vor der geplanten Untersuchung gründlich gegeneinander abgewogen werden und gegebenenfalls ist auf eine andere Bildgebung, welche weniger Gefahren mit sich bringt, auszuweichen.

Die wichtigste bildgebende Methode in der Schwangerschaft bleibt somit die Sonographie. Der transvaginale Ultraschall dient zum Nachweis der intakten oder gestörten Schwangerschaft. Weiterhin kann er ohne Bedenken auch zur Abklärung von ovariellen Befunden eingesetzt werden.

Auch bei abdominellen Beschwerden der Schwangeren gibt der Ultraschall meist ausreichenden Informationen.

Wenn die Sonographie jedoch nicht genügend Informationen zur Klärung der vorliegenden Beschwerden der Patientin liefert, kann die MRT aufgrund ihres guten Gewebekontrastes und der exzellenten Auflösung eventuell die nötigen Informationen liefern, um eine adäquate Therapie einleiten zu können.

Da die paramagnetischen Kontrastmittel, welche in der MRT Anwendung finden, die Plazentaschranke passieren können, es jedoch noch zu wenige und zu widersprüchliche Erfahrungen bezüglich ihrer Wirkung auf das Ungeborene gibt, sollte diese nur bei weiterhin streng gestellter Indikation zum Einsatz kommen (22).

Besonders im ersten Trimester der Schwangerschaft, welches die Periode der Organogenese darstellt, sollte möglichst auf eine kontrastmittelunterstützte MRT verzichtet werden, wenngleich toxische Effekte aus der vorliegenden Studie nicht eindeutig hervorgehen, wohl aber antiproliferative.

Kommt es nach sorgfältigem Abwägen der Notwendigkeit doch zur Anwendung von MRT-Kontrastmitteln, so ist stets die niedrigste erforderliche Dosis zu wählen, da man davon ausgehen muss, dass die Gefahr des Fetus dosisabhängig ist.

Weiterhin sollte man sich nach Möglichkeit für ein sehr stabiles Kontrastmittel entscheiden, welches eine zyklische, ionische Struktur aufweist.

Um weitere und vor allem präzisere Aussagen über die Toxizität der Kontrastmittel machen zu können, sind weitere Studien erforderlich.

Schlüsse, die man aus der vorliegenden Studie ziehen kann, sind folgende:

Es zeigen sich keine toxischen, wohl jedoch antiproliferative Effekte der untersuchten Kontrastmittel in der klinisch verwendeten Dosis.

Da die Kontrastmittel unterschiedlich auf die verwendeten Zelllinien wirken, lässt sich eine Abhängigkeit von Zellart und somit Organismus vermuten. Weiterhin wichtig sind die Stabilität des Kontrastmittels und die damit verbundene Transmetallierung.

Unter Berücksichtigung dieser Aspekte lässt sich sagen, dass eine MRT in der Schwangerschaft mit den hier untersuchten Kontrastmitteln durchaus durchführbar ist.

5. Zusammenfassung

Bei manchen Untersuchungen während der Schwangerschaft liefert alleinig die MRT die erforderliche Information für die anstehende Therapieplanung.

So ist sie zum Beispiel zur Beurteilung der Plazenta und zur Abklärung abdomineller oder cerebraler Beschwerden eine große Hilfe und oft unverzichtbar. Auch pelvine Erkrankungen lassen sich mittels MRT exzellent darstellen.

Bei einigen Untersuchungen ist eine native MRT nicht ausreichend, so dass paramagnetische Kontrastmittel appliziert werden müssen.

Die intravenös verabreichten Kontrastmittel sind plazentagängig und gelangen so auch in den fetalen Kreislauf.

Über die Wirkung dieser Kontrastmittel auf das Ungeborene ist bisher nur sehr wenig bekannt und somit Anlass für diese Studie.

Methoden

Untersucht wird die Wirkung von den zwei gadoliniumhaltigen Kontrastmittel Omniscan[®] und MultiHance[®] und der manganhaltigen Verbindung Teslascan[®] in der umgerechnet maximal erlaubten Dosis und dem Fünf-, Zehn- und Zwanzigfachen dieser Dosis.

Es wird mit humanen embryonalen Lungenfibroblasten (Hel) und humanen Endothelzellen aus der Nabelschnur (Huvec) gearbeitet. Die Zellen werden 4 bzw. 24 mit den genannten Kontrastmitteln inkubiert und dann hinsichtlich ihrer klonogenen Aktivität (Koloniebildungsassay) und ihrer Proliferationsfähigkeit (Proliferationskinetik) untersucht.

Ergebnisse

Proliferationskinetik Lungenfibroblasten:

Statistisch signifikant unterschiedlich zur Kontrolle ist nur Teslascan[®] in zehnfacher Dosis. Im Gegensatz zu den Kontrastmitteln MultiHance[®] und

Omniscan[®] hat Teslascan[®] eine hemmende Wirkung auf die Proliferationskinetik der Lungenfibroblasten.

PK Nabelschnurzellen:

Hier zeigt keines der drei Kontrastmittel hemmende Effekte auf das Wachstum der Zellen.

Koloniebildungsassay Lungenfibroblasten:

Nach Inkubation mit MultiHance[®] in zwanzigfacher Dosis lässt sich eine statistisch signifikant reduzierte Koloniebildungsfähigkeit beobachten. Ebenso nach Inkubation der Zellen mit Teslascan[®] in fünffacher Dosis.

Koloniebildungsassay Nabelschnurendothelzellen:

Nach Inkubation mit Omniscan[®] in zwanzigfacher Dosis kommt es zu einer statistisch signifikant niedrigeren Koloniezahl.

Ebenso nach Inkubation der Zellen mit Teslascan[®] sowohl in zehner- als auch in zwanzigfacher Konzentration.

Diskussion

Da bisher nur sehr wenige Studien zu dieser Problematik vorliegen und die Ergebnisse in bisherigen sowie in der vorliegenden Studie nicht eindeutig und zum Teil widersprüchlich sind, können keine definitiven Aussagen über die Toxizität von MRT-Kontrastmitteln für den Fetus gemacht werden. So sind auf diesem Gebiet weitere Untersuchungen und Studien notwendig, um Klarheit zu schaffen. Bis dahin wird eine strenge Indikationsstellung zu stellen und die geringstmögliche Dosis des zum Einsatz kommenden Kontrastmittels zu wählen. Die vorliegende Studie zeigt, dass die untersuchten Kontrastmittel in der klinisch verwendeten Dosis keine toxischen Effekte haben. Weiterhin zeigt sich eine Zellabhängigkeit.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine MRT-Untersuchung in der Schwangerschaft durchaus durchführbar ist.

6. Literaturverzeichnis

- (1) Abramowicz, J. S. and E. Sheiner (2007). "In utero imaging of the placenta: importance for diseases of pregnancy." Placenta **28 Suppl A**: S14-22.
- (2) Agarwal, R., S. M. Brunelli, et al. (2009). "Gadolinium-based contrast agents and nephrogenic systemic fibrosis: a systematic review and meta-analysis." Nephrol Dial Transplant **24**(3): 856-63.
- (3) Arbab, A. S., S. D. Pandit, et al. (2006). "Magnetic resonance imaging and confocal microscopy studies of magnetically labeled endothelial progenitor cells trafficking to sites of tumor angiogenesis." Stem Cells **24**(3): 671-8.
- (4) Bailey, W., G. R. Freidenberg, et al. (1990). "Prenatal diagnosis of a craniopharyngioma using ultrasonography and magnetic resonance imaging." Prenat Diagn **10**(10): 623-9.
- (5) Bardo, D. and A. Oto (2008). "Magnetic resonance imaging for evaluation of the fetus and the placenta." Am J Perinatol **25**(9): 591-9.
- (6) Barkhof, F., R. J. Heijboer, et al. (1992). "Inadvertent i.v. administration of gadopentetate dimeglumine during early pregnancy." AJR Am J Roentgenol **158**(5): 1171.
- (7) Ben Sira, L., C. Garel, et al. (2008). "[Prenatal imaging of the fetal brain--indications and developmental implications of fetal MRI]." Harefuah **147**(1): 65-70, 93.
- (8) Bertin, A., J. Steibel, et al. (2009). "Development of a dendritic manganese-enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI) contrast agent: synthesis, toxicity (in vitro) and relaxivity (in vitro, in vivo) studies." Bioconjug Chem **20**(4): 760-7.
- (9) Blazak, W. F., G. L. Brown, et al. (1996). "Developmental toxicity study of mangafodipir trisodium injection (MnDPDP) in New Zealand white rabbits." Fundam Appl Toxicol **33**(1): 11-5.
- (10) Broome, D. R. (2008). "Nephrogenic systemic fibrosis associated with gadolinium based contrast agents: a summary of the medical literature reporting." Eur J Radiol **66**(2): 230-4.

- (11) Bulte, J. W. and D. L. Kraitchman (2004). "Iron oxide MR contrast agents for molecular and cellular imaging." NMR Biomed **17**(7): 484-99.
- (12) Bussi, S., X. Fouillet, et al. (2007). "Toxicological assessment of gadolinium release from contrast media." Exp Toxicol Pathol **58**(5): 323-30.
- (13) Crossgrove, J. and W. Zheng (2004). "Manganese toxicity upon overexposure." NMR Biomed **17**(8): 544-53.
- (14) Daldrup-Link, H. E., M. Rudelius, et al. (2005). "Migration of iron oxide-labeled human hematopoietic progenitor cells in a mouse model: in vivo monitoring with 1.5-T MR imaging equipment." Radiology **234**(1): 197-205.
- (15) De Santis, M., G. Straface, et al. (2007). "Gadolinium periconceptional exposure: pregnancy and neonatal outcome." Acta Obstet Gynecol Scand **86**(1): 99-101.
- (16) De Wilde, J. P., A. W. Rivers, et al. (2005). "A review of the current use of magnetic resonance imaging in pregnancy and safety implications for the fetus." Prog Biophys Mol Biol **87**(2-3): 335-53.
- (17) Doorenbos, C. J., A. Ozyilmaz, et al. (2003). "Severe pseudohypocalcemia after gadolinium-enhanced magnetic resonance angiography." N Engl J Med **349**(8): 817-8.
- (18) Erickson, M. L., R. Johnson, et al. (2005). "Malignant rhabdoid tumor in a pregnant adult female: literature review of central nervous system rhabdoid tumors." J Neurooncol **74**(3): 311-9.
- (19) Falip, C., P. Hornoy, et al. (2009). "[Fetal cerebral magnetic resonance imaging (MRI). Indications, normal and pathological patterns.]" Rev Neurol (Paris).
- (20) Forstner, R., C. L. Kalbhen, et al. (1996). "Abdominopelvic MR imaging in the nonobstetric evaluation of pregnant patients." AJR Am J Roentgenol **166**(5): 1139-44.
- (21) Frenzel, T., P. Lengsfeld, et al. (2008). "Stability of gadolinium-based magnetic resonance imaging contrast agents in human serum at 37 degrees C." Invest Radiol **43**(12): 817-28.
- (22) Garcia-Bournissen, F., A. Shrim, et al. (2006). "Safety of gadolinium during pregnancy." Can Fam Physician **52**: 309-10.

- (23) Gibby, W. A. and K. A. Gibby (2004). "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 **39**(3): 138-42.
- (24) Gjelsteen, A. C., B. H. Ching, et al. (2008). "CT, MRI, PET, PET/CT, and ultrasound in the evaluation of obstetric and gynecologic patients." Surg Clin North Am **88**(2): 361-90, vii.
- (25) Grant, D., W. F. Blazak, et al. (1997). "The reproductive toxicology of intravenously administered MnDPDP in the rat and rabbit." Acta Radiol **38**(4 Pt 2): 759-69.
- (26) Greisberg, J. K., J. M. Wolf, et al. (2001). "Gadolinium inhibits thymidine incorporation and induces apoptosis in chondrocytes." J Orthop Res **19**(5): 797-801.
- (27) Grobner, T. (2006). "Gadolinium--a specific trigger for the development of nephrogenic fibrosing dermopathy and nephrogenic systemic fibrosis?" Nephrol Dial Transplant **21**(4): 1104-8.
- (28) Guibaud, L. (2009). "Contribution of fetal cerebral MRI for diagnosis of structural anomalies." Prenat Diagn **29**(4): 420-33.
- (29) Heinrich, M. C., M. K. Kuhlmann, et al. (2007). "Cytotoxicity of iodinated and gadolinium-based contrast agents in renal tubular cells at angiographic concentrations: in vitro study." Radiology **242**(2): 425-34.
- (30) Hinds, K. A., J. M. Hill, et al. (2003). "Highly efficient endosomal labeling of progenitor and stem cells with large magnetic particles allows magnetic resonance imaging of single cells." Blood **102**(3): 867-72.
- (31) Hubbard, A. M., T. M. Crombleholme, et al. (1998). "Prenatal MRI evaluation of giant neck masses in preparation for the fetal exit procedure." Am J Perinatol **15**(4): 253-7.
- (32) Idee, J. M., M. Port, et al. (2006). "Clinical and biological consequences of transmetallation induced by contrast agents for magnetic resonance imaging: a review." Fundam Clin Pharmacol **20**(6): 563-76.
- (33) Joffe, P., H. S. Thomsen, et al. (1998). "Pharmacokinetics of gadodiamide injection in patients with severe renal insufficiency

and patients undergoing hemodialysis or continuous ambulatory peritoneal dialysis." Acad Radiol **5**(7): 491-502.

- (34) Kallen, A. J., M. A. Jhung, et al. (2008). "Gadolinium-containing magnetic resonance imaging contrast and nephrogenic systemic fibrosis: a case-control study." Am J Kidney Dis **51**(6): 966-75.
- (35) Kaminopetros, P., E. Jauniaux, et al. (1997). "Prenatal diagnosis of an extensive fetal lymphangioma using ultrasonography, magnetic resonance imaging and cytology." Br J Radiol **70**(835): 750-3.
- (36) Kasprian, G., P. C. Brugger, et al. (2006). "[Fetal lung development on MRT. Normal course and impairment due to premature rupture of membranes]." Radiologe **46**(2): 120-7.
- (37) Kawaguchi, T., F. Sagami, et al. (1999). "[Reproductive and developmental toxicity study of gadobenate dimeglumine formulation (E7155) (2)--Combined study of effects on fertility and embryo-fetal toxicity in female rats by intravenous administration]." J Toxicol Sci **24 Suppl 1**: 71-8.
- (38) Larsen, L. E. and D. Grant (1997). "General toxicology of MnDPDP." Acta Radiol **38**(4 Pt 2): 770-9.
- (39) Laurent, S., L. V. Elst, et al. (2006). "Comparative study of the physicochemical properties of six clinical low molecular weight gadolinium contrast agents." Contrast Media Mol Imaging **1**(3): 128-37.
- (40) Levine, D. (2006). "Obstetric MRI." J Magn Reson Imaging **24**(1): 1-15.
- (41) Leyendecker, J. R., V. Gorengaut, et al. (2004). "MR imaging of maternal diseases of the abdomen and pelvis during pregnancy and the immediate postpartum period." Radiographics **24**(5): 1301-16.
- (42) Liu, C. and J. B. Tyrrell (2001). "Successful treatment of a large macroprolactinoma with cabergoline during pregnancy." Pituitary **4**(3): 179-85.
- (43) Liu, X., M. Ashtari, et al. (2001). "Magnetic resonance imaging of the fetus in congenital intrathoracic disorders: preliminary observations." Pediatr Radiol **31**(6): 435-9.

- (44) Magin, R. L., J. K. Lee, et al. (2000). "Biological effects of long-duration, high-field (4 T) MRI on growth and development in the mouse." J Magn Reson Imaging **12**(1): 140-9.
- (45) Maldjian, C., R. Adam, et al. (1999). "MRI appearance of placenta percreta and placenta accreta." Magn Reson Imaging **17**(7): 965-71.
- (46) Marckmann, P., L. Skov, et al. (2006). "Nephrogenic systemic fibrosis: suspected causative role of gadodiamide used for contrast-enhanced magnetic resonance imaging." J Am Soc Nephrol **17**(9): 2359-62.
- (47) Marcos, H. B., R. C. Semelka, et al. (1997). "Normal placenta: gadolinium-enhanced dynamic MR imaging." Radiology **205**(2): 493-6.
- (48) Michaely, H. J., H. S. Thomsen, et al. (2007). "[Nephrogenic systemic fibrosis (NSF)--implications for radiology]." Radiologe **47**(9): 785-93.
- (49) Morcos, S. K. (2008). "Extracellular gadolinium contrast agents: differences in stability." Eur J Radiol **66**(2): 175-9.
- (50) Morisetti, A., S. Bussi, et al. (1999). "Toxicological safety evaluation of gadobenate dimeglumine 0.5 M solution for injection (MultiHance), a new magnetic resonance imaging contrast medium." J Comput Assist Tomogr **23 Suppl 1**: S207-17.
- (51) Nagayama, M., Y. Watanabe, et al. (2002). "Fast MR imaging in obstetrics." Radiographics **22**(3): 563-80; discussion 580-2.
- (52) Nicklas, A. H. and M. E. Baker (2000). "Imaging strategies in the pregnant cancer patient." Semin Oncol **27**(6): 623-32.
- (53) Novak, Z., A. S. Thurmond, et al. (1993). "Gadolinium-DTPA transplacental transfer and distribution in fetal tissue in rabbits." Invest Radiol **28**(9): 828-30.
- (54) Okazaki, O., N. Murayama, et al. (1996). "Placental transfer and milk secretion of gadodiamide injection in rats." Arzneimittelforschung **46**(1): 83-6.
- (55) Okuda, Y., F. Sagami, et al. (1999). "[Reproductive and developmental toxicity study of gadobenate dimeglumine formulation (E7155) (3)--Study of embryo-fetal toxicity in rabbits by intravenous administration]." J Toxicol Sci **24 Suppl 1**: 79-87.

- (56) Pedrosa, I., E. A. Zeikus, et al. (2007). "MR imaging of acute right lower quadrant pain in pregnant and nonpregnant patients." Radiographics **27**(3): 721-43; discussion 743-53.
- (57) Prince, M. R., H. E. Erel, et al. (2003). "Gadodiamide administration causes spurious hypocalcemia." Radiology **227**(3): 639-46.
- (58) Puttagunta, N. R., W. A. Gibby, et al. (1996). "Comparative transmetallation kinetics and thermodynamic stability of gadolinium-DTPA bis-glucosamide and other magnetic resonance imaging contrast media." Invest Radiol **31**(10): 619-24.
- (59) Puttagunta, N. R., W. A. Gibby, et al. (1996). "Human in vivo comparative study of zinc and copper transmetallation after administration of magnetic resonance imaging contrast agents." Invest Radiol **31**(12): 739-42.
- (60) Rodegerdts, E. A., E. F. Gronewaller, et al. (2000). "In vitro evaluation of teratogenic effects by time-varying MR gradient fields on fetal human fibroblasts." J Magn Reson Imaging **12**(1): 150-6.
- (61) Rofsky, N. M., D. J. Pizzarello, et al. (1994). "Effect on fetal mouse development of exposure to MR imaging and gadopentetate dimeglumine." J Magn Reson Imaging **4**(6): 805-7.
- (62) Sanchez, D. J., J. L. Domingo, et al. (1993). "Maternal and developmental toxicity of manganese in the mouse." Toxicol Lett **69**(1): 45-52.
- (63) Tanaka, Y. O., S. Sohda, et al. (2001). "High temporal resolution dynamic contrast MRI in a high risk group for placenta accreta." Magn Reson Imaging **19**(5): 635-42.
- (64) Thomsen, H. S. and P. Marckmann (2008). "Extracellular Gd-CA: differences in prevalence of NSF." Eur J Radiol **66**(2): 180-3.
- (65) Treinen, K. A., T. J. Gray, et al. (1995). "Developmental toxicity of mangafodipir trisodium and manganese chloride in Sprague-Dawley rats." Teratology **52**(2): 109-15.
- (66) Valentin, L. (2006). "Imaging in gynecology." Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol **20**(6): 881-906.
- (67) Varani, J., M. DaSilva, et al. (2009). "Effects of gadolinium-based magnetic resonance imaging contrast agents on human skin in

organ culture and human skin fibroblasts." Invest Radiol **44**(2): 74-81.

- (68) Verswijvel, G., M. Grieten, et al. (2002). "MRI in the assessment of pregnancy related intrauterine bleeding: a valuable adjunct to ultrasound?" JBR-BTR **85**(4): 189-92.
- (69) Vladareanu, R., M. Onofriescu, et al. (2006). "Magnetic resonance imaging in obstetrics." Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi **110**(3): 567-74.
- (70) Wang, C., P. B. Gordon, et al. (1997). "MR imaging properties and pharmacokinetics of MnDPDP in healthy volunteers." Acta Radiol **38**(4 Pt 2): 665-76.
- (71) Webb, J. A., H. S. Thomsen, et al. (2005). "The use of iodinated and gadolinium contrast media during pregnancy and lactation." Eur Radiol **15**(6): 1234-40.
- (72) Weinreb, J. C., C. E. Brown, et al. (1986). "Pelvic masses in pregnant patients: MR and US imaging." Radiology **159**(3): 717-24.
- (73) Wible, J. H., Jr. and M. R. Hynes (2004). "Measurement of serum calcium concentration after administration of gadoversetamide in dogs." Radiology **233**(1): 158-64.
- (74) Wittich, A. C., E. R. Salminen, et al. (2000). "Myomectomy during early pregnancy." Mil Med **165**(2): 162-4.

Danksagung

Vielen Dank an Herrn Prof. C.D. Claussen für die Möglichkeit, in seiner Klinik an meiner Dissertation zu arbeiten.

Mein aufrichtiger Dank gebührt Herrn Privatdozent Jakob Wiskirchen, Chefarzt der Radiologie und Nuklearmedizin des Franziskus Krankenhaus in Bielefeld und Herrn Dr. med. Benjamin Wiesinger für die umfassende Betreuung meiner Arbeit und die zahlreichen sehr guten Anregungen. Besonders den guten Kontakt und die gute Zusammenarbeit wusste ich stets zu schätzen

Einen besonderen Dank möchte ich an Herrn Dr. R. Kehlbach aussprechen für seine immerwährende Unterstützung während aller Abschnitte meiner Arbeit.

Vielen Dank für die sehr freundliche Einarbeitung und Betreuung meiner Laborarbeiten.

Seine Kenntnisse auf den Gebieten der Zellkultur und seine wertvollen Tipps waren unentbehrlich.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Professor Dietz aus dem Institut für Medizinische Biometrie der Universität Tübingen für die großartige und sehr geduldige Unterstützung bei der statistischen Aufbereitung und Analyse der Daten.

Lieben Dank an Julie für die vielen unterhaltsamen Stunden im Labor.

Ein großer Dank gilt auch meiner Familie für die bedingungslose Unterstützung während des gesamten Studiums und der vorliegenden Arbeit.

Für ein immer offenes Ohr möchte ich mich herzlich bei Hendrik bedanken.

Für zahlreiche gute und hilfreiche Gespräche während meiner Arbeit möchte ich mich bei meiner guten Freundin Theresa bedanken, welche mir vor allem auch bei der Gestaltung der vorliegenden Arbeit mit größter Geduld geholfen hat.

Und zuletzt einen großen Dank an Oli, der sich mit viel Eifer und Geduld um das ein oder andere Problem während des Schreibens dieser Arbeit gekümmert hat.

Curriculum vitae

Name: Jennifer Hensen
Geboren: am 03.01.1981 in Moers
Nationalität: deutsch

1987-1989: Waldschule Moers, Schwafheim
1989-1991: Dorfschule Moers, Repelen
1991-2000: Gymnasium Rheinkamp, Moers
2000: Allgemeine Hochschulreife

2000-2003: Studium der Ökotrophologie an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
2002: Vordiplom der Ökotrophologie
seit 2003 Studium der Humanmedizin an der Eberhard Karls Universität Tübingen
2005: Ärztliche Vorprüfung
08/2008-07/2009: Praktisches Jahr im Klinikum am Steinenberg, Reutlingen, im Royal Prince Alfred Hospital, Sydney und im Singapore General Hospital, Singapur
07.05.2010: Zweite Ärztliche Prüfung

seit 09/2010 Assistenzärztin im Vivantes Klinikum Neukölln, Berlin
Abteilung für Anästhesiologie, operative Intensivmedizin und Schmerztherapie